

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038877**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2021.11.01**

(21) Номер заявки

**201991843**

(22) Дата подачи заявки

**2018.02.16**(51) Int. Cl. **G01N 33/569** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ  
К АНТИГЕНАМ ВИРУСОВ СЕМЕЙСТВА ПОКСВИРУСОВ**


---

(31) **1751266**(32) **2017.02.16**(33) **FR**(43) **2020.02.29**(86) **PCT/FR2018/050376**(87) **WO 2018/150148 2018.08.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ИД ВЕТ (FR)**

(72) Изобретатель:

**Пуркер Филип, Комтет Лоик,****Карпентье Али, Рош Микаэль (FR)**

(74) Представитель:

**Хмара М.В. (RU)**

(56) TIAN HONG ET AL.: "Serodiagnosis of sheeppox and goatpox using an indirect ELISA based on synthetic peptide targeting for the major antigen P32", VIROLOGY JOURNAL, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 7, no. 1, 21 September 2010 (2010-09-21), page 245, XP021080175, ISSN: 1743-422X, DOI: 10.1186/1743-422X-7-245 abrègè; pg 245, col 2, para 1 - pg 246, col 1, para 2  
WO-A2-2009048769

PINGFAN YUAN ET AL.: "Multicolor Quantum Dot-Encoded Microspheres for the Fluoroimmunoassays of Chicken Newcastle Disease and Goat Pox Virus", JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, vol. 9, no. 5, 2 May 2009 (2009-05-02), pages 3092-3098, XP055404651, US ISSN: 1533-4880,

DOI: 10.1166/jnn.2009.009 page 3093, column 2, last paragraph - page 3094, column 1, paragraph 1 page 3097, column 2, paragraph 1

BOWDEN T.R. ET AL.: "Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 161, no. 1, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 19-29, XP026349457, ISSN: 0166-0934 [retrieved on 2009-05-06] pg 20, col 2, para 2.3 ; pg 22, col 1, para 2.8; figures 2-3; tables 3-4

CARN V.M. ET AL.: "Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripoxvirus", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 49, no. 3, 1 October 1994 (1994-10-01), pages 285-294, XP025440949, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/0166-0934(94)90143-0 [retrieved on 1994-10-01] pg 289, para 2.3.4; pg 290, para 3.2  
CN-A-102981000

Kristine Klewer-Fromentin ET AL.: "Lumpy Skin Disease Validierung eines neuen ELISAs (und einer neuen qPCR Methode) für die Diagnostik der Lumpy Skin Krankheit", 10 May 2017 (2017-05-10), XP055404409, Retrieved from the Internet: URL: [https://verbraucherschutz.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik\\_und\\_Verwaltung/MS/LAV\\_Verbraucherschutz/veterinaermedizin/veranstaltungen/symposium\\_fb4/zehntes/08\\_Validierung\\_ELISAs\\_Real-Time\\_PCR\\_Lumpy\\_Skin\\_Disease\\_Virus.pdf](https://verbraucherschutz.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/MS/LAV_Verbraucherschutz/veterinaermedizin/veranstaltungen/symposium_fb4/zehntes/08_Validierung_ELISAs_Real-Time_PCR_Lumpy_Skin_Disease_Virus.pdf) [retrieved on 2017-09-06] pages 10-16

(57) Изобретение относится к способу иммунологического определения специфического антитела к антигену (белку P32 или его фрагменту, обладающему антигенными свойствами) вируса, принадлежащего к семейству Poxviridae, в биологическом образце, предположительно инфицированном и(или) вакцинированном против указанного вируса. Изобретение также относится к соответствующему набору и его применениям, в частности для выявления инфекции или мониторинга вакцинации животных.

**038877 B1**

**038877 B1**

### Область изобретения

Изобретение относится к способу иммунологического определения с двумя антигенами для определения антител к антигенам вируса семейства *Poxviridae* в биологическом образце, а также к соответствующему набору и его применениям, в частности для определения инфекции или мониторинга вакцинации животных.

#### Предшествующий уровень техники

Вирусы семейства *Poxviridae*, в частности подсемейства *Chordoroxvirinae*, включают несколько родов и отвечают за различные заболевания. В частности, речь пойдет о вирусах *Orthoroxvirus*, *Pararoxvirus* и *Capripoxvirus* и предпочтительно *Capripoxvirus*, без ограничения перечисленными.

Род *Orthoroxvirus* включает вирус коровьей оспы и вирус оспы верблюдов, оба из которых являются зоонозными и поэтому опасны риском передачи человеку. Крупный рогатый скот является основным источником вируса коровьей оспы. Человек заражается главным образом при контакте кожи с зараженным животным, даже в отсутствие укусов или видимых царапин. Этот зооноз в основном встречается у профессионалов, находящихся в контакте с кошками, грызунами или крупным рогатым скотом: ветеринаров, профессиональных заводчиков, сотрудников зоомагазинов. Вирус оспы верблюдов вызывает вирусные заболевания, преимущественно поражающие двугорбых и одногорбых верблюдов, и приводит к значительным экономическим потерям в странах Африки, Ближнего Востока и Азии.

Заболевания, связанные с вирусами семейства *Poxviridae*, и, в частности, рода *Capripoxvirus*, которые передаются преимущественно через укусы насекомых и поражают домашний скот, представляют значительную угрозу для здоровья животных и наносят экономический ущерб, ввиду того, что снижается продуктивность домашнего скота.

Вирус оспы вызывает такие заболевания, как оспа овец, оспа коз и контагиозный узелковый (нодулярный) дерматит крупного рогатого скота (болезнь "кожного отека", кожно-узелковая сыпь, узелковая экзантема); они протекают либо в классической форме (везикулярной или нодулярной), или в осложненной форме, или даже в сверхострой или септической форме, которые, впрочем, наблюдаются редко.

Контагиозный нодулярный дерматит обычно характеризуется лихорадкой, появлением крупных узелков на коже, слизистых оболочках и внутренних органах, анемией, увеличением лимфоузлов и отеком кожи. Хотя летальность остается достаточно низкой, заболеваемость может быть достаточно высокой и затрагивать до 90% популяции. Экономическое значение связано с производственными потерями, в частности, со снижением молочной продуктивности. Кроме того, снижается качество кожевенного сырья. Контагиозный нодулярный дерматит вызывают различные штаммы *Capripoxvirus*, которые по антигенным характеристикам не отличимы от штаммов, вызывающих оспу овец или оспу коз. Однако географическое распространение двух заболеваний различается, что позволяет предположить, что штаммы *Capripoxvirus*, заражающие коров, не могут инфицировать или передаваться овцам или козам.

Контагиозный нодулярный дерматит, распространившийся в Африке за сто лет и после этого с 2012 г на Ближнем Востоке и в юго-восточной Европе, в настоящее время появился в Европе (в 2015-2016 годах зарегистрированы случаи в Греции, Болгарии и других балканских странах), и поиск решений, которые позволят предотвратить и/или воспрепятствовать его распространению, является очень актуальным.

Эксперты, уполномоченные Европейским агентством по безопасности продуктов питания и Еврокомиссией, опубликовали заявление от 9 августа 2016, где на основании исследования сравнительной эффективности различных мер по предотвращению распространения данного заболевания пришли к заключению, что наилучшим способом является вакцинация. Таким образом, при тщательном применении вакцинации частичный забой пораженных животных будет настолько же эффективен для эрадикации заболевания, как и забой целых стад, требующийся в настоящее время согласно Европейскому законодательству. Вакцинация особенно эффективна, когда ее применяют до попадания вируса в страну или регион. Серологический скрининг инфицированных животных обычно проводят методом серонейтализации вируса, отличающимся высокой специфичностью. Однако иммунитет к инфекции, вызванной *Capripoxvirus*, преимущественно является клеточно-опосредованным. Таким образом, анализ является недостаточно чувствительным для выявления животных, находившихся в контакте с вирусом, у которых нейтрализующие антитела выработались лишь в небольшом количестве.

Эти нейтрализующие антитела сами по себе не объясняют наличие иммунитета: надежная защита может сопровождаться низким уровнем нейтрализующих антител. Метод Вестерн-блоттинга, основанный на реакции между специфичным для *Capripoxvirus* антигеном и исследуемой сывороткой, является одновременно чувствительным и специфичным, но дорогостоящим и его внедрение затруднено. Приемлемым серологическим референтным методом является непрямой ИФА с применением указанного антигена, экспрессируемого соответствующим вектором. Bowden T.R et al. (*Journal of Virological Methods*, 161, 2009: 19-29) провели исследование для выявления и разработки других антигенов-кандидатов, специфичных в отношении *Capripoxvirus*, для их использования в методах непрямого ИФА. Однако по-прежнему остается неудовлетворенная потребность в способах иммунологического определения, которые будут легко применять и стандартизировать, обладающими улучшенной чувствительностью и специфичностью в отношении вирусов семейства *Poxviridae* и, в частности, в отношении *Capripoxvirus*, и

для количественного и/или качественного определения комплекса антиген/антитело, даже через несколько недель или месяцев после инфекции и/или после вакцинации.

Известно, что антитела появляются приблизительно через 15 суток после вакцинации и их количество увеличивается вплоть до 30 суток, а затем снижается до уровней, которые с трудом определяются существующими методами.

В этой связи заявитель протестировал различные специфичные антигены-кандидаты, в частности вирусов Саргірох, и различные методики, и разработал способ иммунологического определения, удовлетворяющий данным потребностям. Таким образом, заявитель разработал способ иммунологического определения с двумя антигенами, где в качестве антигена-мишени используется синтетический или рекомбинантный белок гР32, специфичный для Саргірохvirus (гомолог белка Н3L Orthoroxvirus), позволяющий выявить и/или определить количество антител к указанному вирусу в биологическом образце, полученном у животного, подверженного инфекции, даже через 5 месяцев после вакцинации, что является невозможным при любой другой технологии, существующей в настоящее время, при такой же чувствительности и/или специфичности (тест нейтрализации вируса, прямые или непрямые иммунологические методы), даже если можно предположить, что животное защищено.

Кроме того, способ иммунологического определения по изобретению может иметь многочисленные преимущества по сравнению с методами серонейтрализации и непрямого иммунопероксидазного метода, использовавшихся до настоящего времени.

