

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МИКРОПРОБИРКИ — ПЕРСПЕКТИВНАЯ ОСНОВА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ АНТИТЕЛ ИММУНОЗАХВАТА НА ПРИМЕРЕ SARS-COV-2

Е. О. Рубальский^{1,2}✉, Р. А. Абдрахманова¹, Г. Р. Баева¹, Т. С. Рубальская³, М. В. Лазыко¹, С. В. Поройский¹, Д. В. Щебляков⁴, И. А. Фаворская⁴, В. А. Гушчин^{4,5,6}

¹ Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Астрахань, Россия

² Российский университет медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

⁴ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Иммунозахват антителами на твердой фазе является важным инструментом в иммунологических исследованиях, но традиционные полистироловые планшеты подвержены деформации при термоциклировании и перекрестной контаминации образцов, что снижает точность и воспроизводимость при включении в исследование молекулярно-генетических методов. Разработка альтернативных решений, таких как модифицированные полипропиленовые пробирки с полистироловым покрытием, позволяет устранить эти ограничения. Целью исследования было создать и оценить эффективность нового подхода к иммунозахвату SARS-CoV-2 с использованием модифицированных пробирок. Для анализа использовали моноклональные антитела P2C5 и R107, а также инактивированные штаммы ГК2020/1 (Ухань) и hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (Омикрон). Иммуобилизацию антител, сорбцию вирусных частиц и выделение РНК проводили с применением модифицированных пробирок, стандартных планшетов и пробирок без покрытия. Основные результаты показали, что модифицированные пробирки с полистироловым покрытием обеспечивали лучший иммунозахват по сравнению с планшетами ($p < 0,0001$), особенно при использовании антител P2C5, эффективных против различных генетических линий SARS-CoV-2, включая Омикрон. Антитела R107 продемонстрировали ограниченную специфичность, не превышающую уровень контрольной группы с бычьим сывороточным альбумином. Анализ перекрестной контаминации выявил ее наличие в 14 из 288 образцов в планшетах, тогда как в модифицированных пробирках контаминации образцов не было. Таким образом, использованные для высокоточных молекулярных исследований модифицированные пробирки имеют преимущества, так как обеспечивают снижение риска перекрестной контаминации и улучшение эффективности иммунозахвата.

Ключевые слова: иммунозахват, моноклональные антитела, ОТ-ПЦР, модифицированная поверхность, перекрестная контаминация, SARS-CoV-2

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-20035, <https://rscf.ru/project/23-15-20035/>

Вклад авторов: Е. О. Рубальский, Р. А. Абдрахманова, Г. Р. Баева, Т. С. Рубальская — экспериментальная часть с модифицированными микропробирками; Д. В. Щебляков, И. А. Фаворская — подготовка моноклональных антител; Е. О. Рубальский, М. В. Лазыко, С. В. Поройский, В. А. Гушчин — дизайн исследования. Все авторы внесли равный вклад в поиск и анализ информации, подготовку проекта и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 22 февраля 2023 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Евгений Олегович Рубальский
ул. Бакинская, д. 121, г. Астрахань, 414000, Россия; e.o.rubalsky@gmail.com rubalsky@phage.pro

Статья получена: 29.11.2024 **Статья принята к печати:** 19.12.2024 **Опубликована онлайн:** 28.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.068

MODIFIED MICRO TEST TUBES AS A PROMISING BASIS FOR IMMOBILIZATION OF ANTIBODIES FOR IMMUNOCAPTURE ON THE EXAMPLE OF SARS-COV-2

Roubalsky EO^{1,2}✉, Abdrakhmanova RA¹, Baeva GR¹, Rubalskaya TS³, Lazko MV¹, Poroykiy SV¹, Shcheblyakov DV⁴, Favorskaya IA⁴, Gushchin VA^{4,5,6}

¹ Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

² Russian University of Medicine, Moscow, Russia

³ Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia

⁴ Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁶ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

The solid-phase immunocapture with antibodies is an important tool used in immunology studies, but conventional polystyrene plates are prone to deformation during thermal cycling and cross-contamination of samples, which reduces accuracy and reproducibility, when molecular genetic testing methods are included in the study. The development of alternative solutions, such as modified polystyrene-coated polypropylene tubes, makes it possible to eliminate these limitations. The study aimed to create a new approach to SARS-CoV-2 immunocapture involving the use of modified test tubes and to assess its efficacy. Monoclonal antibodies P2C5 and R107, as well as inactivated strains GK2020/1 (Wuhan) and hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (Omicron) were used for analysis. Immobilization of antibodies, sorption of viral particles, and RNA extraction were accomplished using modified test tubes, standard plates, and uncoated test tubes. The key findings showed that the polystyrene-coated modified test tubes ensured better immunocapture compared to the plates ($p < 0.0001$), especially when using the P2C5 antibody effective against various SARS-CoV-2 lineages, including Omicron. The R107 antibody showed limited specificity, not exceeding that of the control group with bovine serum albumin. The cross-contamination analysis revealed contamination of 14 samples out of 288 in the plates, while no contamination of samples was reported for modified test tubes. Thus, modified test tubes used for high-precision molecular testing have some advantages, since these decrease the risk of cross-contamination and improve immunocapture efficacy.

