

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ  
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

*На правах рукописи*

***Ериш Анна Васильевна***

Разработка диагностического набора для выявления антител к возбудителям  
кори, краснухи и эпидемического паротита методом мультиплексного  
дот-анализа

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук  
Полтавченко Александр Георгиевич

Кольцово – 2015

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1 ДЕТСКИЕ УПРАВЛЯЕМЫЕ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ И ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА (Обзор литературы)	11
1.1 Особенности детских вирусных управляемых инфекций	11
1.1.1 Место краснухи, кори и эпидемического паротита в структуре инфекционной патологии	11
1.1.2 Корь	12
1.1.3 Краснуха	16
1.1.3 Эпидемический паротит	19
1.2 Борьба с детскими вирусными инфекциями	23
1.2.1 Проекты снижения и элиминации ДВВИ	23
1.2.2 Вакцины	27
1.3 Оценка гуморального поствакцинального иммунитета	33
1.3.1. Поствакцинальный иммунитет	33
1.3.2 Оценка уровня антител к возбудителям ДВВИ	35
1.4 Мультиплексный иммуноанализ как альтернативный подход к комплексному выявлению антител в препаратах крови	36
1.4.1 Виды, форматы и дизайн белковых матриц	37
1.4.2 Материалы, используемые в качестве твёрдой фазы	41
1.4.3 Иммобилизация биомолекул на поверхности твёрдой фазы	43
1.4.4 Способы распределения реагентов захвата на подложке	47
1.4.5 Методы детекции иммунологического связывания	53
1.4.6 Проблемы создания мультиплексных тестов	57
1.5 Выводы	58
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
2.1 Материалы	60
2.2 Методы	61
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	64
3.1 Отработка способов изготовления белковых матриц	64
3.1.1 Исследование целевых свойств материалов для изготовления подложки	64
3.1.2 Оценка способов выкройки подложек	72

3.1.3 Оценка способов подготовки поверхности для иммобилизации антигенов	76
3.1.4 Подбор условий иммобилизации антигенов на подложке	77
3.1.5 Выбор реагентов и условий блокирования матриц	79
3.2 Отработка способа применения белковых матриц	82
3.2.1 Отработка способа детекции иммунологического связывания	82
3.2.2 Оптимизация условий выполнения дот-иммуноанализа	89
3.3 Диагностический набор и основные приемы его изготовления и применения.	93
3.3.1 Состав набора	93
3.3.2 Белковые матрицы	93
3.3.3 Аналитические ванны	95
3.3.4 Герметизация аналитических ванн	100
3.3.5 Способ применения набора	101
3.4 Испытания экспериментальных образцов мультиплексного теста	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ	112
Список использованных источников информации	114
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Методика приготовления компонентов диагностического набора для мультиплексного выявления в препаратах крови антител к возбудителям инфекционных заболеваний	131
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Инструкция по применению набора реагентов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа антител класса G к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций	140
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 Отзыв об апробации иммуночипов для выявления антител класса G к TORCH инфекциям и ДВИ	147
ПРИЛОЖЕНИЕ 4 Отчет о контроле ОБТК ООО «ИмДи-спектр» набора реагентов «ДВИ-спектр-IgG-антитела» на рабочих панелях сывороток	149
ПРИЛОЖЕНИЕ 5 Акт внедрения в практику результатов научных разработок	154

## **Список использованных сокращений**

Аг – антиген

АПКВ – ассоциированная паротитно-коревая вакцина

Ат – антитело

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДВВИ – детские вакциноуправляемые вирусные инфекции

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

К<sup>+</sup> – положительный контроль

К<sup>-</sup> – отрицательный контроль

КББ – карбонатно-бикарбонатный буферный раствор

К<sub>кор</sub> – коэффициент корреляции

ОП – оптическая плотность

ОП<sub>крит</sub> – критическое значение оптической плотности

ПВХ – поливинилхлорид

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПХ – пероксидаза хрена

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РБРК – буферный раствор для разведения конъюгата

РБРС – буферный раствор для разведения сыворотки

СВК – синдром врождённой краснухи

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

ФСБТ – фосфатно-солевой буферный раствор с твином

ЩФ – щелочная фосфатаза

IgG – иммуноглобулины класса G

IgG-Hum – иммуноглобулины класса G человека

IgM – иммуноглобулины класса M

SpA – стафилококковый белок A

ТЦД – тканевая цитопатическая доза

ЭП – эпидемический паротит

NBT – (nitroblue tetrazolium chloride)

BCIP – (bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность проблемы**

Среди детских болезней, управляемых средствами активной иммунизации, видное место занимают корь, краснуха и эпидемический паротит. Эти болезни относятся к вирусным антропонозным инфекциям с одинаковым путём передачи и сходной контагиозностью. Традиционно они считаются детскими инфекциями, однако в последнее время всё чаще этим заболеваниями подвергается и взрослое население. Плановая и масштабная вакцинопрофилактика привела к существенному снижению показателей заболеваемости этими инфекциями. Особенно значительные успехи в этом плане достигнуты за последнее десятилетие, что позволило в отдельных регионах мира прогнозировать ликвидацию этих болезней. В Российской Федерации действуют национальные проекты по снижению и элиминации этих инфекций, в результате реализации которых к 2009 г. удалось значительно снизить заболеваемость среди детского населения краснухой и эпидемическим паротитом, а заболеваемость корью снизилась до спорадических случаев.

В 2010 г. в России – первой из стран Европейского региона, начата процедура сертификации территории как свободной от эндемичной (местной) кори [36]. Однако в 2011 г. в странах Европейского региона и ряде регионов России эпидемиологическая обстановка по кори осложнилась, отмечен рост заболеваемости краснухой и эпидемическим паротитом. В связи с этим ВОЗ перенесла достижение региональных целей элиминации кори и краснухи с 2010 г. на 2015 г. [24], а затем и на 2020 г. [93].

Среди причин ухудшения эпидемиологической обстановки, наряду с неполным охватом вакцинацией, выделяются: недостаточная эффективность применяемых вакцин, нарушение правил обращения с вакцинами и истощение прививочного иммунитета у старших возрастных групп [36]. Вследствие этих причин, несмотря на массовые прививки, значительная часть населения не обладает защитным иммунитетом и нуждается в дополнительной вакцинации. Выявление таких лиц может быть произведено путём серологического обследования.

В условиях низкой заболеваемости роль серологического мониторинга, предоставляющего возможность своевременно определить группы и территории риска и выяснить причины увеличения числа серонегативных лиц, существенно возрастает. Это предполагает организацию широких лабораторных обследований на напряжённость иммунитета всех медицинских работников, работников сферы обслуживания, лиц, работающих с детьми и подростками, и выборочное обследование различных групп детского и взрослого населения. Полная и достоверная информация не только о заболеваемости, но и о состоянии специфического популяционного иммунитета в разных возрастных группах населения, позволяет прогнозировать эпидемическую ситуацию и дифференцированно проводить оперативные мероприятия на разных территориях [15].

В настоящее время для серологического обследования наиболее широко применяется иммуноферментный анализ (ИФА). В России для диагностики кори, эпидемического паротита и краснухи доступны моноспецифические отечественные и зарубежные наборы для ИФА, отвечающие современным требованиям. Однако выполнение ИФА требует специального оборудования и персонала с навыками работы, а для анализа необходимы образцы плазмы или сыворотки крови, полученной из вены. Кроме того, стоимость анализа единичных образцов или небольших по количеству серий сывороток достаточно высока и становится экономически целесообразной только при массовых обследованиях, а результаты разных анализов трудно свести в единую систему для формирования персональных иммунологических профилей.

Таким образом, совершенствование методов серодиагностики и создание надёжных, но более дешёвых, оперативных и доступных способов оценки поствакцинального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям (ДВВИ) является актуальной и важной как медицинской, так и социальной задачей, поскольку напрямую связана со здоровьем рождающихся детей и в перспективе определяет здоровье населения страны. Особую актуальность она приобретает сегодня, в период разработки и реализации программы элиминации ДВВИ на всей территории России.

## **Цель и задачи исследования**

Целью исследования является разработка диагностического набора, позволяющего осуществлять мультиплексное выявление антител в препаратах крови к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита.

Поставленная цель подразумевает решение следующих **задач**:

- подбор и оценку целевых свойств материалов для изготовления набора;
- отработку условий и технологических приёмов при изготовлении набора;
- отработку условий и методологии проведения мультиплексного анализа;
- создание и лабораторные испытания экспериментальных образцов набора.

## **Научная новизна и практическая ценность работы**

- проведена экспериментальная оценка целевых свойств новых сортов синтетической бумаги и обоснован выбор материала для изготовления подложки белковой матрицы – бумаги на основе ПВХ Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8, выполняющего роль твёрдой фазы;

- выполнена сравнительная оценка способов выкройки и предварительной подготовки заготовок белковых матриц из синтетической бумаги, отработаны способы вырубки заготовок типографским прессом с использованием штанцевальной формы и отмывки поверхности твердой фазы перед нанесением антигенов;

- экспериментально подобраны условия иммобилизации антигенов на поверхности твёрдой фазы, в том числе с применением нестандартного автоматического устройства для нанесения антигенов на подложку;

- проведена сравнительная экспериментальная оценка наиболее перспективных вариантов хромогенной визуализации результатов анализа, обоснован выбор системы детекции с применением коллоидного золота и физического проявления;

- оптимизированы условия выполнения мультиплексного дот-иммуноанализа с использованием полученных конъюгатов на основе коллоидного золота, разработана инструкция по применению набора;

- впервые разработана оригинальная конструкция аналитической ванны, получен Патент РФ № 2517035 «Ванна для выполнения мультиплексного дот-

иммуноанализа» и отработаны условия её заполнения рабочими растворами с помощью нестандартного автоматического устройства «Ранар»;

- определен состав набора для мультиплексного выявления антител, получен Патент РФ № 2495434 «Набор для многопрофильного иммунологического анализа антител в препаратах крови»;

- разработана методика приготовления компонентов диагностического набора для мультиплексного выявления в препаратах крови антител к возбудителям инфекционных заболеваний;

- разработан проект пускового регламента на производство наборов реагентов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа видоспецифических антител класса IgG к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций «ДВИ-спектр-IgG-антитела»;

- изготовлены экспериментальные образцы диагностического набора для мультиплексного выявления антител к возбудителям краснухи, кори и эпидемического паротита и проведены их лабораторные и межлабораторные испытания.