Действительно, указанные методы серонейтрализации и непрямого иммунопероксидазного метода, известные на уровне техники

требуют манипуляций с вирусом, которые можно осуществлять только в изолированной зоне и поэтому подразумевают доступ в указанные зоны, что ограничивает возможность широкого распространения аналитической методики,

позволяют получить результаты в течение 24-48 ч,

опираются на субъективные критерии (оценка оператором) для интерпретации результатов образца, трудно поддаются стандартизации и

не подходят или плохо подходят для исследования большого числа образцов и не поддаются автоматизации.

Способ иммунологического определения по изобретению обладает следующими преимуществами:

может быть осуществлен в любой серологической лаборатории,

позволяет получить результаты в течение менее чем 3 ч,

использует объективные критерии (подсчет по значениям оптической плотности) для индивидуальной интерпретации исследованных образцов,

поддается стандартизации благодаря применению в каждом анализе положительного контроля,

не подходит для исследования большого числа образцов и поддается автоматизации,

является специфичным в отношении заданного семейства (рода) (отсутствует перекрестная реактивность с белком Р32 одного семейства вирусов и биологическим образом, инфицированным вирусом другого семейства).

### **Сущность изобретения**

Таким образом, первым объектом изобретения является способ иммунологического определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса, принадлежащего к семейству Poxviridae, в частности к роду Orthoroxvirus, роду Pararoxvirus или предпочтительно роду Саргірохvirus, в биологическом образце, включающий следующие стадии:

(i) приведение в контакт по меньшей мере одного первичного антигена, содержащего по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок гР32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, с биологическим образцом, который предположительно содержит указанное антитело, специфичное к указанному первичному антигену, в условиях, обеспечивающих образование комплекса первичный антиген/антитело;

(ii) добавление по меньшей мере одного конъюгата, содержащего вторичный антиген, содержащего по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок гР32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, и метку в условиях, обеспечивающих образование комплекса первичный антиген/антитело/конъюгат; и

(iii) детектирование указанного комплекса первичный антиген/антитело/конъюгат. Предпочтительно первичный антиген на стадии (i) фиксирован на твердом носителе.

Согласно предпочтительному воплощению биологический образец представляет собой биологический образец животного, которое может быть инфицировано и/или вакцинировано более 1 месяца назад или даже 2 месяцев, предпочтительно более 3 месяцев назад, более предпочтительно более 4 месяцев назад или более 5 месяцев назад.

Согласно предпочтительному воплощению биологический образец представляет собой образец сыроворотки или плазмы коровы, козы, овцы или любого другого предрасположенного биологического вида, которое может быть вакцинировано более 3 месяцев назад или даже более 5 месяцев назад.

Другим объектом изобретения является набор для качественного и/или количественного определе-

ния антитела, специфичного в отношении антигена вируса, принадлежащего к семейству Poxviridae, в частности к роду Orthopoxvirus, роду Parapoxvirus или предпочтительно роду Capripoxvirus, в биологическом образце, включающий:

(i) твердый носитель, сенсibilизированный по меньшей мере одним первичным антигеном вируса, принадлежащего к семейству Poxviridae, в частности к роду Orthopoxvirus, роду Parapoxvirus или предпочтительно роду Capripoxvirus, содержащим по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок гР32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами,

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий по меньшей мере один вторичный антиген вируса, принадлежащего к семейству Poxviridae, в частности к роду Orthopoxvirus, роду Parapoxvirus или предпочтительно роду Capripoxvirus, содержащий синтетический или рекомбинантный белок гР32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, и метку,

(iii) и, возможно, средство для проявления и определения наличия комплекса первичный антиген/антитело/конъюгат.

Изобретение также относится к применению способа иммунологического определения или набора, описанных выше, для определения и диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной вирусом, относящимся к семейству Poxviridae, в частности к роду Orthopoxvirus, роду Parapoxvirus или Capripoxvirus, предпочтительно Capripoxvirus, таких как вирус контагиозного нодулярного дерматита, вируса оспы коз и вируса оспы овец, в биологическом образце, в частности, по меньшей мере через 2 или 3 месяца после инфекции. В частности, применение способа иммунологического определения или набора, описанных выше, обладает преимуществом для мониторинга в течение времени вакцинации против вируса, относящегося к семейству Poxviridae, в частности к Capripoxvirus, таким как вирус контагиозного нодулярного дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в частности, по меньшей мере через 2 или 3 месяца после вакцинации, что является невозможным для других существующих способов, с такой чувствительностью и специфичностью.

#### **Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения**

Способ иммунологического определения.

Таким образом, изобретение относится к способу иммунологического определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса, принадлежащего к семейству Poxviridae, в частности к роду Orthopoxvirus, роду Parapoxvirus или предпочтительно роду Capripoxvirus, в биологическом образце, включающему следующие стадии:

(i) приведение в контакт по меньшей мере одного первичного антигена, содержащего по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок гР32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, с биологическим образцом, в котором подозревают наличие указанного антитела, специфичного к указанному первичному антигену, в условиях, обеспечивающих образование комплекса первичный антиген/антитело;

(ii) добавление по меньшей мере одного конъюгата, содержащего по меньшей мере один вторичный антиген, содержащий синтетический или рекомбинантный белок гР32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, и метку в условиях, обеспечивающих образование комплекса первичный антиген/антитело/конъюгат; и

(iii) детектирование указанного комплекса первичный антиген/антитело/конъюгат.

Предпочтительно указанный первичный антиген иммобилизован на твердом носителе. Другими словами, твердый носитель сенсibilизирован приведением в контакт с указанным первичным антигеном.

Под "вирусом, принадлежащим к семейству Poxviridae" понимают, в частности, вирусы рода Orthopoxvirus, такие как вирус коровьей оспы и вирус оспы верблюдов, вирусы рода Parapoxvirus и более конкретно вирусы рода Capripoxvirus, такие как вирус НДК, вирус оспы коз и вирус оспы овец.

Под "биологическим образцом" понимают, в частности, образец ткани или жидкости организма, который может содержать антитела, специфичные в отношении указанного антигена-мишени (далее обозначаемые антителом, или антителом к антигену, или антителом к CPV).

Согласно конкретному воплощению указанный биологический образец выбран из образца крови, сыворотки, плазмы, молока, слюны, мокроты, цереброспинальной жидкости или экссудатов ткани, кала, предпочтительно образца сыворотки или плазмы.

В частности, указанный биологический образец представляет собой образец из организма животного любого вида, который может содержать вирус, относящийся к семейству Poxviridae, в частности млекопитающего, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из крупного рогатого скота, коз и овец или любых других предрасположенных биологических видов, таких как жирафы.

Согласно другому конкретному воплощению биологический образец происходит из организма человека.

Предпочтительно применять биологический образец, происходящий из организма коровы, козы или овцы, выбранный из сыворотки или плазмы.

Согласно конкретному воплощению биологический образец представляет собой биологический образец от животного, которое может быть инфицировано и/или вакцинировано более 1 месяца назад или

даже более 2 месяцев назад, предпочтительно более 3 месяцев назад, более предпочтительно более 4 месяцев назад или более 5 месяцев назад.

Согласно предпочтительному воплощению биологический образец представляет собой образец сыворотки или плазмы коровы, козы, овцы, которая может быть инфицирована и/или вакцинирована более 5 месяцев назад. Биологический образец обычно получают стандартными способами, известными специалистам в области техники, например посредством взятия крови.

Под иммунологическим определением (с двумя антигенами по изобретению) понимают анализ для определения связывания двух молекул антигена-мишени со специфическим антителом к указанным антигенам-мишеням, один из которых входит в состав конъюгата, содержащего указанный антиген-мишень и метку.

Иммунологический анализ по изобретению обладает улучшенной специфичностью и чувствительностью по сравнению с другими проанализированными методиками, что четко иллюстрируется примерами. Он также обладает тем преимуществом, что отсутствует перекрестная реакция с вирусами разных семейств (родов). Можно отметить, что специфичность иммунологического анализа по изобретению, применяемого для определения антител, специфичных к вирусу контагиозного нодулярного дерматита, составляет 100%, и чувствительность 100% в стандартных условиях (инфекция и/или вакцинация менее 2 месяцев назад) и 75% в экстремальных условиях (вакцинация более 5 месяцев назад), тогда как в других тестах составляет не более 36%.

Улучшенная чувствительность является результатом того, что иммунологическое определение по изобретению сочетает два основных преимущества непрямого и конкурентного анализа; действительно, он способен выявлять любой тип антител, которые связываются с антигеном-мишенью (а не только антител, связывающихся с определенным эпитопом, как в конкурентных исследованиях) и, с другой стороны, в тесте можно использовать большое количество образца (без разведения или с небольшим разведением), как в конкурентных тестах, что облегчает детекцию слабоположительных сигналов.

Аналогично, высокая специфичность иммунологического определения по изобретению предположительно обусловлена тем фактом, что антиген-мишень должен распознаваться дважды одним и тем же антителом.

Таким образом, способ по определению обладает специфичностью в отношении рода искомого вируса: белок P32 вируса заданного семейства (рода) (например, *Capripoxvirus*) не будет вступать в реакцию с сывороткой, инфицированной вирусом из другого семейства (рода) (например, *Parapoxvirus*), как в других существующих способах.

Наконец, избирательный выбор белка P32 (синтетического или рекомбинантного) *Capripoxvirus* или его гомолога H3L у *Orthopoxvirus* в качестве антигена CPV (от лат. *Capripoxvirus*) (или OPV в случае *Orthopoxvirus*) обеспечивает указанные преимущества по сравнению с другими протестированными антигенами-кандидатами.

Антиген-мишень, использованный в данном изобретении, который является специфичным в отношении вирусов семейства *Poxviridae*, в частности рода *Orthopoxvirus* (OPV) и *Capripoxvirus* (CPV) и предпочтительно рода *Capripoxvirus*, также обозначаемый антигеном CPV, выбран из синтетического или рекомбинантного белка pP32 (гомолог H3L у *Orthopoxvirus*) или его пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами.

В описании данного изобретения термин "белок P32" (рекомбинантный или синтетический) используется для обозначения белка P32 *Capripoxvirus* (такого как белок P32 вируса контагиозного нодулярного дерматита, проиллюстрированный последовательностью SEQ ID No: 1 ниже), а также его гомолога H3L, экспрессируемого у *Orthopoxvirus*, включая вирус коровьей оспы и вирус верблюжьей оспы соответственно, проиллюстрированных последовательностями SEQ ID No: 4 и SEQ ID No: 5 ниже. Указанные гомологичные белки обычно представляют собой белки, гены которых имеют общее происхождение, у которых близкая пространственная организация и схожие аминокислотные последовательности, что связано с их функцией.

