

Быстрое определение количества общего числа частиц различных семейств вирусов обладает высоким потенциалом в случае появления и быстрого распространения патогенных организмов

Д-р Ребекка К. Монтанж, д-р Кэтрин Д. Шивес, магистр наук Джеффри В. Стеффенс, магистр наук Марк С. Смит
Аналитический отдел по вирусологии компании «Sartorius», Арвада, шт. Колорадо

Быстрое количественное определение вирусных частиц при появлении нового патогенного вируса крайне важно для быстрой разработки вакцины. Существующие методы определения числа частиц вируса в образце, такие как иммунопробы, пробы на гемолитические бляшки, ЦПД₅₀ (TCID₅₀) или такие измерения содержания генома, как кПЦР, требуют определенных изначальных базовых знаний о вирусе, чтобы можно было использовать правильные колонии клеток и производить корректные реактивы. Построения набора специфичных реактивов для молекулярных и иммунологических исследований может занять недели или даже месяцы, что может повлечь за собой опустошительные последствия во время вспышки нового неизвестного вируса.

В этом документе мы представляем вашему вниманию новейшую технологию универсального и быстрого количественного определения вирусных частиц — прибор Virus Counter® 3100 (VC 3100), в комплекте с двухкомпонентным флуоресцентным красителем, предназначенный для маркировки и обнаружения вирусного белка и нуклеиновой кислоты, прямого количественного определения общего числа частиц в пробах вирусов в оболочке. Эта платформа не требует применения реактивов, специфичных для видов и штаммов вирусов. Для настоящего исследования использовали предствительные штаммы аренавирусов, коронавирусов, флавивирусов, ортомиксовирусов и тогавирусов. Результаты титрования каждой пробы вируса были получены с помощью платформы Virus Counter®. После чего их сравнили с данными титрования, полученными из сертификатов анализа поставщиков. Эти результаты подтвердили эффективность платформы Virus Counter® 3100 в части быстрого и высокоточного количественного определения вирусов из семейств, которые обладают высоким потенциалом для развития и скрытия новых человеческих патогенов. Таким образом, эта технология способна значительно сократить время критичных экспериментов при производстве вакцин, когда требуется подсчет частиц нового вируса.

Протокол окрашивания проб вирусов

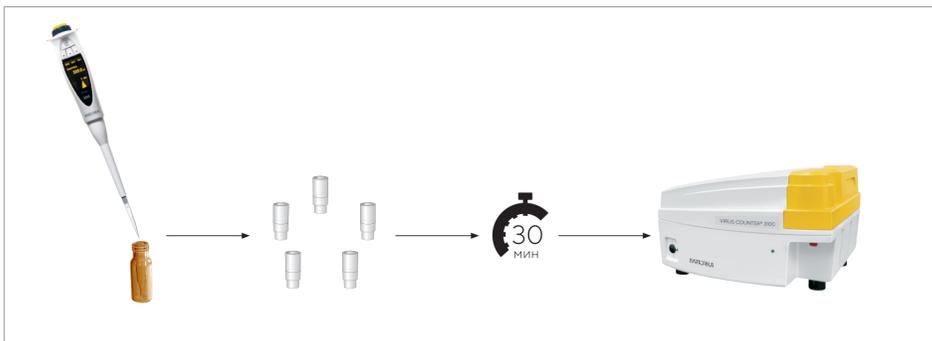


Рисунок 1

Разбавленные пробы смешивают с двухкомпонентным флуорогенным красителем и инкубируют в течение 30 минут (рисунок 1). Окрашенные пробы анализируют с помощью прибора Virus Counter® 3100. Время прогона составляет три минуты на одну пробу. Используя аналогичные принципы, что и проточной цитометрии, определяют количество интактных частиц, и указывают результат в вирусных частицах на миллилитр (в. ч./мл).