Keywords: immunocapture, monoclonal antibodies, RT-PCR, modified surface, cross-contamination, SARS-CoV-2

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-15-20035, <https://rscf.ru/project/23-15-20035/>

Author contribution: Rubalsky EO, Abdrakhmanova RA, Baeva GR, Rubalskaya TS — experimental procedure involving micro test tubes; Shcheblyakov DV, Favorskaya IA — preparation of monoclonal antibodies; Rubalsky EO, Lazko MV, Poroykiy SV, Gushchin VA — study design. The authors contributed to the search for and analysis of information, preparation of the draft, and manuscript writing equally.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Astrakhan State Medical University. (protocol No. 7 dated 22 February 2023).

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeny O. Roubalsky
Bakinskaya, 121, Astrakhan, 414000, Russia; e.o.rubalsky@gmail.com rubalsky@phage.pro

Received: 29.11.2024 **Accepted:** 19.12.2024 **Published online:** 28.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.068

Иммунозахват на основе специфических антител является ключевым этапом во многих лабораторных иммунологических методах исследований. Традиционно для реализации данного метода используют полистироловые микропланшеты, которые обеспечивают возможность одновременной обработки множества образцов. Полистирол, как правило, обладает способностью пассивно (неспецифически) иммобилизовать на своей поверхности практически любые крупные молекулы, имеющие доступные гидрофобные участки, например антитела [1]. Однако этот материал подвержен деформации при температурах выше +70 °С (а при длительном нагреве — выше +60 °С) [2]. Это серьезный технический недостаток при использовании дополнительных молекулярно-генетических этапов анализа, таких как термическая экстракция нуклеиновых кислот и термоциклирование (например, в реакции иммуно-ПЦР [3]), органичивающий широкое практическое применение таких методов. Предложенные в качестве альтернативы полистироловым планшетам собирающиеся в 96-луночный планшет стрипованные пробирки из поликарбоната устойчивы к нагреванию и обладают высокой сорбционной способностью [4].

Тем не менее, применение планшетов имеет высокий риск перекрестной контаминации [5, 6]. Этот риск может нивелироваться различными методическими подходами, например, использованием автоматизированных систем пробоподготовки. Применение классических для молекулярно-генетических исследований полипропиленовых пробирок потенциально могло бы снизить риск контаминации при работе по принципу «одной открытой пробирки». Однако использование пробирок ограничивается низкой сорбционной способностью полипропилена к белкам, в том числе к антителам [7], что препятствует их применению для высокочувствительных методов, к которым относятся иммуно-ПЦР, требующих стабильной иммобилизации антител иммунозахвата [4].

Развитие таких методов, как иммуномолекулярные реакции, может значительно повысить чувствительность и специфичность молекулярно-генетических исследований, что особенно важно для диагностики и мониторинга вирусных инфекций с высокой мутационной изменчивостью патогена, таких как вирус SARS-CoV-2 [8]. Следует отметить, что такие реакции до настоящего времени не получили широкого практического применения. Исследования возбудителя COVID-19 с применением иммуно-ПЦР до настоящего времени в научной литературе описаны не были. Вероятно, это связано со сложностью дизайна и постановки этапов реакции. Поэтому для успешного практического применения таких комбинированных подходов необходима оптимизация их ключевых компонентов с преодолением технологических ограничений, присущих существующим форматам реакций [4, 9].

В связи с этим нами предложено оригинальное покрытие полипропиленовых пробирок полистиролом. Это решение позволяет комбинировать преимущества обоих материалов: высокую сорбционную способность полистирола и термостойкость полипропилена при снижении риска перекрестной контаминации.