В научной литературе и, в частности, на сайтах NCBI и Uniprot упоминаются белки P32 *Capripoxvirus* и белки H3L *Orthopoxvirus* (далее в данном описании обозначаемые гомологичными белками).

В дальнейшем описании антиген CPV (*Capripoxvirus*), или антиген LSD (контагиозного нодулярного дерматита), или антиген P32, или белок P32, или синтетический или рекомбинантный белок pP32, или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, будут использоваться взаимозаменяемо, также охватывая термины антиген OPV (*Orthopoxvirus*) и гомологичные P32 белки *Orthopoxvirus*, также известные под названием белок H3L.

Специалист в области техники будет способен выбрать белок P32 (синтетический или рекомбинантный, полноразмерный белок или фрагмент, обладающий антигенными свойствами) для применения в способе по данному изобретению для иммунологического определения антитела, специфичного в отношении антигена заданного вируса, в зависимости от семейства (рода) вируса-мишени, поиск которого осуществляют в исследуемых биологических образцах.

Таким образом, в конкретном и предпочтительном воплощении он будет использовать в способе по изобретению для иммунологического определения антитела, специфичного в отношении антигена виру-

са рода *Carpinoxvirus*, белок P32 *Carpinoxvirus*, в частности белок P32 вируса контагиозного нодулярного дерматита, проиллюстрированного последовательностью SEQ ID No: 1, приведенной ниже.

Согласно другому конкретному воплощению он будет использовать в способе по изобретению для иммунологического определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса коровьей оспы, белок H3L (гомолог P32, экспрессируемый *Orthoroxvirus*, включая вирус коровьей оспы и вирус оспы верблюдов), в частности белок H3L, проиллюстрированный последовательностью SEQ ID No: 4, приведенной ниже.

Согласно другому конкретному воплощению он будет использовать в способе по изобретению для иммунологического определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса оспы верблюдов, белок H3L, проиллюстрированный последовательностью SEQ ID No: 5, приведенной ниже.

Таким образом, согласно изобретению в качестве первичного антигена будет использоваться по меньшей мере один антиген P32 (или H3L).

Согласно одному конкретному воплощению комбинация антигена P32 (или H3L) по изобретению будет использоваться вместе с другим антигеном CPV (OPV) (отличным от rP32), в частности, для улучшения и/или увеличения чувствительности и/или специфичности способа на наибольшем количестве биологических образцов.

Это также может быть слитый белок, содержащий по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок rP32 (или rH3L) или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, или иной синтетический или рекомбинантный белок, или другой конкретный антиген-кандидат CPV (OPV), или его фрагмент.

Вместо белка P32 (или H3L) можно использовать обладающие антигенными свойствами фрагменты белка P32 (или H3L) при условии, что указанные фрагменты способны связываться с антителами, направленными против *Carpinoxvirus* (или *Orthoroxvirus*) или слитые белки, содержащие по меньшей мере один из указанных белков или его фрагментов, обладающих антигенными свойствами. Таким образом, специалист в области техники, основываясь на своих знаниях и применяя существующие способы, осуществив экспрессию частей последовательности или картирование перекрывающихся эпитопов, определит фрагменты, обладающие антигенными свойствами, которые можно применять согласно изобретению. Один из примеров способа описан Reineke U, Sabat R. 'Antibody epitope mapping using SPOT peptide arrays'. *Methods Mol Biol.* 2009;524:145-67. doi: 10.1007/978-1-59745-450-6\_11. PubMed PMID: 19377943.

В конкретном воплощении антигенные фрагменты содержат последовательность по меньшей мере из 10 аминокислот аминокислотной последовательности белка P32 (H3L), в частности от 50 до 320 аминокислот, и в частности от 200 до 320 аминокислот.

Как и указанные белки, обладающие антигенными свойствами, фрагменты могут быть синтетического или рекомбинантного происхождения.

Белок rP32 (rH3L) или его фрагменты, обладающие антигенными свойствами, могут иметь одну или более чем одну консервативную аминокислотную модификацию (обуславливающие аналогичные свойства) или другие незначительные модификации (например, мутации) и сохранять биологическую активность связывания конкретного антитела к указанному антигену-мишени CPV (OPV), которую легко верифицировать иммунологическими тестами для определения комплекса антиген/антитело. В частности, речь пойдет о последовательностях, являющихся производными или мутированными последовательностями указанного белка rP32 (rH3L) или его фрагментов, обладающих антигенными свойствами.

Согласно конкретному воплощению данного изобретения первичный антиген содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) последовательности SEQ ID No: 1, последовательности SEQ ID No: 4, последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с последовательностью SEQ ID No: 1, последовательностью SEQ ID No: 4, или последовательностью SEQ ID No: 5 соответственно, или

б) пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 1, последовательности SEQ ID No: 4, последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

Согласно предпочтительному воплощению изобретения, в частности, для выявления инфекции или после вакцинации вирусом рода *Carpinoxvirus*, первичный антиген согласно изобретению содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: 1 (белка P32 *Carpinoxvirus* CPV) или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 1, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот SEQ ID No: 1 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно идентичностью по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

Согласно одному конкретному воплощению первичный антиген содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SEQ ID No: 1 или последовательность, имеющую идентичность по

меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 1.

Согласно другому конкретному воплощению первичный антиген содержит по меньшей мере один пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, содержащий последовательность по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 1, в частности от 50 до 320 аминокислот и в частности, от 200 до 320 аминокислот последовательности SEQ ID No: 1 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID No: 1.

Согласно другому конкретному воплощению изобретения, в частности для выявления инфекции или после вакцинации вирусом рода *Carpinivirus*, первичный антиген согласно изобретению содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: 4 (белка P32 вируса коровьей оспы, также известного под названием белка H3L) или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 4, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 4 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами. Согласно одному конкретному воплощению первичный антиген содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID No: 4 или последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 4.

Согласно другому конкретному воплощению первичный антиген содержит по меньшей мере один пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, содержащий последовательность по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 4, в частности от 50 до 320 аминокислот и, в частности, от 200 до 320 аминокислот последовательности SEQ ID No: 4 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID No: 4.

Согласно другому конкретному воплощению изобретения, в частности, для выявления инфекции или после вакцинации вирусом оспы верблюдов, первичный антиген согласно изобретению содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: (белка P32 вируса оспы верблюдов, также известного под названием белка H3L) или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 5, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

Согласно конкретному воплощению первичный антиген содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SEQ ID No: 5 или последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 5.

Согласно другому конкретному воплощению первичный антиген содержит по меньшей мере один пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, содержащий последовательность по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 5, в частности от 50 до 320 аминокислот и, в частности, от 200 до 320 аминокислот последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID No: 5.

Процент идентичности между двумя последовательностями имеет общепринятое значение в области техники; он определяется на основании глобального выравнивания сравниваемых последовательностей, что означает выравнивание последовательностей, взятых целиком, по всей их длине с применением любого известного специалистам в области техники алгоритма, такого как алгоритм Нидлмана и Вунша-1970; и специалист в области техники применит известные способы сравнения и выравнивания, например алгоритмы сравнения последовательностей для определения идентичности двух полипептидных последовательностей. Одним из примеров является алгоритм BLAST, доступный на сайтах NCBI и Uniprot.

Под "конъюгатом" по изобретению понимают соединение, содержащее вторичный антиген-мишень и метку.

Согласно предпочтительному воплощению изобретения, в частности, для выявления инфекции или после вакцинации вирусом рода *Carpinivirus*, первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: 1 (белка P32 *Carpinivirus* CPV) или последовательности, демонстрирующей идентичность по мень-

шей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 1, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот SEQ ID No: 1 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами. Согласно другому предпочтительному воплощению первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере один пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, содержащий последовательность по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 1, в частности от 50 до 320 аминокислот и, в частности, от 200 до 320 аминокислот последовательности SEQ ID No: 1 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

В предпочтительном воплощении первичный антиген и вторичный антиген содержат одинаковую аминокислотную последовательность, вторичный антиген (конъюгат) дополнительно содержит метку.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID No: 1, вторичный антиген (конъюгат) дополнительно содержит метку.

Согласно другому конкретному воплощению, в частности, для выявления инфекции или после вакцинации таким вирусом, как вирус коровьей оспы, первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: 4 (белка P32 вируса коровьей оспы, также известного как белок H3L) или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 4, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот SEQ ID No: 4 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

Согласно другому конкретному воплощению первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере один пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, содержащий последовательность по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 4, в частности от 50 до 320 аминокислот и, в частности, от 200 до 320 аминокислот последовательности SEQ ID No: 4 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

В предпочтительном воплощении первичный антиген и вторичный антиген содержат одинаковую аминокислотную последовательность, вторичный антиген (конъюгат) дополнительно содержит метку.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID No: 4, вторичный антиген (конъюгат) дополнительно содержит метку. Согласно одному конкретному воплощению, в частности, для выявления инфекции или после вакцинации таким вирусом, как вирус оспы верблюдов, первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: 5 (белка P32 вируса оспы верблюдов, также известного как белок H3L) или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 5, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

Согласно одному конкретному воплощению первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере один пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, содержащий последовательность по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 5, в частности от 50 до 320 аминокислот и, в частности, от 200 до 320 аминокислот последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

В предпочтительном воплощении первичный антиген и вторичный антиген содержат одинаковую аминокислотную последовательность, вторичный антиген (конъюгат) дополнительно содержит метку.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген и вторичный антиген содержат по меньшей мере аминокислотную последовательность SEQ ID No: 5, вторичный антиген (конъюгат) дополнительно содержит метку. Термин "метка" относится к индикаторному реагенту, позволяющему выявлять комплекс антиген/антитело/конъюгат.

В частности, указанная метка может быть выбрана из группы, состоящей из фермента, флуоресцентного соединения или флуорофора, (хеми)люминесцентного соединения, радиоактивного элемента, частицы коллоидного золота или латекса.