Работа выполнена в течение 2012–2015 гг. В 2014–2015 гг. работа производилась при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0020 от 05.06.2014).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Изготовление подложек белковых матриц может проводиться путем вырубки из синтетической бумаги Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8.

2. Для повышения производительности на наиболее трудоемких операциях изготовления набора могут использоваться автоматические устройства для нанесения антигенов на подложку и заполнения ячеек аналитических ванн.

3. Хромогенная система визуализации на основе коллоидного золота с физическим проявлением позволяет выявлять до 50 пг антител на подложке.

4. Набор для мультиплексного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусам краснухи, кори и паротита обеспечивает высокую чувствительность и

специфичность, позволяет визуально определять защитные уровни антител и может использоваться для комплексной оценки поствакцинального иммунитета.

### **Конкретное участие автора в получении результатов**

Вклад автора в представленные результаты заключается в личном участии во всех теоретических и экспериментальных исследованиях, обработке результатов и формулировании выводов. Все работы выполнены под руководством и в соавторстве с А.Г. Полтавченко. Часть исследований выполнена в соавторстве с А.П. Агафоновым, С.А. Пьянковым, П.В. Филатовым, А.М. Никоновым, Б.Н. Зайцевым, Н.А. Кривенчуком, В.П. Снопковым и Д.А. Буториным. Всем, принимавшим участие в данной работе, автор выражает искреннюю признательность. Особую благодарность автор выражает генеральному директору ЗАО «ИмДи» за материальную и техническую помощь в проведении экспериментов. За помощь в подготовке и оформлении работы автор благодарит М.Ш. Азаева, С.Х. Дегтярева, Н.А. Нетесову, Д.Н. Щербакова.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации представлены на следующих конференциях: 2-я междунар. конференция «Астана – БИОТЕХ 2011» (г. Астана, 10–11 октября 2011 г.); междунар. научно-практич. конференция «Актуальные проблемы науки» (г. Тамбов, 27 сентября 2011 г.); юбилейная всероссийская научная конференция «Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека» (С.-Петербург, 19–20 апреля 2012 г.); 2-я междунар. виртуальная интернет-конференция «Биотехнология. Взгляд в будущее» (г. Казань, 21 марта 2013 г.); международный Форум «Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Высокотехнологичная медицина как элемент инновационной экономики» (г. Новосибирск, 22–23 марта 2013 г.); научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (г. Новосибирск, 26-28 сентября 2013 г.), **личный доклад**; IV междунар. научн. интернет-конференция (г. Казань, 16–17 октября 2013 г.); II международная научно-практич. конференция «Модернизация аграрного образования: интеграция науки и практики» (Россия, г. Томск, 21–24 октября 2014 г.) **личный доклад**; III международная научно-практич. конференция «Научные перспективы XXI века.

Достижения и перспективы нового столетия» (Россия, г. Новосибирск, 15-16 августа 2014 г.); научно-технич. конференция «Реализация прикладных научных исследований и экспериментальных разработок, выполненных вузами и научными организациями Сибирского федерального округа в рамках участия в реализации федеральных целевых программ в 2014 году» (г. Кемерово, 16-17 декабря 2014 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации получено 2 патента РФ и опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 в центральных журналах, рекомендованных ВАК России для опубликования основных научных материалов кандидатских и докторских диссертаций.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 154 страницах, содержит 13 таблиц и 24 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, выводов, списка источников информации и 5 приложений. Список литературы включает в себя 187 источников, из них – 120 иностранных.

# **ГЛАВА 1 ДЕТСКИЕ УПРАВЛЯЕМЫЕ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ И ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА (Обзор литературы)**

## **1.1 Особенности детских вирусных управляемых инфекций**

### **1.1.1 Место краснухи, кори и эпидемического паротита в структуре инфекционной патологии**

Борьба с инфекционными заболеваниями является одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения. Человечество со времени своего возникновения находится в состоянии биологической войны с микроорганизмами [39]. Около 60 % всех регистрируемых болезней человека имеют инфекционную этиологию [57]. По данным ВОЗ, на долю инфекционных заболеваний приходится 24,7 % всех смертей в мире, ежегодно 16 млн человек погибает от инфекционных заболеваний. В некоторых странах, где здравоохранение слабо финансируется, этот показатель возрастает до 45 % и более [5]. В России ежегодно регистрируется до 35 млн случаев инфекционных заболеваний, а прямые и косвенные потери от них составляют около 15 млрд руб. [57]. Преждевременная смерть (в возрасте до 45 лет) в 48 % случаев имеют инфекционную природу [90, 110].

Особенно восприимчивы к инфекционным заболеваниям дети раннего возраста. Их физиологически незрелый организм ещё не приобрёл иммунитет и не сформировал в достаточной мере неспецифические защитные реакции на внедрение возбудителя. В результате этого у детей раннего возраста имеется склонность к генерализации процесса и развитию септических состояний, что нередко приводит к летальному исходу. В структуре детской смертности смертельные случаи от инфекционных заболеваний достигают 63 %. Некоторые широко распространённые заболевания вирусной и бактериальной природы выделены в группу детских инфекций. Это не означает, что им подвержены только дети. Просто уже первая встреча восприимчивого организма с возбудителем приводит к развитию заболевания и, в случае выздоровления, к стойкому пожизненному иммунитету [146]. Чаще это происходит в раннем детском возрасте после окончания естественного вскармливания и расширения круга общения ребёнка [14].

Детские вирусные инфекции, такие как корь, краснуха и эпидемический паротит (ЭП), занимают особое место, поскольку могут вызывать тяжёлые осложнения с различными медицинскими и социально значимыми последствиями. Кроме того, несмотря на разные клинические проявления эти заболевания имеют ряд общих эпидемиологических черт:

- все они строгие антропонозы, т.е. источником возбудителя может быть только больной человек, носительство вируса в открытой форме отсутствует, а других естественных резервуаров для возбудителя не существует;

- это высококонтагиозные инфекции с преимущественно воздушно-капельным путём передачи возбудителя;

- после заболевания остаётся стойкий, практически пожизненный иммунитет;

- химиотерапевтические средства для этих инфекций неэффективны и единственным способом борьбы с ними является вакцинопрофилактика;

- эти вирусы сравнительно консервативны, но достаточно пластичны, что позволяет создать эффективную живую вакцину.

### **1.1.2 Корь**

Корь (лат. *Morbilli*) – острое вирусное заболевание с высоким уровнем восприимчивости (индекс контагиозности около 100 %), протекающее с высокой температурой. Для кори характерны воспаление слизистых оболочек полости рта и верхних дыхательных путей, конъюнктивиты и характерная пятнисто-папулёзная сыпь кожных покровов, общая интоксикация и склонность к осложнениям.

Возбудитель кори (англ. *Measles virus*) – РНК-содержащий вирус семейства *Paramyxoviridae*. Вирус обладает гемагглютинирующей, гемолитической и симпластообразующей активностью. Геном вируса кори – несегментированная одноцепочечная РНК длиной около 16000 нуклеотидных оснований с молекулярной массой 4,5 кДа. РНК включает 6 генов, кодирующих 8 белков. До начала массовой вакцинации против кори все дикие штаммы были генетически гомогенны и существовали как единственная генетическая линия. Интенсивное использование коревых вакцин ускорило эволюцию вируса. Высокая частота мутаций, типичная для РНК-содержащих вирусов, в ряде случаев приводит к появлению штаммов, против которых вакцинные препараты недостаточно

эффективны [11]. Вирионы вируса кори в подавляющем большинстве представляют полиморфные, сферические, покрытые липидной оболочкой частицы диаметром 110–260 нм. Они содержат комплекс антигенов, наиболее важными из которых являются гемагглютинин, гемолизин, нуклеокапсид и мембранный белок. Наибольшей иммуногенной активностью обладает гемагглютинин. Вирус кори нестойк, малоустойчив к воздействию физических и химических факторов окружающей среды. Быстро инактивируется под действием ультрафиолетового света, нагревания и дезинфицирующих средств, склонен к аттенуации, ослабленные штаммы вируса используются для производства живой противокоревой вакцины [4].

Корь одна из самых распространённых инфекционных болезней на земном шаре. Она встречается повсеместно, при этом отмечается волнообразный характер заболеваемости, имеющей периодические подъёмы и спады с интервалами 2-3 года. Наибольшее число случаев заболевания приходится на осенне-зимний и весенний периоды. Болеют люди любого возраста, чаще дети 4–5 лет. Путь передачи инфекции – воздушно-капельный. Источником возбудителя инфекции является только больной человек, который заразен для окружающих с последних 2 дней инкубационного периода до 4-го дня высыпаний. С 5-го дня высыпаний больной считается незаразным [42]. Вирус выделяется во внешнюю среду с капельками слюны при разговоре, во время кашля, чихания. Несмотря на нестойкость вируса, известны случаи его распространения с воздушными потоками в домах, самолётах и в аэропортах, школах и детских садах, университетских общежитиях, клиниках и больницах [77, 131, 139]. Через предметы инфекция передаётся исключительно редко, но возможность такой передачи существует. После перенесённого заболевания сохраняется пожизненный иммунитет. Дети, родившиеся от перенёсших корь матерей, остаются невосприимчивыми к болезни до 3 месяцев, так как в течение этого периода в их крови сохраняются защитные материнские антитела. Лица, не болевшие корью и не привитые против неё, остаются высоко восприимчивыми к кори в течение всей жизни и могут заболеть в любом возрасте.