Целями исследования стали разработка метода простого получения и продемонстрированная на примере SARS-CoV-2 апробация новых пробирок для иммунозахвата, обеспечивающих эффективную иммобилизацию первичных антител, предназначенных для универсального применения в молекулярно-генетических исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы SARS-CoV-2 и антитела

В качестве антигена использовали охарактеризованные образцы положительного контроля штамма ГК2020/1 (идентификатор GISAID: EPI_ISL_421275, вариант B.1.1.1, Ухань) и штамма hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (идентификатор GISAID: EPI_ISL_12748382, вариант B.1.1.529+BA.* генетической линии Омикрон) коронавируса SARS-CoV-2, химически инактивированные при помощи глутарового альдегида в конечной концентрации 0,01% с последующей инкубацией при +4 °С в течение 24 ч.

Для исследования эффективности иммобилизации первичных антител (иммунозахвата) использовали экспериментальные моноклональные антитела к RBD спайк-белка коронавируса P2C5 (получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России), имеющие наиболее широкий спектр действия, охватывающий в том числе некоторые варианты линии Омикрон [10]. Кроме того, были протестированы моноклональные антитела R107 («Хайтест», Россия), обладающие специфичной активностью преимущественно к RBD вируса варианта B.1.1.1.

Исследование эффективности иммунозахвата с использованием полистироловых планшетов для ИФА

Для оптимизации процесса иммобилизации антител использовали 96-луночные плоскодонные полистироловые иммунологические планшеты FEP-101-896 (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd., Китай). В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл антител в концентрации 10 мкг/мл, растворенных в 0,5 М карбонатном буфере (pH = 9,5), заклеивали планшеты пленкой и инкубировали при температуре +37 °С в течение 30 мин. В качестве блокирующего буфера применяли по 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH = 7,4) с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) с инкубированием при +37 °С в течение 30 мин. Промывочный буфер состоял из ФСБ (pH = 7,4) с добавлением 0,05% Твин-20.

После промывки лунок, выполненной трехкратно по 300 мкл с инкубированием в течение 45 с, в них вносили 50 мкл инактивированных предварительно разведенных в ФСБ до концентрации 1×10^6 копий/мл образцов SARS-CoV-2 и инкубировали при +37 °С в течение 30 мин. Затем проводили отмывку, выделение РНК с использованием набора РИБО-преп (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и постановку количественной ОТ-ПЦР.

Выделение РНК осуществляли по модифицированному протоколу производителя: в лунки полистиролового планшета вносили по 50 мкл буфера ТЕ, добавляли 155 мкл лизирующего раствора, заклеивали лунки пленкой для ИФА-планшетов и инкубировали при +65 °С в течение 10 мин. Затем переносили содержимое лунок полистироловых планшетов в микропробирки и дальнейшие этапы выделения РНК выполняли в соответствии с инструкцией производителя. Постановку количественной ОТ-ПЦР проводили с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-ПЦР» («Медипалтех», Россия) в сочетании с образцами химически инактивированного штамма ГК2020/1 в качестве калибратора. Все эксперименты проводили в десятикратной повторности ($n = 10$).

Исследование иммунозахвата с использованием модифицированных микропробирок

В качестве компонентов для изготовления модифицированных микропробирок использовали стерильные микропробирки из прозрачного полипропилена, свободные от ДНКаз и РНКаз, объемом 1,5 мл (SPINWIN Tarsons, Индия) и растворенный в ацетоне полистирол из иммунологических планшетов FEP-101-896 (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd., Китай). Раствор полистирола вносили асептически на дно пробирок в объеме 50 мкл и высушивали в вытяжном шкафу. Механическую стабильность полученного слоя полипропилена оценивали визуально после перемешивания внесенного 1 мл воды на вортексе при 2500 об./мин в течение 2 мин, путем двадцатикратного пипетирования с касанием наконечником пипетки-дозатора дна микропробирки и центрифугирования при 15 000 г в течение 15 мин. В модифицированные таким образом микропробирки вносили 100 мкл антител в карбонатном буфере (10 мкг/мл) и инкубировали при +37 °С в течение 30 мин с закрытыми крышками. После блокировки остаточной свободной от антител поверхности ФСБ с добавлением 2% БСА и промывки (аналогично планшетам) образцы SARS-CoV-2 вносили в объеме 50 мкл. Дальнейшие отмывку, выделение РНК и постановку ОТ-ПЦР выполняли так же, как при использовании полистироловых планшетов. Все этапы выделения РНК проводили в модифицированных микропробирках.

В качестве контроля использовали немодифицированные полипропиленовые пробирки. Все эксперименты проводили в десятикратной повторности ($n = 10$).