В качестве примеров можно привести

для ферментов: пероксидазу, глюкозидазу, щелочную фосфатазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу,  $\beta$ -галактозидазу,  $\beta$ -глюкозидазу,  $\beta$ -глюкуронидазу,

для флуоресцентных соединений или флуорофоров: флуоресцеин, родамин,

для (хеми)люминесцентных соединений: диоксэтаны, соединения акридиния, соединения фенантридия, рутений, люминол,

для радиоактивных элементов: серу, йод,

для частиц: коллоидное золото, латекс.

Предпочтительно это будет фермент, более предпочтительно фермент, выбранный из пероксидазы и щелочной фосфатазы.

Конъюгат, содержащий указанный антиген-мишень и указанную метку, может быть получен стандартными способами, известными специалистам в области техники.

Образованный комплекс антиген/антитело/конъюгат может быть выявлен любым подходящим способом в зависимости от выбранной метки, например, с применением методов на основе колориметрии, флуориметрии, хемиллюминесценции, радиоактивных способов, известных специалистам в области техники.

Например, когда метка представляет собой фермент, определение комплекса антиген/антитело/конъюгат можно осуществлять путем приведения указанного комплекса в контакт с подходящим субстратом и, возможно, с подходящими агентами, усиливающими и/или активирующими ферменты.

Например, в качестве подходящего субстрата и/или подходящего агента, усиливающего и/или активирующего ферменты, можно упомянуть

для щелочной фосфатазы: субстраты на основе п-нитрофенилфосфата (p-NPP), 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата/нитросинего тетразолия (BCIP / NBT); 4-метилумбеллифенил (4-MUP) фосфата, 2-(5'-хлор-2'-фосфорилоксифенил)-6-хлор-1-(3H)-хиназолинона (CPPCQ), 3,6-флуоресцеиндифосфата (3,6-FDP),

для пероксидаз: субстраты на основе 2,2-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS), о-фенилендиаминовой кислоты (OPD), 3,3',5,5'-тетраметилбензидиновой кислоты (TMB), о-дианизидина, 5-аминосалициловой кислоты, 3-диметиламинобензойной кислоты (DMAB) и 3-метил-2-бензотиазолингидразоновой кислоты (MBTH), 3-амино-9-этилкарбазола (AEC) и 3,3'-диаминобензидина (DAB) тетрахлорида; 4-гидрокси-3-метоксифенилуксусной кислоты, восстановленных феноксазинов и бензотиазинов,

для гликозидаз: субстраты на основе о-нитрофенил-3-D-галактозида (o-NPG), p-нитрофенил-3-D-галактозида и 4-метилумбеллифенил-3-D-галактозида (MUG) для β-галактозидазы; β-D-галактопиранозида резорурфина, дигалактозида флуоресцеина (FDG), диглюкуронида флуоресцеина, 4-метилумбеллиферил бета-D-галактопиранозида, карбоксиумбеллиферил бета-D-галактопиранозида, фторированного бета-D-галактопиранозида кумарина и т.д.

В конкретном воплощении указанная метка представляет собой пероксидазу, такую как пероксидаза хрена, а соответствующий хромогенный субстрат, который обеспечивает развитие окраски в присутствии пероксидазы, представляет собой 5,5'-тетраметилбензидин (TMB).

Иммунологическое определение может быть выбрано из группы, состоящей из иммунохроматографического анализа, иммуноферментного анализа (ИФА), радиоиммуноанализа (РИА), гемагглютинационного теста (ГА), вестерн-блоттинга, флуоресцентного поляризационного иммуноанализа (ФПИА) и метода непрямой иммунофлуоресценции.

Согласно конкретному воплощению иммунологическое определение представляет собой иммунохроматографический анализ или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), предпочтительно твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Определение антител к вирусам методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с двумя антигенами по изобретению заключается в сенсбилизации лунки первичным антигеном CPV, внесением биологического образца, который необходимо исследовать, в условиях, обеспечивающих образование комплекса антиген/антитело, затем внесение конъюгата, содержащего вторичный антиген и метку (фермент) для образования комплекса антиген/антитело/конъюгат, который обнаруживают в присутствии подходящего субстрата. Быстрое определение антител к вирусам при помощи иммунохроматографии на мембранах с двумя антигенами по изобретению заключается во внесении биологического образца, который необходимо исследовать, на один конец нитроцеллюлозной мембраны, зафиксированный на пластиковой или картонной подложке. Если искомое антитело присутствует, оно связывается с первичным антигеном CPV и конъюгатом, содержащим вторичный антиген CPV, который чаще всего мечен коллоидным золотом.

Под влиянием буфера (подвижная фаза) комплексы антитело-вторичный конъюгированный антиген мигрируют под воздействием капиллярного эффекта и останавливаются первичными антигенами CPV, присоединенными к мембране. Положительный результат представляет собой появление окрашенных полос. Избыток конъюгированного вторичного антигена продолжает мигрировать и иммобилизуется антителом к CPV, накопление окрашенных комплексов вызывает появление окрашенной полосы, эта вторая полоса, или контрольная полоса, подтверждает надлежащее протекание реакции. В случае отрицательной реакции окрашивается только контрольная полоса. Полосы появляются быстро, в течение 15-20 мин. Принцип быстрого определения антител методом иммунохроматографии на тест-полосках явля-

ется идентичным.

Иммунологическое определение можно применять для качественного и количественного определения антител, специфичных в отношении антигена-мишени, в биологическом образце, поскольку в случае таких меток, как ферменты, количество антитела, присутствующего в исследуемом образце, пропорционально испускаемому сигналу.

Антиген-мишень CPV прямо или опосредованно иммобилизован на твердом носителе. Под "твердым носителем" понимают, в частности, лунку планшета для микротитрования, магнитные частицы, не являющиеся магнитными частицы, колонку, матрикс, мембрану, стрип, волокнистую подложку из синтетических или натуральных волокон (например, материалов из стекла или на основе целлюлозы или термопластичных полимеров, таких как полиэтилен, полипропилен или полиэфир), полученную спеканием структуру, состоящую из материалов, содержащих частицы (например, стекла или различных термопластичных полимеров) или пленки из синтетической мембраны, состоящей, например, из нитроцеллюлозы или нейлона.

Иммобилизация антигена-мишени на указанном субстрате или носителе может достигаться за счет пассивного (например, ионных, гидрофобных связей) или ковалентного (например, в результате химической реакции между антигеном и носителем, напрямую или с участием связывающих веществ) взаимодействия. Согласно одному конкретному воплощению в качестве твердого носителя для иммуноферментного анализа (ИФА) используют твердый многолуночный планшет для микротитрования.

Согласно другому конкретному воплощению в качестве твердого носителя для иммунохроматографического анализа используют мембрану или стрип. Иммунохроматографический анализ на тест-полосках больше известен под английским названием "Lateral Flow Test".

В конкретном воплощении антиген-мишень прямо или опосредованно иммобилизован на носителе, таком как лунка планшета для микротитрования. Биологический образец, в котором предполагают наличие антител, специфичных к указанному антигену-мишени CPV, инкубируют с указанным антигеном-мишенью в течение периода времени и в условиях, подходящих для образования комплексов антиген/антитело. После промывания лунки для удаления не связанных с антигеном реагентов добавляют конъюгат, содержащий указанный связанный с меткой антиген-мишень и инкубируют в течение периода времени в условиях, подходящих для образования комплекса антиген/антитело/конъюгат. Определение указанных комплексов антиген/антитело/конъюгат в присутствии подходящего субстрата указывает на присутствие и/или количество специфических антител к указанному антигену-мишени в биологическом образце, предположительно содержащем их.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению изобретения способ иммунологического определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus* или *Carpiroxvirus*, предпочтительно роду *Carpiroxvirus*, в биологическом образце представляет собой иммуноферментный анализ (ИФА) с двумя антигенами, который выполняют на планшетах для микротитрования согласно следующим стадиям:

лунки планшета для микротитрования сенсibiliзируют очищенным антигеном CPV (*Carpiroxvirus*) или OPV (*Orthoroxvirus*);

в лунки добавляют исследуемые биологические образцы и контроли; антитела к CPV (OPV), если таковые присутствуют, образуют комплекс антитело-антиген;

затем планшеты промывают и в лунки добавляют конъюгат, очищенный антиген CPV, меченный пероксидазой (HRP). Он связывается со свободным Fab связанных сывороточных антител к CPV (OPV); после промывания для удаления избытка конъюгата добавляют раствор субстрата (например, тетраметилбензидина (ТМБ)) и затем останавливают реакцию добавлением раствора кислоты;

затем проводят считывание оптической плотности при 450 нм при помощи спектрофотометра.

Развивающаяся окраска зависит от количества специфических антител, присутствующих в исследуемом образце: в присутствии антител развивается голубое окрашивание раствора, который становится желтым после добавления стоп-реагента; тогда как в отсутствие антител окраска не развивается.

Набор.

Изобретение также относится к набору для качественного и/или количественного определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, роду *Pararoxvirus* или предпочтительно роду *Carpiroxvirus*, в биологическом образце, включающему:

(i) твердый носитель, сенсibiliзированный по меньшей мере одним первичным антигеном вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, роду *Pararoxvirus* или предпочтительно роду *Carpiroxvirus*, включающим по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок gP32 (gH3L) или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами,

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий по меньшей мере один вторичный антиген вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, роду *Pararoxvirus* или предпочтительно роду *Carpiroxvirus*, включающий по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок gP32 (gH3L) или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, и метку,

(iii) и, возможно, средство для проявления и определения наличия комплекса первичный анти-

ген/антитело/конъюгат.

Набор по изобретению также содержит по меньшей мере:

(iv) контроль, выбранный из положительного контроля, представляющий собой образец, содержащий антитела к CPV;

(v) отрицательный контроль, представляющий собой биологический образец, не содержащий антител к CPV,

и предпочтительно их смесь. Согласно одному конкретному воплощению первичный антиген и конъюгат содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) последовательности SEQ ID No: 1, последовательности SEQ ID No: 4, последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с последовательностью SEQ ID No: 1, последовательностью SEQ ID No: 4 или последовательностью SEQ ID No: 5 соответственно, или

б) пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 1, последовательности SEQ ID No: 4, последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами, а метка представляет собой фермент, предпочтительно пероксидазу.