Обнаружение вирусных частиц

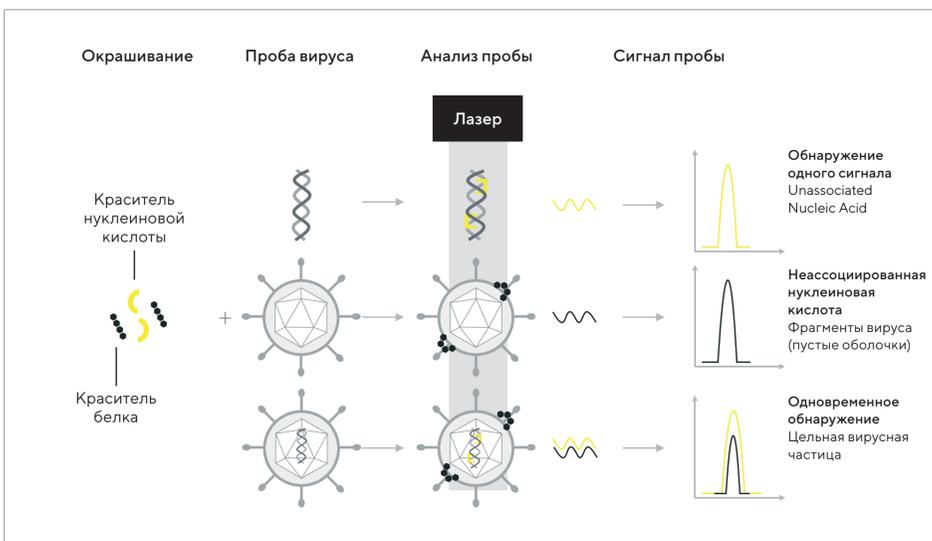


Рисунок 2

Два компонента флуорогенного красителя являются универсальными красящими веществами для содержащего нуклеиновой кислоты и гидрофобных участков белков. По мере прохождения этих связанных красителей через лазерный луч, излученные сигналы регистрируются в отдельных каналах. Одновременно зафиксированные сигналы регистрируются, как результаты (рисунок 2).

Семейство	Вид	Штамм	Титр VC 3100 (в. ч./мл)	ЦПД ₅₀ (ЦПД ₅₀ /мл)*	Общее число инфекционных частиц**
Ареновирус	Такарибе	TRVL-11573	1,24x10 ⁸ ± 5,60x10 ⁷	8,6x10 ⁶	14 (7,6 - 20,0)
Коронавирус	Человеческий коронавирус	229E	4,70x10 ⁸ ± 1,31x10 ⁸	1,58x10 ⁶	297 (214 - 380)
Флавивирус	Зика	PRVABC59	2,20x10 ⁸ ± 9,94x10 ⁷	2,8x10 ⁷	7,8 (4,3 - 11)
Ортомиксовирус	Грипп А	A/Мичиган/45/2015	8,19x10 ⁷ ± 1,68x10 ⁷	1,6x10 ⁷	5,1 (4,1 - 6,2)
Тогавирус	Форт Морган	CM4-146	1,29x10 ⁸ ± 4,38x10 ⁷	1,58x10 ⁸	0,815 (0,537 - 1,09)

* Данные по ЦПД₅₀ предоставлены поставщиком.
** Диапазон доверительного интервала составляет 95% для данных платформы Virus Counter®.

Таблица 1

Сравнение результатов VC 3100 с данными инфекционного титра с указанием общего числа частиц по отношению к числу инфекционных частиц в виде таблицы (таблица 1). Данные брали по пробам без обработки.