Осложнения при кори обуславливаются как самим вирусом, так и вторичной бактериальной флорой. Корь может вызвать энцефалит и пневмонию, которую

особенно тяжело переносят дети до 1 года. Нельзя не сказать и о таком тяжёлом медленно прогрессирующем дегенеративном заболевании, вызываемым этим вирусом, как подострый склерозирующий панэнцефалит (6–22 случая на 1 млн заболевших). По имеющимся данным, возможен вклад латентной коревой инфекции и в этиологию других хронических заболеваний, таких как системная красная волчанка, болезнь Педжетта, рассеянный склероз, гломерулонефрит [10].

В России корь была одной из самых распространённых болезней. Смертность среди детей до 3 лет достигала 40 %. В XX веке эпидемиологическая ситуация по кори претерпевала значительные изменения, в связи с чем в ней можно выделить несколько (исторических) периодов [4]. Динамика показателей заболеваемости в РФ за период с 1960 г. по 2008 г. приведена на рисунке 1.

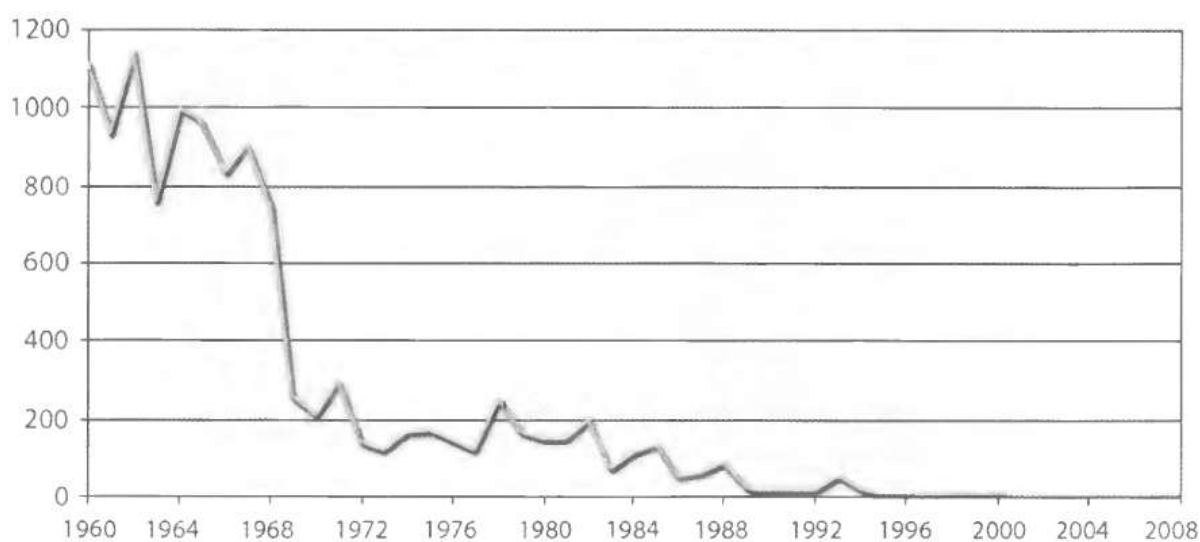


Рисунок 1 - Заболеваемость корью в РФ за 1960–2008 гг. на 100000 населения (по данным Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ)

Первый период был самым продолжительным, заболевания протекали тяжело, с высокой летальностью и закончился в 30-е гг. Эпидемии кори в эти годы возникали во всех странах Европы и Америки, за исключением изолированных, удалённых и островных популяций. Ежегодно в мире умирали миллионы людей, в основном это были дети. Так, только в Европе с 1900 по 1910 гг. погибло около миллиона человек. В СССР к 1920 г. корь занимала первое место среди детских инфекций, летальность от нее достигала 20–30 %, а у детей первых лет жизни до 50 %.

Начало второго периода относится к 30-м гг. и связано с появлением серопротекции. В борьбе с заболеванием использовали донорскую сыворотку.

Такой подход существенно не изменил показатели заболеваемости, но сдвинул её на более возрастные группы населения, значительно снизив летальность и оказав положительное влияние на локализацию очагов кори [3].

Третий период длился до середины 1960-х гг. и был связан с применением сульфаниламидных препаратов и антибиотиков. Такая терапия хотя и не снизила заболеваемость, но резко изменила частоту, характер и тяжесть осложнений. Почти полностью исчезли гнойные менингиты и плевриты, гангренозные процессы и другие осложнения бактериальной природы.

Четвёртый период начался с введением активной вакцинопрофилактики. Плановая вакцинация охватила всех детей от 1 года до 8 лет, не болевших корью. В результате массового применения живой коревой вакцины из штамма Ленинград-16 (Л-16) уже с 1970-х гг. произошло снижение заболеваемости корью в 8–16 раз. Кроме того, уже в первые годы вакцинации особо существенные изменения произошли в возрастной структуре больных. Если в допрививочный период во всех развитых странах мира большинство заболевших корью составляли дети в возрасте до 10–14 лет, то с введением прививок максимум заболеваемости стал приходиться на детей дошкольного возраста. Значительно снизились показатели смертности. Активная иммунизация против кори привела к тому, что высота эпидемических волн снизилась, а интервалы между ними увеличились. Кроме того, произошло изменение и характера сезонности. Так, в постпрививочный период сезонные подъёмы стали регистрировать не в осенне-зимний, а в зимне-весенний период, что связано с более медленным развитием эпидемического процесса при возросшей иммунной прослойке населения. Уже с середины 1970-х гг. на всей территории бывшего СССР в 60–80 % случаев стали регистрировать очаги с 1–2 случаями кори [4].

Специфическая профилактика и также проведение эпидемиологического надзора за коревой инфекцией кардинально повлияли на эпидемическую ситуацию. В 2005 году заболеваемость составила 0,3 на 100 тысяч населения и была самой низкой за всё время регистрации этой инфекции. Анализ показателей специфического иммунитета выявил, что в целом по стране защищено против кори 81 % населения [56]. В последние годы характер эпидемического процесса кори в России всё больше зависит от эпидемиологической обстановки в сопредельных

государствах. В нашей стране в настоящее время в основном регистрируют завозные случаи кори. Участвовавшие заносы кори в подростковые и взрослые (80 % заболевших) коллективы во многом связаны с усилившимися в стране, особенно в крупных городах, миграционными процессами, что существенно повышает риск заражения корью лиц старшего возраста и приумножает число источников инфекции среди этого контингента населения. «Повзросление» кори привело к увеличению в структуре заболеваемости удельного веса тяжёлых и среднетяжёлых клинических форм. Между коэффициентом тяжести и заболеваемостью взрослых выявлена прямая связь [4]. Наряду с этим следует отметить, что случаи заболевания выявляются и среди вакцинированных.

Широкое применение противокоревых вакцин привело к резкому снижению заболеваемости и ликвидации эндемичной кори в некоторых странах. По прогнозным оценкам ВОЗ, за период 2000–2013 гг. вакцинация от кори предотвратила 15,6 млн случаев смерти [65]. Однако и сейчас во всём мире корь остаётся одной из основных причин смерти среди детей раннего возраста. По оценкам специалистов ВОЗ [16], в последние годы в мире ежегодно регистрируется до 30 млн случаев кори, из них от 50 тыс. до 150 тыс. заканчиваются летально, причём большинство смертей приходится на детей в возрасте до пяти лет.

### 1.1.3 Краснуха

Краснуха – антропонозное, острое, респираторно-вирусное заболевание, с аспирационным механизмом передачи возбудителя, характеризуемое умеренной интоксикацией, увеличением лимфатических узлов, мелкопятнистой сыпью. Особенно опасно первичное заражение краснухой беременных, поскольку вирус обладает высокой проникающей способностью через плаценту и выраженным тератогенным действием на плод, вызывая развитие синдрома врождённой краснухи (СВР) [38].

Вирус краснухи (*Rubella virus*), относится к роду *Rubivirus* семейства *Togaviridae*. Геном вируса краснухи представлен несегментированной одноцепочечной РНК длиной около 10000 нуклеотидов с молекулярной массой 3500 кДа. Геном кодирует 3 структурных (С, Е1 и Е2) и 2 неструктурных белка (NSP1 и NSP2). Известен только один естественный вариант антигенной структуры вируса краснухи. Высокая частота мутаций, типичная для РНК-содержащих

вирусов, приводит к появлению популяционной структуры (не такой значительной, как для вирусов кори и паротита), состоящей из достаточно большого числа микровариантов. Появление новых микровариантов позволяет обеспечить быструю адаптацию вирусной популяции к новому окружению. В частности, эта вирусная популяция не только становится резистентной к химиопрепаратам (ингибиторам вирусной репликации), но в ней появляются новые мутанты, способные обходить вакцинный прессинг [11]. Вирионы в подавляющем большинстве представляют сферические, покрытые липидной оболочкой частицы диаметром 40–70 нм. Липидная оболочка покрывает нуклеокапсид икосаэдрической формы, содержащий РНК и капсидный белок. Вирус обладает цитопатической, гемагглютинирующей и гемолизирующей активностью. Чувствителен к факторам окружающей среды, теряет свою активность при ультрафиолетовом облучении и разрушается жирорастворителями [3].

Краснуха распространяется преимущественно среди тесно контактирующих групп населения – чаще всего детей, но могут быть и взрослые (военские контингенты, студенты высших учебных заведений и др.). Для заражения краснухой необходим более длительный период и более тесный контакт с больным, чем для заражения корью. Однократного контакта, как правило, недостаточно, что отличает краснуху от кори, ветряной оспы и эпидемического паротита. Многолетние наблюдения медицинских работников подтверждают тот факт, что для заражения краснухой необходимо 2–4 контакта с больным, поэтому краснуху ещё называют болезнью тесного контакта [4].