Согласно одному конкретному и предпочтительному воплощению, в частности, для набора для качественного и/или количественного определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса рода *Carpinoxvirus*, первичный антиген и конъюгат содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: 1 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 1, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот SEQ ID No: 1 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами, а метка представляет собой фермент, предпочтительно пероксидазу.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген и конъюгат содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID No: 1, а метка представляет собой пероксидазу.

Согласно другому конкретному воплощению, в частности, для набора для качественного и/или количественного определения антитела, специфичного к антигену вируса коровьей оспы, первичный антиген и конъюгат содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: 4 (белка P32 вируса коровьей оспы, также известного как белок H3L) или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 4, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот SEQ ID No: 4, или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами, а метка представляет собой фермент, предпочтительно пероксидазу.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID No: 4, а метка представляет собой пероксидазу.

Согласно одному конкретному воплощению, в частности, для набора для качественного и/или количественного определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса оспы верблюдов, первичный антиген и конъюгат содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID No: 5 (белок P32 вируса оспы верблюдов, обозначаемого также белком H3L) или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с SEQ ID No: 5, или пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами, а метка представляет собой фермент, предпочтительно пероксидазу.

Согласно конкретному и предпочтительному воплощению первичный антиген и конъюгат содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID No: 5, а метка представляет собой пероксидазу.

Применения.

Изобретение также относится к применению способа определения или набора, описанных выше, для выявления и диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной вирусом, принадлежащим к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, *Pararoxvirus* или *Carpinoxvirus*, предпочтительно *Carpinoxvirus*, таких как вирус контактного нодулярного дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в биологическом образце, в частности, по меньшей мере через 2 или 3 месяца после инфицирования.

Животное может быть инфицированным независимо от развития клинических симптомов.

Таким образом, изобретение также относится к способу выявления и/или диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной вирусом, принадлежащим к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, *Pararoxvirus* или *Capripoxvirus*, предпочтительно *Capripoxvirus*, таких как вирус контагиозного нодулярного дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в биологическом образце, полученном у животного, предположительно инфицированного, включающему по меньшей мере одну стадию иммунологического определения специфического антитела к антигену P32 (H3L) указанного вируса, как описано выше в изобретении, и сравнение с контрольным образцом (неинфицированным).

Как указано выше, специалист в области техники будет способен выбрать белок P32 (синтетический или рекомбинантный, полноразмерный белок или фрагмент, обладающий антигенными свойствами) для применения в способе по изобретению для выявления и/или диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной заданным вирусом, в зависимости от семейства (рода) вируса-мишени, поиск которого осуществляют в исследуемых биологических образцах.

Таким образом, согласно конкретному и предпочтительному воплощению он будет использовать в способе по изобретению для выявления и/или диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной вирусом рода *Capripoxvirus*, белок P32 *Capripoxvirus*, в частности белок P32 вируса контагиозного нодулярного дерматита. Вирус контагиозного нодулярного дерматита проиллюстрирован SEQ ID No: 1.

Согласно другому конкретному воплощению он будет использовать в способе по изобретению для выявления и/или диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной таким вирусом как вирус коровьей оспы, белок H3L вируса коровьей оспы, в частности белок, проиллюстрированный последовательностью SEQ ID No 4.

Согласно другому конкретному воплощению он будет использовать в способе по изобретению для выявления и/или диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной таким вирусом, как вирус оспы верблюдов, белок H3L вируса оспы верблюдов, в частности белок, проиллюстрированный последовательностью SEQ ID No: 5. Предпочтительно способ определения по изобретению или набор, воплощающий его, применяют для мониторинга в течение времени вакцинации против вируса, относящегося к семейству *Poxviridae*, в частности к *Capripoxvirus*, таким как вирус контагиозного нодулярного дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в частности, по меньшей мере через 2-3 месяца после вакцинации.

Таким образом, изобретение также относится к способу мониторинга вакцинации животного против вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, *Pararoxvirus* или *Capripoxvirus*, предпочтительно *Capripoxvirus*, таких как вирус контагиозного нодулярного дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в биологическом образце, полученном у животного, предположительно вакцинированного, включающему по меньшей мере одну стадию иммунологического определения специфического антитела к антигену P32 (H3L) указанного вируса, как описано выше в изобретении, и сравнение с контрольным образцом (невакцинированным и неинфицированным).

Как указано выше, специалист в области техники будет способен выбрать белок P32 (синтетический или рекомбинантный, полноразмерный белок или фрагмент, обладающий антигенными свойствами) для применения в способе мониторинга вакцинации животного против заданного вируса, в зависимости от семейства (рода) вируса-мишени, поиск которого осуществляют в исследуемых биологических образцах.

Таким образом, согласно конкретному и предпочтительному воплощению он будет использовать в способе мониторинга вакцинации животного против вируса рода *Capripoxvirus*, белок P32 *Capripoxvirus*, в частности белок P32 вируса контагиозного нодулярного дерматита, проиллюстрированного последовательностью SEQ ID No: 1.

Согласно другому конкретному воплощению он будет использовать в способе мониторинга вакцинации животного против такого вируса, как вирус коровьей оспы, белок H3L вируса коровьей оспы, в частности белок, проиллюстрированный последовательностью SEQ ID No: 4.

Согласно другому конкретному воплощению он будет использовать в способе мониторинга вакцинации животного против такого вируса, как вирус оспы верблюдов, белок H3L вируса оспы верблюдов, в частности белок, проиллюстрированный последовательностью SEQ ID No: 5.

Предпочтительно способ иммунологического определения по изобретению с двумя антигенами может быть осуществлен в любой серологической лаборатории, позволяет получить результаты в течение менее чем 3 ч, использует объективные критерии (подсчет по значениям оптической плотности) для индивидуальной интерпретации исследованных образцов, поддается стандартизации благодаря применению в каждом анализе положительного контроля, подходит для исследования большого числа образцов и поддается автоматизации.

Далее изобретение будет описано более подробно на примерах, которые не являются исчерпывающими.

#### **Описание примеров осуществления изобретения**

Пример 1. Оценка различных белков и методик для выявления инфекции и/или вакцинации против вируса контагиозного нодулярного дерматита (LSD).

### 1.1. Получение первичного антигена 1 (белок P32).

В качестве антигена CPV (от лат. *Carpіoxvirus*) использовали рекомбинантный белок P32 (rP32) вируса контагиозного нодулярного дерматита.

Этот белок получали посредством культивирования бактерий (BL21 DH5), трансформированных плазмидой pET 20b+(Ref No: 69739-3, NOVAGEN), содержащих последовательность гена, кодирующего белок P32 CPV (SEQ ID No: 1), описанный выше. Указанная плазида также содержит ген устойчивости к ампициллину для отбора трансформированных бактерий и позволяет присоединять к CPV P32 гексагистидиновую метку (His-His-His-His-His-His) для обеспечения аффинной очистки.

После культивирования бактериальный осадок, полученный после центрифугирования при 5000 g в течение 15 мин, собирают в PBS (фосфатно-солевой буфер) с pH 7. Затем бактерии, содержащие антиген CPV, лизируют путем ультразвукового воздействия и циклов замораживания/оттаивания. После центрифугирования при 15000 g в течение 30 мин осадок, содержащий антиген CPV, собирают в буфере PBS+8 М мочевины с pH 8,5, фильтруют через фильтр 0,45 мкм и затем очищают аффинной хроматографией. Фракции, содержащие антиген CPV, идентифицируют при помощи электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия. Затем антиген подвергают ренатурации посредством последовательных стадий диализа против буферов, содержащих мочевины в убывающих концентрациях (PBS с 4М мочевиной, затем с 2 М мочевиной, затем с 1 М мочевиной, затем только PBS). Затем для достижения максимально возможной чистоты осуществляют следующую стадию очистки посредством пространственно-эксклюзионной хроматографии. Полученную таким образом наиболее чистую фракцию CPV rP32 используют и для сенсibilизации полистироловых планшетов, и в качестве конъюгата для ИФА в концентрациях от 0,1 до 10 мкг/мл.

### 1.2. Получение других первичных антигенов 1 (белки A33 и B5).

Рекомбинантные белки rA33 и rB5 of CPV получали таким же способом, как и rP32, используя плазмиду pET 20b+(Ref No: 69739-3, NOVAGEN), содержащую либо белок A33 (SEQ ID NO: 2) контагиозного нодулярного дерматита, либо белок B5 (SEQ ID NO: 3) контагиозного нодулярного дерматита.

### 1.3. Получение конъюгатов.

Для применения белка в качестве конъюгата в иммунологическом определении по изобретению с двумя антигенами rP32 контагиозного нодулярного дерматита конъюгировали с пероксидазой (HRP) (Horse Radish peroxidase, ROCHE) согласно способу, описанному Nakane & Kawaoi (1974, J. Histochem. Cytochem. 22: 1084-1091).

Для непрямых тестов (ИФА) использовали конъюгат, представлявший собой поликлональное антитело (Pab) коровы к IgG (ref A10-102P, Bethyl Laboratories, USA), или антитело козы к IgG (ref A50-100P, Bethyl Laboratories, USA), или антитело овцы к IgG (ref A130-101P, Bethyl Laboratories, USA).

### 1.4. Приготовление образцов.

Для сравнения характеристик (чувствительность, специфичность) различных тестов (непрямого ИФА и теста с двумя антигенами) для определения антител к CPV использовали панель, состоящую из биологических образцов (предположительно содержащих антитела к CPV), а также положительные и отрицательные образцы.

Положительные образцы.

Использовали следующие положительные образцы:

образец № 1: сыворотка коров, инфицированных в эксперименте вирусом LSD, собранная через 37 суток после инфицирования;

образец № 2: сыворотка коров, вакцинированных в эксперименте (собранная через 50 суток после вакцинации), затем инфицированных/протестированная (собранная через 26 суток после инфицирования);

образец № 3: сыворотка невакцинированных коров, инфицированных в эксперименте, собранная через 26 суток после инфицирования;

образец № 15: сыворотка коров, вакцинированных коммерческой аттенуированной вакциной (штамм Neethling), затем инфицированных, собранная через 6 недель после инфицирования. Предположительно положительные образцы, подлежащие анализу:

образцы сыворотки (№ 4 - 14), полученные у 11 коров молочной породы, иммунизированных против вируса LSD коммерческой аттенуированной вакциной (штамм Neethling), собранная через пять месяцев после вакцинации.