Последовательное разведение вирусных штаммов

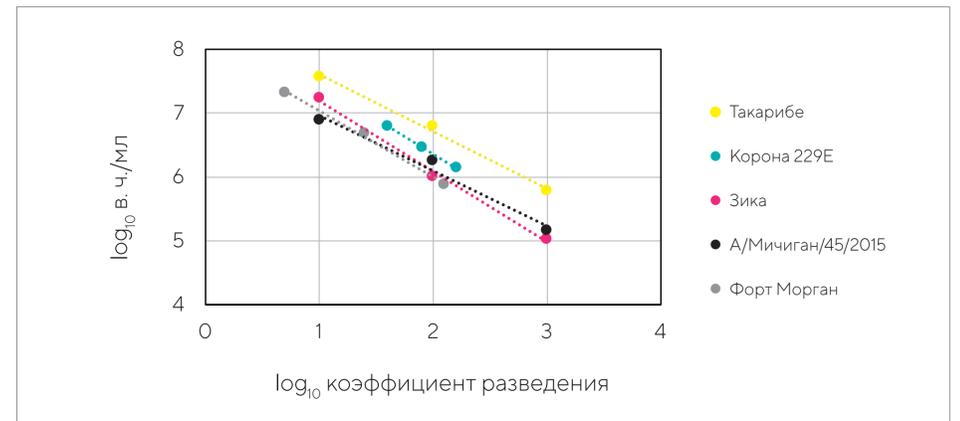


Рисунок 3

Последовательное разведение представителей вирусов из семейств, в которых с наибольшей вероятностью сформируются патогенные для человека виды (рисунок 3). Наш универсальный реактив позволяет быстро и точно обнаружить широкий спектр типов вирусов в оболочке. Не смотря на то, что здесь представлен штамм гриппа, который является штаммом обычного сезонного гриппа, эту технологию можно использовать для обнаружения подтипов с пандемическим потенциалом.

Сравнение общего числа частиц относительно инфекционного титра

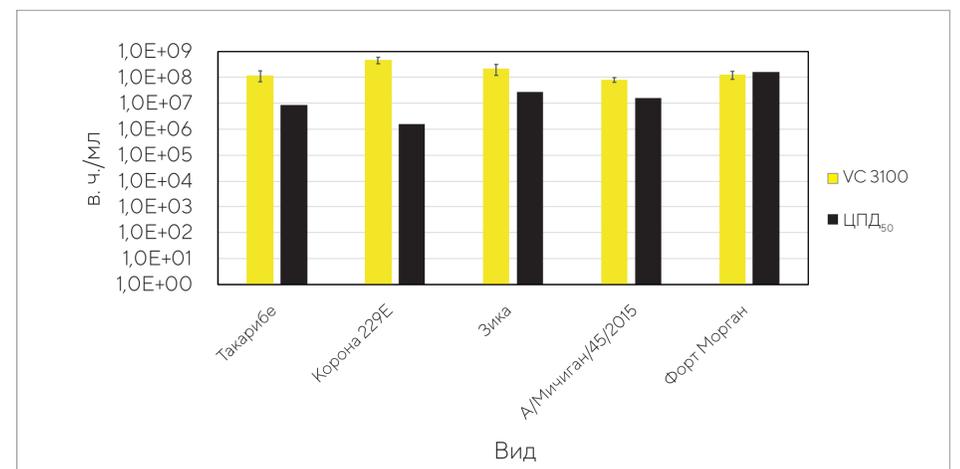


Рисунок 4

Сравнение титров по результатам VC 3100 и инфекционного титра. Результаты VC 3100 показаны с планками погрешности, которые означают доверительный интервал в 95% (рисунок 4). Результаты ЦПД₅₀ были предоставлены поставщиками и информация об экспериментальной погрешности отсутствовала.

Заключение

- Платформа Virus Counter® 3100 способна обеспечить быстрое количественное определение целого ряда типов вирусов в оболочке.
- Получение результатов титрования проб вируса занимает менее одного часа.
- Быстрый метод для подсчета общего числа частиц вируса, включая неинфекционную популяцию.
- Предварительное знание последовательности генома или антигенной детерминанты оболочки не требуется.

На основании вышесказанного, эта платформа значительно сокращает время проведения критичных опытов при производстве вакцин, в которых требуется подсчет вирусных частиц, когда другие методы оказываются бесполезными по отношению к новому вирусу.