Исследование перекрестной контаминации

Для оценки перекрестной контаминации образцы штаммов GK2020/1 (вариант В.1.1.1) и hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (Омикрон) по 50 мкл вносили в шахматном порядке в 96-луночные планшеты и модифицированные пробирки с иммобилизованными антителами P2C5. После инкубации, промывки и выделения РНК проводили генотипирование при помощи ОТ-ПЦР. Для выявления штамма GK2020/1 проводили сиквенс-специфическую ОТ-ПЦР с оригинальными праймерами Wu_fw1mod 5'-CGTGGTTCCATGCTATACATG-3' и Wu_rv1mod 5'-CGTCCCTGTGGTAATAAACAC-3' в готовой реакционной смеси OneTube RT-PCR SYBR («Евроген», Россия) с детекцией в реальном времени по каналу SYBR-Green. Выявление штамма генетической линии Омикрон проводили с использованием набора реагентов АмплиТест

SARS-CoV-2 VOC v.3 (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Россия) согласно инструкции производителя. Для эксперимента использовали три планшета и 288 пробирок. Эксперимент проводили в ламинарном потоке воздуха в боксе микробиологической безопасности класса II типа А2 («Ламинарные системы», Россия).

Статистический анализ

Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM v.10.4.0 (Graphpad Software, Inc., США). Оценку распределения проводили с использованием теста Шапиро–Уилка. Для множественных сравнений параметрических данных применяли двусторонний метод ANOVA с тестом аддитивности Тьюки и уровнем значимости различий $p < 0,05$ (доверительный интервал — 95%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модифицированные микропробирки

Полипропиленовая микропробирка после модификации полистиролом представлена на рис. 1. Полученные модифицированные микропробирки были механически стабильны при перемешивании как на вортексе, так и путем пипетирования. Центрифугирование тоже не оказывало заметного влияния на целостность слоя полистирола.

Иммунозахват инактивированного SARS-CoV-2

При использовании штамма GK2020/1 (вариант В.1.1.1) в качестве антигена эффективный иммунозахват был выявлен как для антител P2C5, так и для антител R107 (рис. 2). Количество связанного антителами вируса оказалось достоверно выше при использовании модифицированных пробирок по сравнению с полистироловыми планшетами ($p < 0,0001$). Количество копий РНК SARS-CoV-2 в контрольных группах с использованием БСА было достоверно ниже количества, выявленного в группах с антителами при использовании как планшетов, так и модифицированных пробирок. При применении пробирок без покрытия определялось одинаково низкое количество РНК коронавируса ($p > 0,05$) во всех группах, что свидетельствует об отсутствии специфического иммунозахвата антигена независимо от применения антител.

При использовании штамма hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (генетическая линия Омикрон) эффективный иммунозахват наблюдали только для антител P2C5 (рис. 3). Антитела R107, специфичные к RBD преимущественно

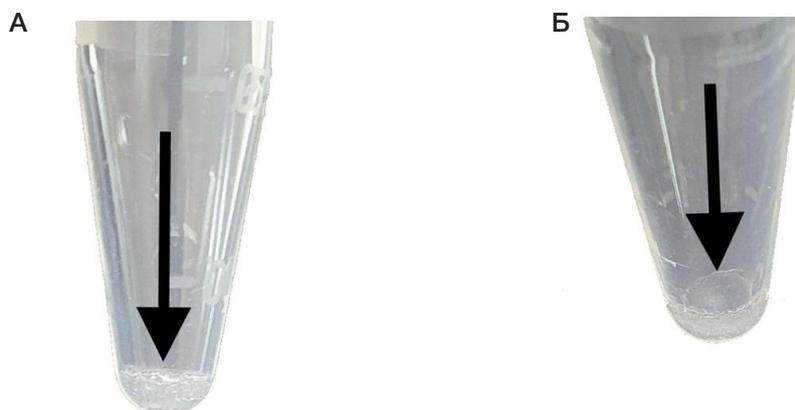


Рис. 1. Полипропиленовая пробирка после модификации полистиролом: вид сбоку (А) и вид под углом $\approx 45^\circ$ (Б)