Отрицательные образцы.

32 отрицательных образца из свободной от заболевания зоны (отсутствие *Carpіoxvirus*), где вакцинация не практикуется (Франция) были протестированы и служили отрицательными контрольными образцами.

Для каждого исследованного белка получали пороговое значение позитивности путем умножения средней оптической плотности отрицательных контрольных образцов на три (пороговое значение=средняя оптическая плотность отрицательного контроля×3).

### 1.5. Протокол исследования.

#### 1.5.1. Анализ в монослое в присутствии иммунопероксидазы.

Эпителиальные клетки почки теленка Мадин-Дарби (MDBK) культивировали в 96-луночных планшетах для микротитрования. После однократного промывания сбалансированным солевым раствором Хенкса клетки инокулировали вирусом LSD при множественности заражения, равной 1. Затем планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере с содержанием 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч, фиксировали в холодном ацетоне-этаноле в течение 20 мин, закрывали и хранили при -20°C до применения (обычно в течение 2 месяцев с момента подготовки). Перед добавлением образцов планшеты для анализа в монослое в присутствии иммунопероксидазы однократно промывали фосфатным солевым буфером (PBS pH 7,2). Затем добавляли серию двукратных разведений каждого образца (по 2 лунки на каждое разведение), затем инкубировали в течение 45 мин при 37°C. После 3-кратного промывания PBS во все лунки добавляли по 50 мкл (0,5 мкг/мл) антивидового поликлонального антитела, указанного выше, конъюгированного с пероксидазой, и инкубировали планшеты при 37°C в течение 45 мин.

После 3 промывок добавляли 50 мкл преципитирующего субстрата TMB (SIGMA-ALDRICH), после чего реакцию проводили в течение 20 мин, затем однократно промывали лунки PBS и исследовали под световым микроскопом.

#### 1.5.2. Тест нейтрализации вируса.

1) сыворотки инактивировали в течение 30 мин в водяной бане при 56°C;

2) готовили серию двукратных разведений исследуемой сыворотки в среде для культивирования клеток, начиная с неразведенной сыворотки (смешивание с равным объемом суспензии вируса соответствует стадии нейтрализации с разведением 1/2). Разведения готовили в 96-луночном плоскодонном планшете, в оптимальном варианте используя 3 лунки на разведение и 25 мкл на лунку. В анализ также включали положительные и отрицательные контрольные сыворотки;

3) в каждую лунку добавляли по 25 мкл матричного раствора вируса LSD в разведении, выполненном в культуральной среде и рассчитанном таким образом, чтобы обеспечить 100 TCID<sub>50</sub> (доза вируса, инфицирующая 50% клеточной культуры) на лунку. Для каждого разведения вирус добавляли в 2/3 лунок, содержащих сыворотку. Третья лунка служила контролем, содержащим только сыворотку, и вместо вируса в нее добавляли 25 мкл культуральной среды;

4) оставшийся вирус титровали, выполняя четыре 10-кратных разведения, используя 25 мкл на лунку и по меньшей мере 4 лунки на разведение; в каждую лунку добавляли по 25 мкл культуральной среды, чтобы скомпенсировать отсутствие исследуемой сыворотки;

5) планшеты быстро встряхивали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере с содержанием 5% CO<sub>2</sub>;

6) в каждую лунку добавляли 100 мкл, например, суспензии клеток MDBK (эпителиальные клетки почки теленка Мадин-Дарби) или ОА3. TS (линия клеток семенников барана) в концентрации 2×10<sup>6</sup> клеток/мл;

7) планшеты инкубировали в течение 3-14 суток при 37°C в атмосфере с содержанием 5% CO<sub>2</sub>;

8) планшеты считывали под микроскопом на предмет цитопатического эффекта.

Данный тест валидировали путем верификации титра вируса (который должен иметь значение 100 TCID<sub>50</sub> с допустимыми значениями в диапазоне от 50 до 200 TCID<sub>50</sub>) и контрольных сывороток. Стандартные положительные сыворотки должны иметь значение, отклоняющееся не более чем на 0,3 log<sub>10</sub> от указанного среднего значения. Считывание показаний для каждого разведения исследуемой сыворотки следует производить против лунок, содержащих только контрольную сыворотку, чтобы отличить цитопатический эффект от цитотоксического эффекта, вызванного сывороткой или контаминацией;

9) результаты для исследованных сывороток определяют методом Спирмана-Карбера как разведение сыворотки, нейтрализующее вирус в 50% лунок;

10) отрицательные сыворотки не должны вызывать никакой нейтрализации при наименьшем из исследуемых разведений (т.е. с неразведенной сывороткой, что эквивалентно разведению 1/2 на стадии нейтрализации).

#### 1.5.3. Непрямой ИФА (белки P32, A33 и B5).

96-луночные полистироловые планшеты инкубировали с белком гP32, или белком гA33, или белком LSD B5 в течение 18 ч при +4°C в карбонатном буфере с добавлением БСА (бычьего сывороточного альбумина), pH 9,6. Затем планшеты промывали буфером PBS, содержащим 0,05% Tween® 20, pH 7,4 и затем блокировали в течение 2 ч при комнатной температуре буфером PBS, содержащим 2% БСА и 0,05% Tween® 20, pH 7,4. Планшеты, которые не использовали немедленно, помещали в индивидуальные пакеты и высушивали.

Затем в планшеты добавляли исследуемые сыворотки в разведении 1:100 в буфере PBS, содержащем 2% БСА и 0,05% Tween® 20, pH 7,4, и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре.

После 3-кратного промывания буфером PBS, содержащим 0,05% Tween® 20, pH 7,4, планшеты инкубировали с поликлональным антивидовым антителом, конъюгированным с пероксидазой, в заданном разведении в течение 30 мин при комнатной температуре.

По окончании инкубации планшеты вновь промывали буфером PBS, содержащим 0,05% Tween® 20, pH 7,4, и проводили реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре после добавления суб-

страта (ТМВ: Тетраметилбензидин). После остановки реакции добавлением 0,5 М серной кислоты считывали оптическую плотность при 450 нм при помощи считывающего устройства для планшетов.

#### 1.5.4. Тест с двумя антигенами.

96-луночные полистироловые планшеты инкубировали с белком гР32 LSD в течение 18 ч при комнатной температуре в карбонатном буфере с добавлением БСА (бычьего сывороточного альбумина), рН 9,6. Затем планшеты промывали буфером PBS, содержащим 0,05% Tween® 20, рН 7,4 и затем блокировали в течение 2 ч при комнатной температуре буфером PBS, содержащим 2% БСА и 0,05% Tween® 20, рН 7,4. Планшеты, которые не использовали немедленно, помещали в индивидуальные пакеты и высушивали. Затем в планшеты добавляли исследуемые сыворотки в разведении 1/2 в буфере PBS, содержащем 2% БСА и 0,05% Tween® 20, рН 7,4, и инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре.

После 3-кратного промывания буфером PBS, содержащим 0,05% Tween® 20, рН 7,4, планшеты инкубировали с конъюгатом гР32-HRP в заданном разведении в течение 30 мин при комнатной температуре.

По окончании инкубации планшеты вновь промывали пять раз буфером PBS, содержащим 0,05% Tween® 20, рН 7,4, планшеты и проводили реакцию в течение 15 мин при комнатной температуре после добавления субстрата (ТМВ: Тетраметилбензидин). После остановки реакции добавлением 0,5 М серной кислоты считывали оптическую плотность при 450 нм при помощи считывающего устройства для планшетов.

#### 1.6 Результаты.

##### 1.6.1. Чувствительность.

##### 1.6.1.1. Анализ в монослое в присутствии иммунопероксидазы (сравнение):

Таблица 1

Образцы	Описание образцов	Статус
Образец №1	Инфицирован в эксперименте (через 37 суток после инфицирования)	<u>Положительный</u>
Образец №2	Вакцинирован (через 50 суток после вакцинации) и инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<u>Положительный</u>
Образец №3	Инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<u>Положительный</u>
Образец №4 Образец №5 Образец №6 Образец №7 Образец №8 Образец №9 Образец №10 Образец №11 Образец №12 Образец №13 Образец №14	Вакцинирован (через 5 месяцев после вакцинации)	Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный
Образец №15	Вакцинирован и инфицирован естественным образом (через 6 недель после инфицирования)	Отрицательный

Данные результаты свидетельствуют, что технология анализа в монослое в присутствии иммунопероксидазы не выявляет антитела к CPV в биологических образцах, вакцинированных 5 месяцев назад.

##### 1.6.1.2. Тест нейтрализации вируса (сравнение).

Таблица 2

Образцы	Описание образцов	Статус
Образец №1	Инфицирован в эксперименте (через 37 суток после инфицирования)	<u>Положительный</u>
Образец №2	Вакцинирован (через 50 суток после вакцинации) и инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<u>Положительный</u>
Образец №3	Инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<u>Положительный</u>
Образец №4 Образец №5 Образец №6 Образец №7 Образец №8 Образец №9 Образец №10 Образец №11 Образец №12	Вакцинирован (через 5 месяцев после вакцинации)	<u>Положительный</u> Отрицательный Отрицательный Отрицательный <u>Положительный</u> Отрицательный Отрицательный Отрицательный Отрицательный
Образец №13 Образец №14		Отрицательный <u>Положительный</u>
Образец №15	Вакцинирован и инфицирован естественным образом (через 6 недель после инфицирования)	Отрицательный

Данные результаты свидетельствуют, что тест нейтрализации вируса не эффективен для выявления

антител к CPV в биологических образцах от животных, вакцинированных 5 месяцев назад (<30% положительных результатов в панели исследованных образцов).

#### 1.6.1.3. Непрямой ИФА на основе гB5 (сравнение).

Для ИФА на основе гB5 пороговое значение, выше которого результаты считали положительными, составляло 0,514. Образцы, считавшиеся положительными, выделены жирным шрифтом, курсивом и подчеркнуты.