В отличие от кори и эпидемического паротита, краснуха – достаточно лёгкое заболевание с редкими осложнениями в виде панкреатита, энцефалита и тромбоцитопении. Опасность вируса краснухи заключается в тератогенных свойствах, особенно в 1-м триместре беременности, вызывающих у детей СВК с осложнениями в виде врождённых пороков сердца, катаракты, слепоты, глухоты, умственной отсталости, микроцефалии, поражения органов брюшной полости, мочеполовой, пищеварительной, костной и других систем [145, 179]. Сочетанные аномалии развития плода выявляют в 60–70 % случаев. Тяжёлое течение внутриутробной инфекции приводит к спонтанным абортam (10–40 %), мертворождению (20 %); летальность новорождённых может достигать 10–20 %.

Известна эпидемия периода 1960–1966 гг., когда в США заболело более 50 тыс. женщин, что привело к рождению 20 тыс. детей с СВК и к 10 тыс. выкидышей и мертворождённых [10].

Заболеваемость краснухой в довакцинальный период (до 70-х гг. XX в.) в среднем составляла 200–300 человек на 100000 населения, а в условиях крупных эпидемических подъёмов этот показатель поднимался до 1500–2500. Динамика заболеваемости краснухой за период с 1978 г. по 2008 г., по данным Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, приведена на рисунке 2.

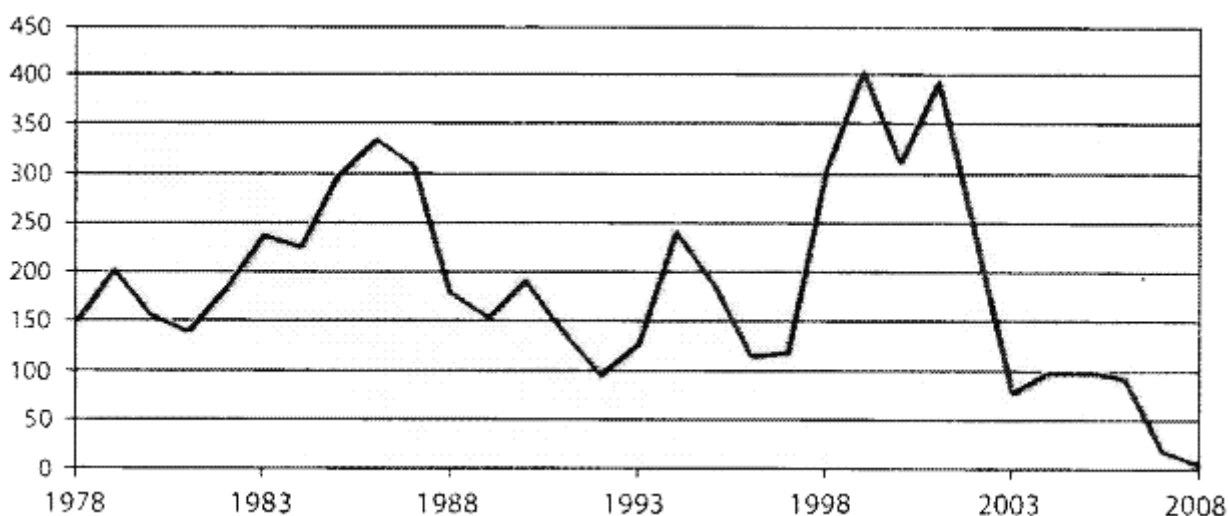


Рисунок 2 - Заболеваемость краснухой в России за 1978–2008 гг. на 100000 населения (по данным Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ)

Вакцинопрофилактика краснухи в РФ была введена в 1997 г. [37]. Однако очень низкий охват прививками в 1998–2001 гг. (не осуществлялась закупка импортных вакцин из-за отсутствия средств в бюджете) не изменил в лучшую сторону эпидемиологическую обстановку. В 1999 и 2001 гг. в РФ возникали чрезвычайно интенсивные периодические подъёмы заболеваемости краснухой. В 2001 г. этот показатель в целом по РФ составил 393,7 на 100000 населения. Наиболее незащищёнными оказались дети дошкольного возраста. Так, в 2000 г. по Москве показатель заболеваемости краснухой детей от года до 6 лет достиг 1850 и в 17–32 раза был выше, чем у взрослых. В целом по России 20–25 % случаев заболеваний приходились на лиц старше 15 лет. При такой заболеваемости ожидаемое число случаев СВК должно было превышать 500–700 в год. К сожалению, точность учёта СВК в России до сих пор низка.

Учитывая чрезвычайную актуальность профилактики СВК для здравоохранения, 48-я сессия Европейского регионального бюро ВОЗ в сентябре

1998 г. включила краснуху в число инфекций, борьба с которыми будет определяться целями программы «Здоровье для всех в XXI веке». В 2006–2008 гг. достигнут существенный спад заболеваемости. Прежде всего, он связан с проведением на территории РФ в 2006–2007 гг. мероприятий в рамках приоритетного национального проекта, имеющего целью стабильное снижение заболеваемости краснухой до 10 заболевших на 100000 населения и ликвидацию врождённой краснухи. В 2006 г. провакцинированы 5 млн, а в 2007 г. – 10 млн человек. Выполнение национального проекта позволило снизить число заболеваний в России в 2007 г. до 30934 случаев (21,61/100000 населения). Почти 70 % заболевших краснухой составляли дети до 14 лет. По сравнению с 2006 г. этот показатель снизился в 43 раза. Ещё больших результатов удалось достичь в 2008 г. Заболеваемость краснухой по сравнению с 2007 г. снизилась более чем в 3,5 раза, достигнув показателя 6,79 на 100000 населения. Почти 60 % заболевших были детьми до 14 лет [12]. Массовая иммунизация существенно сократила число восприимчивого населения и обусловила филогенетические изменения изолятов вируса краснухи. В последнее время на территории России продолжают циркулировать эндемичные дикие штаммы вируса краснухи с генотипом 2с, однако начинают преобладать штаммы генотипа 1е, завозимые из сопредельных государств и из отдалённых регионов земного шара. Активный эпидемиологический надзор, правильно выбранные стратегия и тактика вакцинопрофилактики краснухи подтверждают, что краснуха – управляемая инфекция, и её ликвидация – лишь вопрос времени [112].

### **1.1.3 Эпидемический паротит**

Эпидемический паротит – острая антропонозная, вирусная болезнь с аспирационным путём передачи возбудителя, характеризующаяся лихорадкой, общей интоксикацией, увеличением одной или нескольких слюнных желёз, нередко поражением других органов и центральной нервной системы. Часто при ЭП регистрируются орхиты с последующим бесплодием [119]. Как у взрослых, так и у детей паротитная инфекция нередко проявляется серозными менингитами, которые почти всегда проходят самостоятельно, однако поражение черепно-мозговых нервов чревато остаточными дефектами, в частности тугоухостью. Паротитные энцефалиты более редки, но всегда протекают с высокой лихорадкой,

выраженными нарушениями сознания и очень часто также приводят к остаточным дефектам. К редким проявлениям ЭП относится и ряд других осложнений, таких как миокардит, мастит, тиреоидит, неврит, артрит и тромбоцитопеническая пурпура [53, 103].

Возбудитель паротита (англ. *Mumps virus*) – вирус из семейства Paramyxoviridae. Вирус обладает гемагглютинирующей, нейраминидазной и гемолитической активностью. Геном вируса паротита представлен несегментированной одноцепочечной РНК с молекулярной массой 8 мДа, кодирующей 8 белков, в т.ч. гемагглютинин, гемолизин и белки нуклеокапсида. Гемагглютинины вируса имеют штаммовые особенности. Вирионы имеют вид полиморфных, округлых частиц диаметром 120–300 нм. Вирус нестойк, инактивируется при нагревании и ультрафиолетовом облучении, а также контакте с жирорастворителями, 2 %-м раствором формалина, 1 %-м раствором лизола. Аттенуированный штамм вируса Ленинград-3 (Л-3) используют в качестве живой вакцины. Он содержит антигены, способные вызвать образование нейтрализующих и комплементсвязывающих антител, а также аллерген, который можно использовать для постановки внутрикожной пробы [3].

Болезнь распространена повсеместно. Отмечают периодические подъёмы заболеваемости с интервалом 7–8 лет. В довакцинальный период заболеваемость регистрировали преимущественно среди детей раннего возраста (3–6 лет). В последние годы отмечен сдвиг заболеваемости на старшие детские возрастные группы населения (5–15 лет). Лица мужского пола болеют паротитом чаще, чем женщины. Эпидемические вспышки можно наблюдать в любое время года, но чаще всего повышение заболеваемости приходится на осень и зиму, т.е. в период скученности детей и подростков в закрытых помещениях. Среди взрослого населения повышенную заболеваемость регистрируют в закрытых и полужакрытых коллективах (казармах, общежитиях и т.д.). Для эпидемического паротита характерна выраженная очаговость: почти в четверти детских учреждений регистрируют очаги с 15 случаями заболевания и более. В детских учреждениях вспышки протекают длительно, заболеваемость волнообразная из-за большой продолжительности инкубационного периода и не выявления части больных со стёртой клинической картиной [4].

Резервуар и источник инфекции – человек с манифестной или субклинической формой паротита. Больной становится заразным за 1–2 дня до появления клинических симптомов и выделяет вирус первые 5–7 дней болезни. Время репликации – 12–14 ч. Важную эпидемиологическую роль играют больные не только с типичными, но и со стёртыми и бессимптомными формами заболевания, составляющими 25–50 % всех случаев инфекции [12].

Механизм передачи – аэрозольный, путь передачи – воздушно-капельный, хотя нельзя полностью исключить возможность передачи возбудителя через предметы (игрушки, посуду и т.п.), загрязнённые слюной больного незадолго до контакта со здоровым. Возможна и трансплацентарная передача возбудителя. Естественная восприимчивость людей высокая (50 %). Дети до года болеют нечасто вследствие редких контактов с больными и наличия материнских антител. Постинфекционный иммунитет длительный и стойкий. После вакцинации формируется стойкий иммунитет на протяжении 20 лет. Не иммунизированные люди восприимчивы в любом возрасте. Выборочные серологические обследования показали, что 34–43 % взрослого населения восприимчиво к возбудителю. В разных возрастных группах удельный вес серонегативных лиц варьирует в среднем от 25 % среди привитых детей 3 лет до 33 % среди 30–40-летних людей [4].