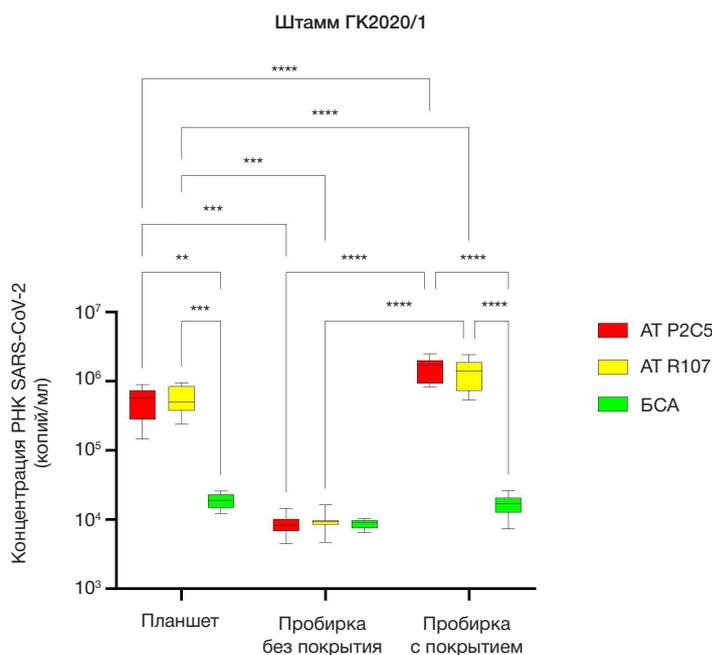


Рис. 2. Результаты иммунозахвата штамма GK2020/1. Красным цветом отмечены моноклональные антитела P2C5, желтым — R107, зеленым — контрольная группа с БСА. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$

вируса SARS-CoV-2 варианта Ухань, не показали значительного отличия от контрольной группы с БСА. Таким образом, штамм линии Омикрон продемонстрировал способность ускользать от нейтрализующих антител R107, что соответствует данным других исследователей о снижении эффективности некоторых моноклональных антител против новых вариантов SARS-CoV-2 [11, 12]. Модифицированные пробирки обеспечивали лучшие результаты, чем полистироловые планшеты, как для линии В.1.1.1, так и для линии Омикрон.

Перекрестная контаминация

Перекрестная контаминация была обнаружена в 14 из 288 образцов при использовании полистироловых планшеты (рис. 4). Контаминация выявлялась как смешение

РНК штаммов GK2020/1 и hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021, что подтверждает риск переноса материала между лунками в таких условиях. В модифицированных пробирках перекрестной контаминации не было выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что модифицированные полипропиленовые пробирки с полистироловым покрытием обладают значительными преимуществами по сравнению с традиционными полистироловыми планшетами, включая снижение риска перекрестной контаминации и улучшение эффективности иммунозахвата. Эти данные согласуются с исследованиями, демонстрирующими, что полистироловые планшеты являются хорошим материалом для иммобилизации антител, но их использование ограничено

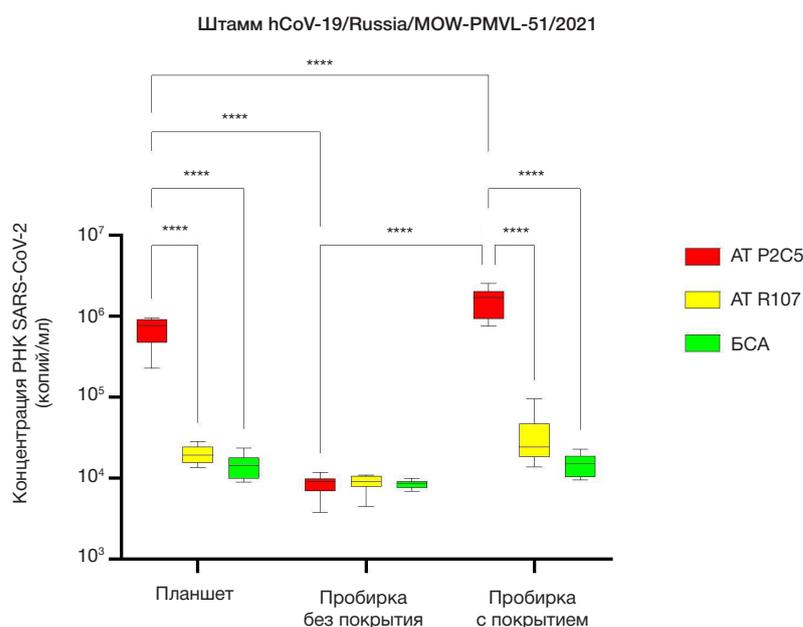


Рис. 3. Результаты иммунозахвата штамма hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021. Красным цветом отмечены моноклональные антитела P2C5, желтым — R107, зеленым — контрольная группа с БСА. **** — $p < 0,0001$