Таблица 3

Образцы	Описание образцов	Оптическая плотность при 450 нм	Статус
Образец №1	Инфицирован в эксперименте (через 37 суток после инфицирования)	<b><u>1,985</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №2	Вакцинирован (через 50 суток после вакцинации) и инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<b><u>0,680</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №3	Инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	0,194	Отрицательный
Образец №4	Вакцинирован (через 5 месяцев после вакцинации)	0,480	Отрицательный
Образец №5		0,457	Отрицательный
Образец №6		<b><u>0,857</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №7		<b><u>0,542</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №8		0,211	Отрицательный
Образец №9		0,211	Отрицательный
Образец №10		<b><u>0,633</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №11		0,468	Отрицательный
Образец №12		0,357	Отрицательный
Образец №13		<b><u>0,831</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №14	0,450	Отрицательный	
Образец №15	Вакцинирован и инфицирован естественным образом (через 6 недель после инфицирования)	0,157	Отрицательный

Результаты свидетельствуют, что технология непрямого ИФА с рекомбинантным белком гB5 позволяла выявить только 36% положительных результатов в биологических образцах от животных, вакцинированных 5 месяцев назад.

Результаты также свидетельствуют, что данная технология не выявила 2 из 3 инфицированных образцов, что свидетельствует об ограниченной чувствительности технологии.

#### 1.6.1.4. Непрямой ИФА на основе гA33 (сравнение).

Для ИФА на основе гA33 пороговое значение, выше которого результаты считали положительными, составляло 0,277. Образцы, считавшиеся положительными, выделены жирным шрифтом, курсивом и подчеркнуты.

Таблица 4

Образцы	Описание образцов	Оптическая плотность при 450 нм	Статус	
Образец №1	Инфицирован в эксперименте (через 37 суток после инфицирования)	<b><u>3,399</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №2	Вакцинирован (через 50 суток после вакцинации) и инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<b><u>1,379</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №3	Инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<b><u>1,147</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №4	Вакцинирован (через 5 месяцев после вакцинации)	0,207	Отрицательный	
Образец №5		0,068	Отрицательный	
Образец №6		<b><u>0,299</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №7		0,192	Отрицательный	
Образец №8		<b><u>1,589</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №9		0,092	Отрицательный	
Образец №10		<b><u>0,560</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №11		0,078	Отрицательный	
Образец №12			0,229	Отрицательный
Образец №13			0,166	Отрицательный
Образец №14		0,128	Отрицательный	
Образец №15	Вакцинирован и инфицирован естественным образом (через 6 недель после инфицирования)	0,227	Отрицательный	

Результаты свидетельствуют, что технология непрямого ИФА с рекомбинантным белком гA33 еще

менее надежна, чем с антигеном гВ5, поскольку позволяла выявить только 27% положительных образцов в биологических образцах от животных, вакцинированных месяц назад.

#### 1.6.1.5. Непрямой ИФА на основе гР32 (сравнение):

Для ИФА на основе гР32 пороговое значение, выше которого результаты считали положительными, составляло 0,282. Образцы, считавшиеся положительными, выделены жирным шрифтом, курсивом и подчеркнуты.

Таблица 5

Образцы	Описание образцов	Оптическая плотность при 450 нм	Статус
Образец №1	Инфицирован в эксперименте (через 37 суток после инфицирования)	<b><u>3,099</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №2	Вакцинирован (через 50 суток после вакцинации) и инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<b><u>1,334</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №3	Инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<b><u>0,920</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №4	Вакцинирован (через 5 месяцев после вакцинации)	<b><u>0,290</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №5		0,125	Отрицательный
Образец №6		0,222	Отрицательный
Образец №7		<b><u>0,287</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №8		<b><u>0,436</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №9		0,147	Отрицательный
Образец №10		0,270	Отрицательный
Образец №11		0,166	Отрицательный
Образец №12		0,166	Отрицательный
Образец №13		0,155	Отрицательный
Образец №14		0,120	Отрицательный
Образец №15	Вакцинирован и инфицирован естественным образом (через 6 недель после инфицирования)	<b><u>0,291</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>

Данные результаты свидетельствуют, что технология непрямого ИФА с рекомбинантным белком гР32 позволяла выявить только 27% положительных результатов в биологических образцах от животных, вакцинированных 5 месяцев назад. Данный тест позволил выявить образец №15, который не был выявлен при помощи теста нейтрализации вируса, анализа в монослое в присутствии иммунопероксидазы и непрямым тестом на основе гВ5 и гА33.

#### 1.6.1.6. ИФА с двумя антигенами на основе гР32 (изобретение).

Для ИФА с двумя антигенами на основе гР32 пороговое значение, выше которого результат считали положительным, составляло 0,235.

Таблица 6

Образцы	Описание образцов	Оптическая плотность при 450 нм	Статус	
Образец №1	Инфицирован в эксперименте (через 37 суток после инфицирования)	<b><u>3,524</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №2	Вакцинирован (через 50 суток после вакцинации) и инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<b><u>2,214</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №3	Инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	<b><u>2,965</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №4	Вакцинирован (через 5 месяцев после вакцинации)	<b><u>2,860</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №5		0,195	Отрицательный	
Образец №6		<b><u>1,905</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №7		<b><u>1,498</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №8		<b><u>2,986</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №9		0,121	Отрицательный	
Образец №10		<b><u>2,346</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №11		0,125	Отрицательный	
Образец №12		<b><u>0,954</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №13		<b><u>0,931</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>	
Образец №14			<b><u>0,657</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>
Образец №15		Вакцинирован и инфицирован естественным образом (через 6 недель после инфицирования)	<b><u>2,815</u></b>	<b><u>Положительный</u></b>

Данные результаты неожиданно показали, что технология ИФА с двумя антигенами по изобретению на основе гР32 позволяла выявить 73% положительных образцов в биологических образцах от животных, вакцинированных 5 месяцев назад, что существенно больше по сравнению с группой опробованных методов.

Кроме того, данный тест также позволил выявить образец №15, который не был выявлен в тесте

нейтрализации вируса, ТРМА и в непрямых тестах на основе гВ5 и гА33. Эти две детали подтверждают, что данный тест с применением гР32 в качестве антигена-кандидата CPV и технологии ИФА с двумя антигенами оказалась более чувствительной и наиболее специфичной из всех оцениваемых тестов.

Для подведения итогов все полученные результаты обобщены в табл. 7 ниже.

Таблица 7

	Образцы	Описание образцов	Непрямой ИФА Белок В5	Непрямой ИФА Белок А33	Непрямой ИФА Белок р32	ИФА с двумя антигенами на основе р32 (изобретение)
чувствительность	Образец №1	Инфицирован (через 37 суток после инфицирования)	+	+	+	+
	Образец №2	Вакцинирован (через 50 суток после вакцинации) и инфицирован в эксперименте (через 29 суток после инфицирования)	+	+	+	+
	Образец №3	Инфицирован (через 29 суток после инфицирования)	-	+	+	+
	Образцы №4-14	Вакцинирован (через 5 месяцев после вакцинации)	3+/11	3+/11	3+/11	8+/11
	Образец №15	Вакцинирован, затем инфицирован естественным образом (через 6 недель после инфицирования)	-	-	+	+
специфичность	32 отрицательных образца	Сыворотки из зоны, не являющейся эндемической, не вакцинированные	27/32	28/32	29/32	32/32

Неожиданно, способ иммунологического определения с двумя антигенами (гР32) по изобретению позволяет достичь наилучших результатов, выражающихся показателями специфичности и чувствительности, по сравнению с другими протестированными методами и/или другими кандидатными антигенами CPV, демонстрируя непревзойденные характеристики в отношении биологических образцов спустя более 5 месяцев после вакцинации, что делает его методом выбора, выявляющим признаки контакта животного с вирусом семейства CPV, таким как контагиозный нодулярный дерматит, независимо от того, произошел ли контакт при вакцинации или при естественном заражении. Указанные результаты подтверждены результатами полевых испытаний на более крупных стадах животных, согласно следующему протоколу:

получали образцы от животных из 2 различных стад, вакцинированных коммерческой вакциной (MSD Lumpyvax® (полевой аттенуированный штамм вируса LSD, штамм SIS);

48 образцов получали через 58 суток после вакцинации, а другие 48 образцов - через 87 суток после вакцинации.

Эти сыворотки исследовали параллельно на рекомбинантных белках, описанных выше (пример 1) в непрямом тесте (сравнение) и согласно способу с двумя антигенами по изобретению, как описано в примере 1.

Результаты приведены в табл. 8 ниже.

Таблица 8

		ИФА с двумя антигенами (конъюгат HRP с рекомбинантным р32, описанный в Примере 1.1) изобретение	Непрямой ИФА (конъюгат HRP с поликлональными антителами к IgG быка, описанный в Примере 1.3) сравнение			ИФА с двумя антигенами (конъюгат HRP с рекомбинантным А33, описанный в Примере 1.2) сравнение
Планшет, сенсibilизированный белком		р32	р32	А33	В5	А33
48 вакцинированных сывороток 58 суток после вакцинации	Количество положительных	36	15	29	22	22
	% положительных	75%	31%	60%	46%	46%
48 вакцинированных сывороток 87 суток после вакцинации	Количество положительных	30	13	32	20	27
	% положительных	63%	27%	67%	42%	56%
Специфичность (n = 128)		99,7%	100%	96%	86,2%	95%

Эти результаты подтверждают, что

непрямой тест (сравнение) с применением вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой, выявляет только 31% вакцинированных животных в отличие от теста с применением белка Р32 согласно способу по изобретению, который позволяет повысить процент выявления до 75%, при сохранении специфичности на уровне, который специалисты в области техники считают очень высоким (>99,5%); хотя белок А33 также имеет определенный диагностический потенциал в непрямом тесте (выявление от 60 до 67% положительных образцов), несмотря на более низкую специфичность 96% (которая может считаться слишком низкой для коммерческого диагностического применения) применение указанного белка А33 согласно способу по изобретению (что означает и в качестве сенсibilизирующего антигена, и в качестве

конъюгата с пероксидазой) не показало улучшения чувствительности в отличие от того, что наблюдалось с белком P32.

Таким образом, данные результаты подтверждают, что технический эффект, заключающийся в улучшении чувствительности и специфичности теста, обусловлен как выбором белка P32 среди различных имеющихся в распоряжении белков, так и выбором способа с двумя антигенами среди доступных способов.

Пример 2. Подтверждение специфичности теста в отношении рода *Capripoxvirus*.

2.1 Исследование сывороток, происходящих из зоны, зараженной *Parapoxvirus* (Греция).