Несмотря на лёгкое течение, при ЭП возникали осложнения в виде менингитов, панкреатитов, орхитов, а также неврологических расстройств [180]. В последнем случае это могло стать причиной мужского бесплодия.

Несмотря на то, что заболевание известно со времен Гиппократов, а возбудитель ЭП выделен в 1934 году, болезнь остаётся не до конца изученной. В течение длительного времени заболеваемость ЭП остается удивительно стабильной. Число заболевших находится в прямой зависимости от численности населения. Анализируя заболеваемость по мировым регионам, следует отметить, что почти все страны эндемичны по ЭП. Заболевание встречается в виде спорадических случаев и эпидемических вспышек, причём вспышки возникают там, где скопление людей способствует распространению вируса. В СССР в допрививочный период крупные вспышки эпидемического паротита (600–950 чел. на 100000 населения) чередовались со спадами заболеваемости (300–500 чел. на 100000 населения). ЭП стали официально регистрировать с 1954 г. Заболеваемость

была повсеместной, высокой, характеризовалась периодическими подъёмами и сезонностью. В отдельные годы в стране выявляли больше 500000 больных (1961 г. – 602600, 1964 г. – 758000, 1968 г. – 651000, 1979 г. – 685000, 1982 г. – 674000) [4]. Динамика заболеваемости ЭП в России, по данным Федерального центра Госсанэпиднадзора Министерства здравоохранения РФ, за период с 1960 по 2008 гг. приведена на рисунке 3.

Эпидемический процесс имел циклический характер с продолжительностью цикла 3–4 года, включая предэпидемический, эпидемический (год максимальной заболеваемости) и 1–2 межэпидемических года. Среднегодовая заболеваемость за цикл, независимо от величины города, была практически одинакова и составляла 500–600 заболевших на 100000 населения. В зарубежных странах, по данным Э.Р. Пилле и А.П. Андреевой, с 1960 г. по 1969 г. этот показатель колебался в очень широких пределах [29].

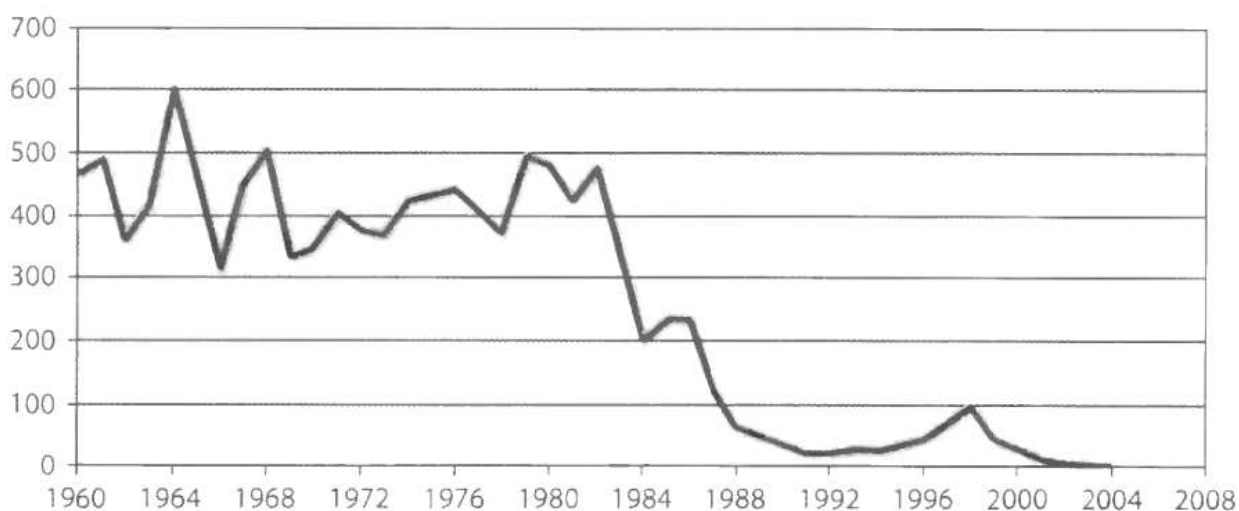


Рисунок 3 - Заболеваемость эпидемическим паротитом на 100000 населения в России за 1960–2008 гг. (по данным Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ)

Активная борьба с ЭП в нашей стране началась с 1981 г., когда в календарь прививок была внесена вакцинация против эпидемического паротита. Однако введение однократной прививки оказалось недостаточной мерой для формирования напряжённого и длительного иммунитета [59, 62]. В 1998 г. в календарь прививок была внесена 2-я ревакцинирующая прививка. Специфическая профилактика ЭП в России позволила ликвидировать смертность, существенно снизить заболеваемость и облегчить течение болезни. Следует отметить, что в странах, где проводится массовая вакцинация населения, заболеваемость ЭП у

детей смещается в сторону старшего детского и подросткового возраста [78, 106, 140, 154, 169, 180]. Существует несколько гипотез, объясняющих причины «повзросления» заболевания. Одни исследователи считают, что такой эффект связан с увеличением среди вакцинированного населения доли 10–19-летних лиц, имеющих низкий титр специфических антител к вирусу паротита [78]. Другие – связывают это с тем, что циркулирующие дикie штаммы вируса паротита отличаются от вакцинных штаммов, в связи с чем вакцинация может быть не эффективна. Третьи – предполагают, что дикie штаммы вируса паротита со временем эволюционируют под влиянием внешних условий [162].

За годы активной плановой иммунизации заболеваемость ЭП в России снизилась с 500–600 случаев (в 60-е годы) до уровня 1 заболевания на 100000 населения в 2010–2013 гг. Однако, несмотря на общую картину снижения заболеваемости, до сих пор в регионах РФ периодически возникают вспышки эпидемического паротита. Во многих странах мира опасность ЭП оценивают недостаточно и сохранившиеся на отдельных территориях очаги заболевания при современных потоках миграции могут служить источниками возникновения вспышек не только в сопредельных, но и географически отдаленных странах [12].

## **1.2 Борьба с детскими вирусными инфекциями**

### **1.2.1 Проекты снижения и элиминации ДВВИ**

Управляемость ДВВИ даёт практическому здравоохранению реальные возможности осуществлять конкретные мероприятия по предотвращению эпидемического подъема вплоть до ликвидации заболеваний в отдельных регионах, а в дальнейшем и в глобальном масштабе [8].

В 1990 году ВОЗ определило две перспективные задачи: добиться к 1995 году снижения смертности от кори на 95 % и снижения заболеваемости корью - на 90 %. В рамках «Расширенной программы иммунизации» сформулированы дополнительные задачи: достижение во всех странах охвата вакцинацией на первом году жизни не менее 90 % и снижение летальности от кори до уровня менее 1 %. Ни одной из этих целей полностью достигнуть не удалось, однако, к концу 1995 года примерно в 2/3 стран - членов ВОЗ заболеваемость корью снизилась на 90 % и примерно в 1/2 стран мира смертность от кори уменьшилась на 95 % и более [16].

Эти успехи позволили сформулировать задачу ликвидации кори (снижение показателя заболеваемости до нуля) на отдельных географических территориях. Возможность элиминации кори базируется на следующих научных предпосылках [35]:

- во всем мире имеется единый антигенный вариант вируса кори;
- после заболевания корью остается стойкий, практически пожизненный иммунитет;
- вирус кори не имеет других экологических ниш, кроме человека;
- отсутствует носительство вируса кори в открытой форме;
- вирус кори характеризуется определенной пластичностью, что позволяет создать высоко иммуногенную аттенуированную вакцину.

В 1994 году Американский регион первым провозгласил своей целью ликвидацию кори к 2000 году. В 1998 году еще два региона поставили задачу ликвидации кори: Европейский регион к 2007 году, Восточно-средиземноморский – к 2010 году. В 2003 г. в России разработана национальная программа элиминации кори [35], что позволило ей включиться в региональную программу ВОЗ. Мероприятия, предусмотренные национальной программой, планировалось осуществлять в три этапа:

1. 2002-2004 гг. - достижение повсеместной стабилизации показателей заболеваемости корью на спорадическом уровне на всех территориях России.
2. 2005-2007 гг. - создание условий для предупреждения возникновения случаев кори и полного искоренения коревой инфекции в России.
3. 2008-2010 гг. - сертификация территорий, свободных от кори.

Учитывая тот факт, что большинство Европейских стран, помимо ликвидации кори, решают задачи профилактики краснухи и СВК, а также то, что профилактика кори, краснухи и ЭП проводится одновременно, а часто и путем введения комбинированной вакцины к трем заболеваниям, национальная программа элиминации кори была дополнена мероприятиями по снижению заболеваемости краснухой и ЭП. Ликвидация этих заболеваний может быть достигнута только при условии создания у населения надежного коллективного иммунитета против этих инфекций. Поэтому основные усилия были направлены на обеспечение высокого охвата и своевременности прививок [1, 45, 152].

В 2005 году Россия вступила во второй этап реализации программы ликвидации кори к 2010 году, основной задачей которого является создание условий для предупреждения возникновения и распространения этой инфекции. Экспертами ВОЗ установлен регламентированный показатель элиминации кори в европейском регионе менее одного случая на миллион населения. Такой уровень заболеваемости к 2010 году достигнут на основной части территории страны, что позволило начать в России (первой из стран Европейского региона) процедуру сертификации территории, как свободной от эндемичной (местной) кори. За этот же период заболеваемость краснухой и ЭП в России снизилась до единичных случаев на 100000 населения [35, 36].