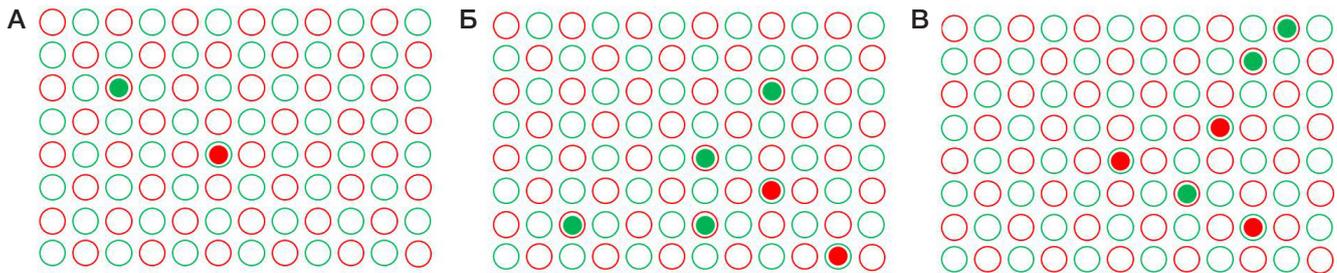


Рис. 4. Выявленная перекрестная контаминация при выделении РНК SARS-CoV-2 в 96-луночных планшетах. Лунки, представленные в виде красных кругов, содержат штамм GK2020/1 (вариант В.1.1.1). Лунки, представленные в виде зеленых кругов, содержат штамм hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (вариант В.1.1.529+ВА.*генетическая линия Омикрон). Красные точки в зеленых кругах указывают на контаминацию штамма hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 штаммом GK2020/1. Зеленые точки в красных кругах указывают на контаминацию штамма GK2020/1 штаммом hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021. (А–В) — три последовательные постановки тремя различными операторами

из-за слабой устойчивости к высоким температурам и рискам контаминации [2, 5, 6].

Различия в эффективности антител P2C5 и R107 в работе с разными штаммами SARS-CoV-2 соответствуют данным о значительных мутациях в RBD линии Омикрон, которые снижают эффективность антител, специфичных варианту В.1.1.1 (Ухань) вируса [13, 14]. Предполагается, что такие мутации приводят к конформационным изменениям RBD, что препятствует связыванию антител, как это ранее описывалось для антител первого поколения против SARS-CoV-2 [15]. Высокая эффективность P2C5, охватывающих широкий спектр вариантов, включая Омикрон, подтверждает их универсальность и актуальность для мониторинга новых штаммов.

Отсутствие перекрестной контаминации в модифицированных пробирках можно объяснить отсутствием непосредственного контакта между образцами и минимизацией аэрозольного переноса. Аналогичные выводы были сделаны в исследованиях, где использовали другие замкнутые системы для молекулярной диагностики [16].

Несмотря на положительные результаты, требуется дальнейшая оптимизация условий иммобилизации антител и выделения РНК для повышения воспроизводимости метода при использовании модифицированных пробирок. Кроме того, для широкого применения пробирок необходимо провести тестирование на других патогенах, чтобы подтвердить универсальность метода. Дальнейшие исследования и усовершенствования пробирок могут быть также проведены по следующим направлениям: изучение пригодности и сочетаемости полипропилена и полистирола

различных марок; снижение неспецифического сигнала за счет применения пробирок из полипропилена с низкой адгезивной способностью; автоматизация процесса нанесения полистирола.

В целом, модифицированные пробирки представляют собой перспективную основу для комбинированных иммунологических и молекулярно-генетических исследований, требующих высокой чувствительности и точности, особенно в условиях высокой изменчивости патогенов, таких как SARS-CoV-2.

Выводы

Модифицированные полипропиленовые пробирки с полистироловым покрытием показали высокую эффективность иммунозахвата и отсутствие перекрестной контаминации, превосходя традиционные полистироловые планшеты. Эти результаты подтверждают достижение целей исследования. Антитела P2C5 продемонстрировали универсальность против различных линий SARS-CoV-2, включая Омикрон, что делает их перспективными для диагностики новых вариантов возбудителя COVID-19. Дальнейшие исследования должны быть направлены на тестирование пробирок с другими патогенами и улучшение их функциональных характеристик. Возможные направления применения модифицированных полипропиленовых пробирок с полистироловым покрытием включают клиническую диагностику и разработку высокочувствительных методов для поиска, селекции и выявления вирусов.