Исследовали сыворотки 8 животных из зоны, инфицированной вирусом папулезного стоматита (Греция), при помощи ИФА с двумя антигенами р32 по изобретению, как описано в примере 1 и параллельно при помощи референтного метода иммунодиффузии в агаризованной среде, иначе именуемой методикой иммунодиффузии в агарозном геле.

Результаты приведены в табл. 9 ниже.

Таблица 9

Номер образца	Результаты иммунодиффузии в агарозном геле (референтный, сравнение)	Результаты ИФА с двумя антигенами р32 (изобретение)
1	Положительный	Отрицательный
2	Положительный	Отрицательный
3	Положительный	Отрицательный
4	Отрицательный	Отрицательный
9	Слабоположительный	Отрицательный
13	Отрицательный	Отрицательный
22	Положительный	Отрицательный
24	Отрицательный	Отрицательный

Из этих 8 сывороток 5 оказались положительными, а 3 оказались отрицательными по результатам иммунодиффузии в агарозном геле. Напротив, по результатам ИФА с двумя антигенами р32 *Capripoxvirus* все 8 сывороток оказались отрицательными. Эти результаты показывают, что способ по изобретению отличается отсутствием перекрестной реакции между P32 *Capripoxvirus* и *Parapoxvirus*, что свидетельствует в пользу лучшей селективности и межвидовой специфичности способа по изобретению.

2.2 Исследование сывороток, инфицированных вирусом бычьего папулезного стоматита (*Parapoxvirus*) (FLI, Германия):

Сыворотки 5 животных, демонстрирующих клинические признаки естественного заражения вирусом бычьего папулезного стоматита (*Parapoxvirus*), собирали в 2 различных момента времени после инфицирования (t1 и t2) с интервалом 21 день и исследовали параллельно методом иммунофлуоресценции, ПЦР и ИФА с двумя антигенами р32 по изобретению, как описано в примере 1. Эти результаты показаны в табл. 10 ниже.

Таблица 10

Исследование сывороток животных, инфицированных вирусом стоматита	Результаты иммунофлуоресценции (референтные, сравнение)		Результаты ОТ-ПЦР (референтные, сравнение)	Результаты ИФА с двумя антигенами р32 (изобретение)
	t1	t2	t2	t2
13	Слабоположительный	Слабоположительный	Положительный	Отрицательный
14	Отрицательный	Положительный	Положительный	Отрицательный
15	Положительный	Положительный	Положительный	Отрицательный
16	Отрицательный	Положительный	Положительный	Отрицательный
17	Отрицательный	Положительный	Положительный	Отрицательный

Пять сывороток оказались положительными по результатам ПЦР и иммунофлуоресценции, но отрицательными по результатам ИФА с двумя антигенами р32. Эти результаты свидетельствуют, что способ по изобретению отличается отсутствием перекрестной реакции между P32 *Capripoxvirus* и *Parapoxvirus*, что свидетельствует в пользу лучшей селективности и межвидовой специфичности способа по изобретению по сравнению с другими существующими способами.

Эти результаты свидетельствуют, что антисыворотки, содержащие антитела к *Parapoxvirus*, происходящие от животных, из организма которых был выделен вирус, охарактеризованный ПЦР, и антисыворотки, реагирующие с вирусами указанного семейства по данным непрямо́й иммунофлуоресценции, не вступают в реакцию с вирусом *Capripoxvirus* в анализе по изобретению. Эти дополнительные детали подтверждают, что P32 действительно является специфичным в отношении исследуемого семейства, а, следовательно, тест с применением P32 вируса семейства *Orthopoxvirus* (вируса коровьей оспы и вируса оспы верблюдов) будет специфичным в отношении данного семейства *Orthopoxvirus*.

Пример 3. Пример набора по изобретению.

Набор по изобретению может содержать следующие компоненты и соединения:

микропланшеты, сенсibilизированные очищенным антигеном P32 CPV (или H3L OPV);

конъюгат;

положительный контроль, представляющий собой образец, содержащий антитела к CPV (OPV);

отрицательный контроль, представляющий собой биологический образец, не содержащий антител к CPV (OPV);

буфер для разведения при необходимости (для образцов, конъюгата);

растворы для промывания, субстрат (проявитель) и раствор для остановки реакции.

Согласно одному конкретному воплощению набор по изобретению содержит

96-луночные полистироловые планшеты для микротитрования, сенсibilизированные очищенным антигеном CPV, содержащим синтетический или рекомбинантный белок rP32 (rH3L) или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами;

конъюгат, содержащий синтетический или рекомбинантный белок rP32 (rH3L) или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, и пероксидазу в качестве метки;

положительный контроль, представляющий собой образец, содержащий антитела к CPV (OPV);

отрицательный контроль, представляющий собой биологический образец, не содержащий антител к CPV (OPV);

буфер для разведения при необходимости (для образцов, конъюгата);

растворы для промывания, субстрат (проявитель) и раствор для остановки реакции.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ иммунологического определения антитела, специфичного в отношении антигена вируса, принадлежащего к семейству *Rovviridae*, в частности к роду *Orthorovirus*, роду *Pararovirus* или предпочтительно роду *Sarigrovirus*, в биологическом образце, включающий следующие стадии:

(i) приведение в контакт по меньшей мере одного первичного антигена, содержащего по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок rP32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, с биологическим образцом, который предположительно содержит указанное антитело, специфичное к указанному первичному антигену, в условиях, обеспечивающих образование комплекса первичный антиген/антитело;

(ii) добавление по меньшей мере одного конъюгата, содержащего по меньшей мере один вторичный антиген, содержащий синтетический или рекомбинантный белок rP32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, и метку, в условиях, обеспечивающих образование комплекса первичный антиген/антитело/конъюгат; и

(iii) детектирование указанного комплекса первичный антиген/антитело/конъюгат.

2. Способ иммунологического определения по п.1, где первичный антиген и конъюгат содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) последовательности SEQ ID No: 1, последовательности SEQ ID No: 4, последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с последовательностью SEQ ID No: 1, последовательностью SEQ ID No: 4 или последовательностью SEQ ID No: 5 соответственно, или

б) пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 1, последовательности SEQ ID No: 4, последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами.

3. Способ иммунологического определения по п.1 или 2, где указанный биологический образец выделен из образца крови, сыворотки, плазмы, молока, слюны, мокроты, цереброспинальной жидкости или экссудатов ткани, кала, предпочтительно образца сыворотки или плазмы.

4. Способ иммунологического определения по любому из пп.1-3, где указанный биологический образец представляет собой образец из организма животного любого биологического вида, чувствительного к вирусу, относящемуся к семейству *Rovviridae*, в частности млекопитающего, предпочтительно выделенного из группы, состоящей из крупного рогатого скота, овец и коз.

5. Способ иммунологического определения по любому из пп.1-4, где указанная метка выбрана из группы, состоящей из фермента, флуоресцентного соединения или флуорофора, (хеми)люминесцентного соединения, радиоактивного элемента, частицы коллоидного золота или латекса, предпочтительно фермента, более предпочтительно фермента, выбранного из пероксидазы и щелочной фосфатазы.

6. Способ иммунологического определения по любому из пп.1-5, где указанное иммунологическое определение представляет собой иммунохроматографический анализ или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), предпочтительно твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

7. Набор для качественного и(или) количественного определения антитела, специфичного в отно-

шении антигена вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, роду *Pararoxvirus* или предпочтительно роду *Carpiroxvirus*, в биологическом образце, содержащий:

(i) твердый носитель, сенсibilизированный по меньшей мере одним первичным антигеном вируса, принадлежащего семейству *Poxviridae*, в частности роду *Orthoroxvirus*, роду *Pararoxvirus* или предпочтительно роду *Carpiroxvirus*, содержащий по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок гР32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами,

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий вторичный антиген вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, роду *Pararoxvirus* или предпочтительно роду *Carpiroxvirus*, включающий по меньшей мере один синтетический или рекомбинантный белок гР32 или его пептидный фрагмент, обладающий антигенными свойствами, и метку,

(iii) и возможно, средство для проявления и обнаружения присутствия комплекса первичный антиген/антитело/конъюгат.

8. Набор по п.7, в котором первичный антиген и конъюгат содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) последовательности SEQ ID No: 1, последовательности SEQ ID No: 4, последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95% с последовательностью SEQ ID No: 1, последовательностью SEQ ID No: 4 или последовательностью SEQ ID No: 5, или

б) пептидного фрагмента, обладающего антигенными свойствами, по меньшей мере из 10 аминокислот последовательности SEQ ID No: 1, последовательности SEQ ID No: 4, последовательности SEQ ID No: 5 или последовательности, демонстрирующей идентичность по меньшей мере 90%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 95% с указанным пептидным фрагментом, обладающим антигенными свойствами, а метка представляет собой фермент, предпочтительно пероксидазу.

9. Применение способа иммунологического определения по любому из пп.1-6 для выявления и диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной вирусом, принадлежащим к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, *Pararoxvirus* или *Carpiroxvirus*, предпочтительно *Carpiroxvirus*, таким как вирус контагиозного нодулярного (узелкового) дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в биологическом образце, в частности, по меньшей мере через 2-3 месяца после инфицирования.

10. Применение набора по п.7 или 8 для выявления и диагностирования *in vitro* инфекции, вызванной вирусом, принадлежащим к семейству *Poxviridae*, в частности к роду *Orthoroxvirus*, *Pararoxvirus* или *Carpiroxvirus*, предпочтительно *Carpiroxvirus*, таким как вирус контагиозного нодулярного (узелкового) дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в биологическом образце, в частности, по меньшей мере через 2-3 месяца после инфицирования.

11. Применение способа иммунологического определения по любому из пп.1-6 для мониторинга с течением времени вакцинации против вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности роду *Carpiroxvirus*, такого как вирус контагиозного нодулярного (узелкового) дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в частности, по меньшей мере через 2-3 месяца после вакцинации.

12. Применение набора по п.7 или 8 для мониторинга с течением времени вакцинации против вируса, принадлежащего к семейству *Poxviridae*, в частности роду *Carpiroxvirus*, такого как вирус контагиозного нодулярного (узелкового) дерматита, вирус оспы коз и вирус оспы овец, в частности, по меньшей мере через 2-3 месяца после вакцинации.