Однако с 2011 года в странах Европейского региона и ряде регионов России эпидемиологическая ситуация по кори осложнилась. В 38 странах Западной Европы в 2011 году региона зарегистрировано более 25,8 тыс. случаев заболеваний. Среди них крупные вспышки регистрировались в Грузии (7456 случаев), в Турции (7115), на Украине (2155), в Германии (1097), Великобритании (1869), Италии, Азербайджане, Нидерландах, Румынии [118]. Неблагополучие по кори в Европе и Азии повлияло на рост заболеваемости корью на территории Российской Федерации. Как следует из письма руководителя Роспотребнадзора Геннадия Онищенко от 09.06.2012 № 01/6597-12-32, в 2011 году было зарегистрировано 429 очагов инфекции — 627 случаев в 30 субъектах РФ, что в 5 раз больше по сравнению с аналогичным периодом 2010 года. А за первые 4 месяца 2012 года корь диагностирована у 1714 пациентов в 50 субъектах. Наиболее заметные вспышки кори происходили в 2012 году в Санкт-Петербурге [2], а в 2013 году в Курской, Московской, Амурской, Ростовской, Тульской областях, Республике Северная Осетия (Алания), Ямало-Ненецком автономном округе и др. регионах, в 2014 году в Москве и Курске. Отмечен рост заболеваемости краснухой, например, в Японии в 2014 году выявлено 40 случаев с синдромом врожденной краснухи [160]. В последние годы мы стали свидетелями возрождения эпидемического паротита во многих странах, где, казалось бы, контроль за заболеванием уже был достигнут с помощью вакцинации. В настоящее время сохраняются значительные колебания показателей заболеваемости ДВВИ на разных территориях, в том числе и в России, наблюдается активное включение в эпидемический процесс подростков (15-17 лет)

и лиц старшего возраста, обусловленное недостаточным уровнем коллективного противокоревого иммунитета. Преимущественно заболевают не привитые дети, но около половины заболевших составляют взрослые с неизвестным прививочным анамнезом и привитые. [78, 106, 140, 169, 180].

Сложившееся положение было рассмотрено в 2010 г. на 60-й сессии Европейского регионального комитета ВОЗ и, принимая во внимание реальность, срок достижения элиминации кори и краснухи в регионе был перенесен на 2015 год. Однако, еще более усложнившаяся в 2012-2013 гг. эпидемиологическая ситуация заставила в феврале 2013 г. вновь вернуться к этому вопросу на совещании ВОЗ, где представители от 11 государств признали, что, несмотря на несомненные и значительные успехи, прогресс в деле ликвидации кори застопорился и корь с краснухой (СВК) возможно ликвидировать только к 2020 году. Утвержден стратегический план (GVAP - Global Vaccine Action Plan) [186], предполагающий к 2020 г. осуществить ликвидацию кори и краснухи в пяти регионах мира, и описывающий стратегии достижения этой цели [93].

Причину ухудшения ситуации в ВОЗ видят в снижении выделяемых национальными правительствами средств на вакцинацию и другие мероприятия в сфере здравоохранения. А также в трудностях с проведением иммунизации населения в зонах конфликтов, где много беженцев и перемещенных лиц, а системы здравоохранения ослаблены. Кроме того, ситуацию усугубила вспышка лихорадки Эбола, осложнившая борьбу с корью в ряде стран Западной Африки. Призывая не экономить на иммунизации населения, ВОЗ подчеркивает, что стоимость профилактических мер невелика, в то время, как «провал вакцинации детей против кори подвергает их риску опасных осложнений для здоровья». Успехи в борьбе с ДВВИ зависят, прежде всего, от правильно выбранных стратегии и тактики вакцинации, уровня охвата прививками и качества вакцинного препарата. При этом огромное значение имеет глобальная синхронность и слаженность противоэпидемических мероприятий во всех мировых регионах. Однако, во многих странах мира значимость борьбы с этими инфекциями до сих пор недооценивают, что создает условия для сохранения очагов заболеваний на отдельных территориях и их экспорта в другие страны [11, 12, 186].

Из других причин ухудшения эпидемиологической обстановки, наряду с неполным охватом вакцинацией, выделяются: недостаточная эффективность применяемых вакцин, нарушение правил обращения с вакцинами и истощение прививочного иммунитета у старших возрастных групп. Вследствие этих причин, несмотря на массовые прививки, значительная часть населения не обладает защитным иммунитетом и нуждается в дополнительной вакцинации [36]. Анализ показателей специфического иммунитета выявил, что в целом по стране защищено против кори 81 % населения. По результатам оценки напряженности иммунитета и анализа заболеваемости установлено, что в настоящее время контингентами, определяющими заболеваемость ДВВИ, являются подростки и взрослые, среди которых имеется значительное количество лиц, восприимчивых к инфекции, в том числе, среди привитого населения [65].

При реализации программы элиминации ДВВИ в условиях низкой заболеваемости существенно возрастает роль серологического мониторинга, позволяющего своевременно определить группы и территории риска и выяснить причины увеличения числа серонегативных лиц. Это предполагает организацию широких лабораторных обследований на напряжённость иммунитета к ДВВИ всех медицинских работников, работников сферы обслуживания, лиц, работающих с детьми и подростками, и выборочное обследование различных групп детского и взрослого населения. Полная и достоверная информация не только о заболеваемости, но и о состоянии специфического иммунитета в разных возрастных группах населения, позволит прогнозировать эпидситуацию и дифференцированно проводить оперативные мероприятия на разных территориях [59].

### **1.2.2 Вакцины**

Открытие принципа активной иммунизации дало человечеству эффективное оружие для борьбы с инфекционными болезнями, особенно с вирусными инфекциями, для которых нет средств этиологического лечения. В настоящее время вакцинопрофилактику считают одним из основных методов достижения здоровья каждого человека из любой социальной группы в развитых и развивающихся странах. Общеизвестно, что вакцины снижают детскую смертность, увеличивают ожидаемую продолжительность жизни и способствуют сохранению активного

долголетия. Успех иммунопрофилактики во многом определяется качеством и правильностью применения вакцинных препаратов [8].

В настоящее время в мире в основном используют 8 вакцинных штаммов вируса кори (Шварц, Моратен, Эдмонстон, Эдмонстон-Загреб, Шанхай-91, САМ 70, TD 97 и Л-16). Для профилактики кори в РФ ранее использовали живую вакцину из штамма Ленинград-16 (Л-16) производства Московского предприятия бактериальных препаратов ФГУП «НПО Микроген». Производственный штамм вируса кори Л-16 обладает строгой специфичностью, высокой активностью и репродуктивностью, не токсичен, не контагиозен и не анафилоктогенен, не обладает нейровирулентными свойствами и бактериологически стерилен. Все эти параметры качества регламентированы фармакопейной статьей ФС-42-3092-00 от 15.06.2000 г. Вакцина из штамма Л-16 слабореактогенна, осложнения у привитых лиц развиваются крайне редко. Возможны редкие вакцинальные реакции в виде повышения температуры, катаральных явлений (кашель, незначительный конъюнктивит, ринит), не обильных высыпаний. Осложнения у привитых ЖКВ редки, однако возможны [11].

Для активной иммунизации против эпидемического паротита использовались как инаktivированные, так и живые противопаротитные вакцины. Убитые вакцины готовились из инаktivированной формалином ткани околоушных слюнных желез зараженных обезьян или из культурального вируса паротита, убитого ультрафиолетовым облучением или формалином. Хотя убитые вакцины были эффективны при иммунизации отдельных контингентов, они не нашли широкого практического применения [58]. А.А. Смородинцевым и И.С. Клячко была разработана первая отечественная, живая паротитная вакцина, приготовленная на развивающихся куриных эмбрионах из штамма «СК», но по ряду технологических причин не нашла широкого применения в практике здравоохранения. В настоящее время в России используется живая моно- и диавакцина (ЖПВ и АПКВ) на основе штамма Ленинград-3 (Л-3), выращенного на культуре фибробластов эмбрионов японских перепелов. Она обеспечивает сероконверсию у 92–95 % привитых детей и 92–99 % эпидемиологическую эффективность [15]. В других странах применяют различные вакцинные штаммы вируса ЭП. Наиболее широкое применение нашли штаммы: Джерил-Линн (США),

Rit 43/85 (дериват из штамма Джерил-Линн) (США), Л-3 (Россия), Ленинград-Загреб (территории бывшей Югославии) и Urabe (Япония) [12].

Отечественной лицензированной краснушной вакцины в России нет, хотя исследования и разработка такого препарата были предприняты еще в конце 1960-х гг. В нашей стране для профилактики краснухи используют зарубежные препараты, зарегистрированные на нашей территории:

- «Рудивакс» фирмы «Авентис Пастер» (Франция) - живая краснушная вакцина из аттенуированного штамма Wistar RA 27/3 вируса краснухи, культивируемого на диплоидных клетках человека.

- «Эрвевакс» фирмы «ГлаксоСмитКляйн» (Великобритания) и «ГлаксоСмитКляйн-Биомед» (Россия) - живая краснушная моновакцина из аттенуированного штамма Wistar RA 27/3 вируса краснухи, культивируемая на диплоидных клетках человека.

- Краснушная вакцина производства «Серум Инститьют» (Индия) массово использовалась в РФ с 2002 по 2007 г. Вакцина аттенуированная, лиофилизированная, готовится из штамма Wistar RA 27/3 вируса краснухи на диплоидных клетках человека. В отличие от всех вакцин, лицензированных в РФ, она не содержит антибиотиков.

- В 2008 г. в России прививали моновакциной на основе штамма Wistar RA 27/3, которая поступала из Хорватии, а фасовка осуществлялась на Московском предприятии бактериальных препаратов ФГУ «НПО Микроген» [12]. Все перечисленные выше вакцины вводят подкожно или внутримышечно.