Литература

- Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods*. 1992; 150 (1–2): 77–90. DOI: 10.1016/0022-1759(92)90066-3. PMID: 1613260.
- Donald AM. The effect of temperature on crazing mechanisms in polystyrene. *J Mater Sci*. 1985; 20: 2630–8. DOI: 10.1007/BF00556095.
- Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. 1992; 258 (5079): 120–2. DOI: 10.1126/science.1439758. PMID: 1439758.
- Горшков А. С., Печенкин Д. В., Кузнецовский А. В., Балакин В. А. ПЦР-амплифицированный иммуноанализ (иммуно-ПЦР): принцип метода, варианты исполнения, возможности и перспективы использования для выявления патогенных биологических агентов. *Вестник войск РХБ защиты*. 2021; 5 (4): 366–75. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-4-366-375>.
- Minich JJ, Sanders JG, Amir A, Humphrey G, Gilbert JA, Knight R. Quantifying and Understanding Well-to-Well Contamination in Microbiome Research. *mSystems*. 2019; 4 (4): e00186–19. DOI: 10.1128/mSystems.00186-19. PMID: 31239396; PMCID: PMC6593221.
- Lou YC, Hoff J, Olm MR, West-Roberts J, Diamond S, Firek BA, et al. Using strain-resolved analysis to identify contamination in metagenomics data. *Microbiome*. 2023; 11 (1): 36. DOI: 10.1186/s40168-023-01477-2. PMID: 36864482; PMCID: PMC9979413.
- Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JR Jr. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem*. 2011; 414 (1): 38–46. DOI: 10.1016/j.ab.2011.02.009. Epub 2011 Mar 9. PMID: 21315060; PMCID: PMC3290000.
- Wu X, Liu J, Zhang H, Zhou H, Wang W, Ma Y, et al. Immunomolecular assay based on selective virion capture by spike antibody and viral nucleic acid amplification for detecting intact SARS-CoV-2

- particles. *J Nanobiotechnology*. 2022; 20 (1): 399. DOI: 10.1186/s12951-022-01558-8. PMID: 36064407; PMCID: PMC9444083.
9. Malou N, Raoult D. Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies. *Trends Microbiol*. 2011; 19(6): 295–302. DOI: 10.1016/j.tim.2011.03.004. PMID: 21478019.
 10. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV, Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol*. 2022; 13: 822159. DOI: 10.3389/fimmu.2022.822159. PMID: 35281053; PMCID: PMC8907979.
 11. Shah M, Woo HG. Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. *Front Immunol*. 2022; 12: 830527. DOI: 10.3389/fimmu.2021.830527. PMID: 35140714; PMCID: PMC8819067.
 12. Pochtovyi AA, Kustova DD, Siniavin AE, Dolzhikova IV, Shidlovskaya EV, Shpakova OG, et al. In Vitro Efficacy of Antivirals and Monoclonal Antibodies against SARS-CoV-2 Omicron Lineages XBB.1.9.1, XBB.1.9.3, XBB.1.5, XBB.1.16, XBB.2.4, BQ.1.1.45, CH.1.1, and CL.1. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11 (10): 1533. DOI: 10.3390/vaccines11101533. PMID: 37896937; PMCID: PMC10611309.
 13. Calvaresi V, Wrobel AG, Toporowska J, Hammerschmid D, Doores KJ, Bradshaw RT, et al. Structural dynamics in the evolution of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Nat Commun*. 2023; 14 (1): 1421. DOI: 10.1038/s41467-023-36745-0. PMID: 36918534; PMCID: PMC10013288.
 14. Reuter N, Chen X, Kropff B, Peter AS, Britt WJ, Mach M, et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Is Capable of Inducing Cell-Cell Fusions Independent from Its Receptor ACE2 and This Activity Can Be Impaired by Furin Inhibitors or a Subset of Monoclonal Antibodies. *Viruses*. 2023; 15 (7): 1500. DOI: 10.3390/v15071500. PMID: 37515187; PMCID: PMC10384293.
 15. Чуланов В. П., Шмаков Р. Г., Лioзнов Д. А., Абдулганиева Д. И., Валишин Д. А., Грабовский В. М., и др. Резолюция Совета экспертов. Нейтрализующие моноклональные антитела при COVID-19 — место в терапии уязвимых категорий больных. *Инфекционные болезни*. 2023; 21 (1): 152–61. DOI: 10.20953/1729-9225-2023-1-152-161.
 16. Venkatesan G, Kushwaha A, Kumar A, Bora DP, Sasikumar P. An improved visual closed tube Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of orf virus in sheep and goats. *Vet Ital*. 2022; 58 (2). DOI: 10.12834/VetIt.2426.15340.2. PMID: 36586114.

References

1. Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods*. 1992; 150 (1–2): 77–90. DOI: 10.1016/0022-1759(92)90066-3. PMID: 1613260.
2. Donald AM. The effect of temperature on crazing mechanisms in polystyrene. *J Mater Sci*. 1985; 20: 2630–8. DOI: 10.1007/BF00556095.
3. Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. 1992; 258 (5079): 120–2. DOI: 10.1126/science.1439758. PMID: 1439758.
4. Gorshkov AS, Pechenkin DV, Kuznecovskij AV, Balakin VA. PCR-amplificirovannyj immunoanaliz (immuno-PCR): princip metoda, varianty ispolnenija, vozmozhnosti i perspektivy ispol'zovanija dlja vyjavlenija patogennyh biologicheskikh agentov. *Vestnik vojsk RHB zashhity*. 2021; 5 (4): 366–75. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-4-366-375>. Russian.
5. Minich JJ, Sanders JG, Amir A, Humphrey G, Gilbert JA, Knight R. Quantifying and Understanding Well-to-Well Contamination in Microbiome Research. *mSystems*. 2019; 4 (4): e00186–19. DOI: 10.1128/mSystems.00186-19. PMID: 31239396; PMCID: PMC6593221.
6. Lou YC, Hoff J, Olm MR, West-Roberts J, Diamond S, Firek BA, et al. Using strain-resolved analysis to identify contamination in metagenomics data. *Microbiome*. 2023; 11 (1): 36. DOI: 10.1186/s40168-023-01477-2. PMID: 36864482; PMCID: PMC9979413.
7. Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JR Jr. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem*. 2011; 414 (1): 38–46. DOI: 10.1016/j.ab.2011.02.009. Epub 2011 Mar 9. PMID: 21315060; PMCID: PMC3290000.
8. Wu X, Liu J, Zhang H, Zhou H, Wang W, Ma Y, et al. Immunomolecular assay based on selective virion capture by spike antibody and viral nucleic acid amplification for detecting intact SARS-CoV-2 particles. *J Nanobiotechnology*. 2022; 20 (1): 399. DOI: 10.1186/s12951-022-01558-8. PMID: 36064407; PMCID: PMC9444083.
9. Malou N, Raoult D. Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies. *Trends Microbiol*. 2011; 19(6): 295–302. DOI: 10.1016/j.tim.2011.03.004. PMID: 21478019.
10. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV, Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol*. 2022; 13: 822159. DOI: 10.3389/fimmu.2022.822159. PMID: 35281053; PMCID: PMC8907979.
11. Shah M, Woo HG. Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. *Front Immunol*. 2022; 12: 830527. DOI: 10.3389/fimmu.2021.830527. PMID: 35140714; PMCID: PMC8819067.
12. Pochtovyi AA, Kustova DD, Siniavin AE, Dolzhikova IV, Shidlovskaya EV, Shpakova OG, et al. In Vitro Efficacy of Antivirals and Monoclonal Antibodies against SARS-CoV-2 Omicron Lineages XBB.1.9.1, XBB.1.9.3, XBB.1.5, XBB.1.16, XBB.2.4, BQ.1.1.45, CH.1.1, and CL.1. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11 (10): 1533. DOI: 10.3390/vaccines11101533. PMID: 37896937; PMCID: PMC10611309.
13. Calvaresi V, Wrobel AG, Toporowska J, Hammerschmid D, Doores KJ, Bradshaw RT, et al. Structural dynamics in the evolution of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Nat Commun*. 2023; 14 (1): 1421. DOI: 10.1038/s41467-023-36745-0. PMID: 36918534; PMCID: PMC10013288.
14. Reuter N, Chen X, Kropff B, Peter AS, Britt WJ, Mach M, et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Is Capable of Inducing Cell-Cell Fusions Independent from Its Receptor ACE2 and This Activity Can Be Impaired by Furin Inhibitors or a Subset of Monoclonal Antibodies. *Viruses*. 2023; 15 (7): 1500. DOI: 10.3390/v15071500. PMID: 37515187; PMCID: PMC10384293.
15. Chulanov VP, Shmakov RG, Lioznov DA, Abdulganieva DI, Valishin DA, Grabovsky VM, i dr. Rezolucija Soveta jekspertov. Nejtralizujushhie monoklonal'nye antitela pri COVID-19 — mesto v terapii uязvimyh kategorij bol'nyh. *Infekcionnye bolezni*. 2023; 21 (1): 152–61. DOI: 10.20953/1729-9225-2023-1-152-161. Russian.
16. Venkatesan G, Kushwaha A, Kumar A, Bora DP, Sasikumar P. An improved visual closed tube Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of orf virus in sheep and goats. *Vet Ital*. 2022; 58 (2). DOI: 10.12834/VetIt.2426.15340.2. PMID: 36586114.