В результате многолетних исследований выявлено сходство эпидемиологических характеристик кори, краснухи и эпидемического паротита, что позволило использовать единые подходы к управлению эпидемическим процессом трех инфекций [18]. На сегодняшний день активная вакцинопрофилактика краснухи, кори и паротита осуществляется в основном комбинированными препаратами (корь-паротит, корь-краснуха, корь-краснуха-паротит). Актуальность внедрения в детскую практику комбинированной вакцинации очевидна, и связано это, прежде всего с тем, что большинство противовирусных и антибактериальных вакцин вводят детям в 1-2 годы жизни. Перегруженность календаря прививок в это время очень ощутима, особенно если

учитывать, что маленькие дети часто имеют отводы по медицинским показаниям. В этот период желательна одномоментная вакцинация детей против кори, краснухи и ЭП, поскольку она решает сразу несколько проблем. Программы вакцинопрофилактики с использованием комбинированных ди- и тривакцин экономически выгодны и безопасны. Это было доказано исследованиями, проведенными в РФ, Белоруссии, а также в Дании, Финляндии, Норвегии, США, Франции и другими странами [11].

В России используется отечественная ассоциированная паротитно-коревая вакцина (АПКВ), которая с 2001 г. выпускается на Московском предприятии бактериальных препаратов ФГУП «НПО Микроген». Риск возникновения аллергических реакций немедленного типа от нее минимален. Тем не менее, педиатры рекомендуют, проводя иммунизацию живыми вакцинами (которые, по мнению ряда исследователей, могут сохранять иммуносупрессивные свойства дикого вируса), предупреждать развитие заболеваний и обострение тех состояний, которые имелись у ребенка ранее [19, 143]. С целью профилактики осложненного течения поствакцинального периода, стимуляции специфического иммунитета необходимо регулярно назначать комплексы витаминов и микроэлементов [54].

Кроме отечественной АПКВ, на территории РФ лицензированы и применяются другие комбинированные вакцины (корь-краснуха-паротит) производства зарубежных фирм. Первым из комбинированных препаратов зарегистрирована вакцина MMRII фирмы «Merck Sharpe&Dohme» (США), созданная в отличие от аналогичных вакцин других стран, на основе вакцинного штамма вируса кори Эдмонстон, вируса краснухи Wistar RA 27/3 и вируса паротита Джерил-Линн. За 32 года существования «MMRII» по всему миру было распространено более полумиллиарда доз вакцины, что доказывает ее высокую иммуногенность, безопасность и хорошую переносимость [67, 135]. Поскольку после введения первой дозы вакцины «MMRII» титр антител к эпидемическому паротиту может значительно снижаться к 10 месяцам, вакцину рекомендовано вводить двумя дозами (в 8 и 12 месяцев) [110, 113].

В 2000 г. в РФ была зарегистрирована тривакцина «Приорикс» фирмы «GlaxoSmithKline» (Англия, Бельгия). Она представлена аттенуированными штаммами вирусов кори, ЭП и краснухи, выращенными отдельно (вирусы кори и

ЭП - на культуре клеток куриного эмбриона, а вирус краснухи на диплоидных клетках человека).

Совсем недавно была лицензирована тривакцина (корь-краснуха-паротит) производства «Серум Инститьют», Индия. В этой тривакцине в качестве коревого компонента использован штамм Эдмонстон-Загреб, паротитного - штамм Ленинград-Загреб и краснушного - штамм Wistar RA 27/3.

Сравнительное исследование трех указанных выше вакцин позволило сделать следующие выводы: после вакцинации индийской вакциной средний уровень антител был значительно ниже против кори и особенно низок (2-20 раз) против вируса ЭП, чем при использовании двух других вакцин. Ревакцинация ранее вакцинированных подростков препаратами «MMRII» и «Приорикс» давала одинаково высокие результаты [174]. В другом исследовании отмечено, что отечественная паротитно-коревая вакцина и тривакцины корь-паратит-краснуха зарубежного производства («MMRII» и «Приорикс») обладали равноценной иммуногенной эффективностью. Результаты исследования свидетельствовали об идентичности иммуногенной активности вакцинных штаммов вируса паротита Л-3 и Джерил-Линн. Однако, гуморальный иммунитет у привитых дивакциной, по сравнению с привитыми тривакцинами, характеризовался большей напряженностью и сохранялся стабильным на протяжении пятилетнего срока наблюдения [40].

Национальный календарь профилактических прививок России (последняя редакция принята в 2014 г.) соответствует рекомендациям ВОЗ, но отличается от национальных календарей, других стран [22]. Он предусматривает вакцинацию против кори, краснухи и ЭП детей в 12-месячном возрасте и ревакцинацию – в 6 лет. Вакцинация осуществляется сертифицированными в России моно- или комбинированными препаратами. Кроме того, прививкам моновакцинами от кори подлежат дети от 1 года до 18 лет (включительно) и взрослые в возрасте до 35 лет (включительно), не болевшие, не привитые, привитые однократно или не имеющие сведений о прививках против кори; а вакцинации от краснухи - дети от 1 года до 18 лет, женщины от 18 до 25 лет (включительно), не болевшие, не привитые, привитые однократно против краснухи или не имеющие сведений о прививках против краснухи.

Для того, чтобы сделать оптимальный выбор вакцины и дать пациентам обоснованные рекомендации, необходимо обладать знаниями о реактогенности и иммуногенности препаратов, а также иметь оперативную информацию об изменениях стратегии и тактики вакцинопрофилактики, о возможных отдаленных последствиях применения того или иного иммунобиологического препарата или последствиях отказа от его использования.

Важной задачей является сохранение качества вакцин при транспортировке, хранении и обращении с ними. Например, при транспортировке вакцин паротита термическая нестабильность вируса может привести к потерям в эффективности вакцины, так как ее эффективность диктуется жизнеспособностью вируса [170]. Улучшение качества и стабильности препаратов - основная проблема при производстве вакцин, на которой сосредоточены усилия большой когорты ученых. Некоторые производители рекомендуют для сохранения жизнеспособности вакцинных штаммов паротита стабилизатор, содержащий трегалозу [120].

Иммуногенность является одним из основных критериев качества и эффективности живых комбинированных вакцин. Изучение этой характеристики комбинированных ди- и тривакцин показало, что иммуногенность коревого и краснушного компонентов составляет около 95 %, а паротитного — не ниже 90 %. Одновременное введение препаратов не сказывается на их иммуногенности. Таким образом, существовавшая раньше гипотеза конкуренции антигенов сейчас признана несостоятельной. Доказано, что сочетанная иммунизация не сопровождается усилением реактогенности и угнетением иммунного ответа на отдельные компоненты. Специалисты ВОЗ считают, что одномоментное введение ребенку нескольких вакцинных препаратов (кроме БЦЖ) в декретированные сроки сокращает инъекционную нагрузку и не мешает формированию полноценного иммунитета [16]. Такая тактика применения комбинированных вакцин привела к резкому уменьшению числа прививок. Это позволило сократить количество визитов к врачу, снизить напряженность календаря прививок и затраты на вакцинацию за счет уменьшения расходов на транспортировку, хранение и введение препаратов (доля этих расходов составляет 90 % общей стоимости вакцинации). Успехи в разработке комбинированных вакцин позволяют ожидать к

2025 г. включения в национальные календари прививок до 23-25 детских вакцин, а также плановой иммунизации лиц среднего и пожилого возраста [12].

Критерием успешной вакцинации является создание в привитом организме длительного и напряженного поствакцинального иммунитета, обеспечивающего защиту от заражения.

### **1.3 Оценка гуморального поствакцинального иммунитета**

#### **1.3.1 Поствакцинальный иммунитет**

Известно, что в специфической защите организма от патогенных микроорганизмов участвуют клеточный и гуморальный механизмы иммунной системы. Разделить эти механизмы и в полной мере оценить роль каждого из них невозможно, поскольку они сложны, тесно переплетены и взаимно дополняют друг друга. Наиболее просто составить суждение об иммунном ответе на определённый патоген можно по наличию и количеству в крови специфических антител – одного из основных защитных компонентов гуморального иммунитета.

При попадании вирусов в не иммунный организм при инфицировании или вакцинации происходит ряд процессов (презентация антигена, пролиферация, дифференцировка избранных клонов и др.), в результате которых в кровотоке появляются антитела к вирусу. К концу 2-й недели после контакта с возбудителем или вакцинации появляются IgM-антитела. Они нарастают к 4–5-й неделе и постепенно исчезают после 6–8-й недели [114]. Отмечено, что после заражения вирусом краснухи уровень специфических антител класса М обычно достигает максимума в течение нескольких дней и затем резко уменьшается. Напротив, после прививки максимум имеет более низкие значения, но всегда обнаруживается в течение 2–3 месяцев после иммунизации [52].

Через 3 недели после вакцинации уже определяются специфические IgG-антитела. Они низкоаффинные и принадлежат к IgG<sub>3</sub>-субклассу. В это же время появляются также иммуноглобулины класса А. На 4-й и 6-й неделе после вакцинации титр IgG-антител продолжает повышаться, хотя при этом суммарный аффинитет этих 2 классов антител всё ещё остаётся довольно низким. В спектре подклассов появляются антитела IgG<sub>1</sub>- и IgG<sub>4</sub>-субклассов, а титры IgM-антител начинают снижаться [50]. Кроме того, обнаружено, что у привитых детей не определяются специфические антитела подкласса IgG<sub>2</sub>, тогда как у привитых

взрослых такие антитела присутствуют, во всяком случае, при ответе на корь. Такие различия связаны с неравномерностью созревания иммунной системы у детей. Показано, что в возрасте около 1 года (возраст для первичной вакцинации против кори, краснухи и паротита) ребёнок имеет почти 100 %-й уровень от нормы взрослого иммуноглобулинов подкласса IgG<sub>3</sub>, около 80 % нормы IgG<sub>1</sub>- и IgG<sub>4</sub>-антител, и только около 30 % антител подкласса IgG<sub>2</sub>. Прирост содержания иммуноглобулинов подкласса G<sub>2</sub> происходит очень медленно и достигает уровня взрослых после 10–13 лет [48]. Важно отметить, что если ребёнок по каким-либо причинам не был привит вовремя и вакцинация против кори и краснухи проводилась в возрасте 5–6 лет и старше, то такие дети вырабатывают антитела всех четырёх подклассов [47]. На этапе поддержания иммунологической памяти основную роль играют IgG- (преимущественно IgG<sub>1</sub>-) и IgA-антитела. Защитные титры антител определяются спустя десятки лет после прививки, но уровень антител после перенесённого заболевания выше [49]. Эти антитела отличает высокая авидность, однако у привитых лиц авидность составляет 70–75 % и сохраняется на этом уровне многие годы, а у перенёсших в анамнезе корь или краснуху антитела имеют авидность более 90 % и сохраняются пожизненно. Возможно, что такие различия связаны с меньшей дозой антигена, введённой при проведении прививки, или низкой вирулентностью вакцинных штаммов. С годами титры антител постепенно снижаются. У отдельных привитых детей уровень антител может упасть ниже защитного, поэтому через 5 лет после первичной прививки проводят однократную ревакцинацию [51]. Кроме того, повторная вакцинация необходима для значительной части взрослого населения, не имеющего достаточного уровня антител [104]. Иммунный ответ, развивающийся на ревакцинацию, является вторичным. У ревакцинированных лиц не выявляются специфические антитела класса IgM или появляются в небольшом количестве. При ревакцинации возрастает содержание специфических IgG-антител у детей, имевших исходно более низкий их уровень, а у индивидов, уже имевших высокий уровень на момент ревакцинации, происходит лишь транзиторное повышение на 7-й день после введения прививки и в дальнейшем всё возвращается к исходному высокому уровню антител [66].

Задачей оценки поствакцинального гуморального иммунитета является не только констатация наличия или отсутствия антител к инфекционному агенту, но и определение их уровня, достаточного для защиты от заболевания. В настоящее время во многих европейских странах принят определённый стандарт уровня защитных антител. Принятые ВОЗ международные, стандартные образцы сыворотки к вирусам краснухи и кори позволили ввести в лабораторную практику количественную оценку уровня антител в международных единицах (МЕ) и дали возможность объективного сравнения результатов, полученных с помощью различных тест-систем [97, 175]. Доступные в литературе данные относительно минимальных протективных уровней антител неоднозначны. Для краснухи этот уровень варьирует от 10 до 25 МЕ/мл [63, 123, 124, 134, 171], а для кори – от 0,15 [124] до 0,5 МЕ/мл [68]. Вероятно, такая неоднозначность связана с различиями в подходах разных исследователей к комплексной оценке гуморальных и клеточных факторов иммунитета. Для эпидемического паротита защитный уровень антител до сих пор не определён.

### **1.3.2 Оценка уровня антител к возбудителям ДВВИ**

Методы, используемые при серологическом тестировании, зависят от технического и кадрового обеспечения лаборатории. В серодиагностике ДВВИ наиболее широко применяется метод ИФА в постановке на микротитровальных планшетах [13]. Ряд отечественных производителей тест-систем выпускают наборы для определения антител и антигенов ко всем значимым ДВВИ. Большинство систем для ИФА позволяет проводить количественный учёт результатов, в то же время проблема стандартизации и возможности сопоставления результатов, получаемых с их помощью, оставляет желать лучшего. Так, при сравнительной оценке коммерческих наборов для ИФА отечественного и зарубежного производства, предназначенных для количественного учёта IgG-антител на основе международного стандартного образца сыворотки к вирусу краснухи, отмечено, что уровни IgG-антител, определённые разными тест-системами, различаются. Особенно заметны расхождения результатов при оценке слабоположительных сывороток, принадлежащих пациентам групп риска [6].

Не все лаборатории располагают аппаратурой и квалифицированным персоналом для реализации ИФА, поэтому такие анализы выполняются в основном

в крупных, хорошо оснащённых, как правило, городских лабораториях. Однако оперативная доставка образцов в такие лаборатории из отдалённых населённых пунктов остаётся трудной, а часто и неразрешимой проблемой. Кроме того, постановка ИФА осуществляется в стандартных 96-луночных планшетах, поэтому встаёт вопрос о накоплении достаточного количества проб, оправдывающего расходы на выполнение анализа. Следует упомянуть и о том, что моноспецифические наборы для ИФА предназначены для выявления антител только к одному патогену, поэтому комплексное обследование требует одновременного наличия целого набора необходимых тест-систем, приемлемых по качеству и срокам хранения, что тоже нередко представляет определённую сложность [13].

Таким образом, использующиеся в настоящее время методы серомониторинга сложны и малодоступны для людей, проживающих в отдалённых населённых пунктах. Существующие серологические тесты моноспецифичны, и выявление с их помощью антител ко всем перечисленным инфекциям представляет собой длительную и дорогую процедуру, а результаты разных анализов трудно свести в единую систему для формирования персональных иммунологических профилей.

#### **1.4 Мультиплексный иммуноанализ как альтернативный подход к комплексному выявлению антител в препаратах крови**

Мультиплексная (многопрофильная) иммунодиагностика — новое направление, предполагающее использование устройств, так называемых «белковых матриц» (protein arrays), позволяющих одновременно определять в исследуемом образце множество различных аналитов. Часто такие матрицы называют «белковыми чипами», или «иммуночипами». Основным достоинством белковых матриц является то, что они позволяют в одном анализе исследовать клинический образец на наличие антител ко всему спектру выявляемых патогенов. Мультиплексный подход в иммуноанализе появился на рубеже третьего тысячелетия [99] и был обусловлен значительными достижениями в биотехнологии и биоинформатике [80]. Базисом исследований в области белковых микроматриц послужили успехи в создании матриц на основе ДНК, обозначившие общие принципы и методологию работ в этом направлении [184]. Однако создание

мультиплексного иммунологического теста намного сложнее, чем ДНК-биочипов из-за огромного биохимического, структурного и конформационного разнообразия белков, а также широкого диапазона их концентраций в исследуемых образцах [92, 100, 187]. В то же время, решение существующих проблем и применение технологии белковых чипов может заменить целые иммунологические лаборатории и при этом дать возможность во много раз увеличить производительность большинства диагностических методов, что позволит резко снизить себестоимость анализов. За последнее десятилетие опубликовано огромное число работ, посвящённых разным вопросам изготовления и применения белковых матриц, в том числе ряд обзоров по этой тематике [80, 92, 100, 167, 173, 177, 184, 187]. Это свидетельствует, с одной стороны, о большой заинтересованности исследователей в новом эффективном диагностическом средстве, а с другой стороны, о большом количестве методологических и технических проблем при его создании.

#### **1.4.1 Виды, форматы и дизайн белковых матриц**

Матрицы позволяют реализовать разнообразные варианты иммуноанализа. Анализ на матрицах с прямым захватом (direct capture assays) заключается в иммобилизации образцов тканей [168], клеточных лизатов [105], сывороток [121] и обнаружении интересующего белка с использованием меченых антител одного вида [137]. Каждое пятно на подложке состоит из сложной смеси белков, а каждая матрица анализируется с помощью одного специфического зонда. Матрица с прямым захватом может включать сотни различных проб от пациентов, делая возможным выявление отдельного аналита во многих образцах [100].

На матрицах возможно выполнение сэндвич-варианта иммуноанализа, основанного на использовании иммобилизованных на подложке иммунореагентов захвата (антигенов или антител), выделяющих на себе целевые белки из исследуемого образца. Выявление извлечённых белков возможно с помощью вторичного меченого иммунореагента [142].

По назначению матрицы могут быть функциональными и аналитическими [187]. Функциональные белковые матрицы применяются в протеомике для скрининга диапазона биохимических взаимодействий, например, для изучения действия ингибиторов на активность фермента, взаимодействий белка с

лекарствами и гормонами или в исследованиях по картированию эпитопов [73, 125, 159].

На подложке аналитических белковых матриц распределены и иммобилизованы специфические реагенты захвата (антигены или антитела). Такие матрицы используются для выявления белков, содержащихся в сложной смеси, например, для обнаружения антител или антигенов в сыворотке крови и других биологических жидкостях [69, 89, 116] или контроля экспрессии белков в различных биотехнологических процессах [128]. По существу, аналитические матрицы позволяют реализовать мультиплексный вариант сэндвич-иммуноанализа, где один специфический реагент (реагент захвата) иммобилизован на твёрдой фазе, что и позволяет выделить из сложной смеси анализируемое вещество, а второй специфический компонент, связанный с легко выявляемой меткой, используется для детекции этого выделенного аналита [142].

В зависимости от вида реагента захвата, иммобилизованного на твёрдой фазе, аналитические матрицы могут быть матрицами антител (antibody array) или матрицами антигенов (antigen array) [80]. Первые используются для выявления спектра антигенов, а вторые, соответственно, для выявления спектра антител.

Известно три основных формата аналитических матриц: плоские, или двумерные (two-dimensional protein arrays (2D)), объёмные, или трёхмерные (three-dimensional protein arrays (3D)) и суспензионные (bead protein array) [91, 92].

В случае плоских матриц антигены пространственно распределены на плоской подложке. После блокирования свободных участков подложки матрицу инкубируют с исследуемым образцом (обычно сыворотка или плазма крови) и проявляют с использованием меченых антител к иммуноглобулинам человека или стафилококковых белков А или G [185]. Основные проблемы при разработке таких тестов связаны с подбором материала твёрдой фазы, подбором достаточно чистых и специфичных антигенов, а также отработкой способа их иммобилизации на подложке без нарушения специфической активности белков. Наиболее сложным вопросом считают сохранение исходного состояния белка при иммобилизации на поверхности, поскольку сама природа белков подразумевает их высокую лабильность [155].

Прообразом плоских матриц антигенов могут служить наборы Orgenics immunosomb фирмы Orgenics (Франция). Эти наборы позволяют проводить дот-иммуноанализ на поверхности рабочего элемента, представленного в виде полистирольного гребня, на каждом зубце которого нанесены специфический антиген и человеческие иммуноглобулины (контроль). При положительном результате анализа в месте нанесения антигена образуются визуально определяемые синие пятна. Такие тест-системы можно рассматривать как автономные моноспецифические наборы для серологического анализа в так называемых полевых условиях, т.е. вне лаборатории [32].

Альтернативный путь иммобилизации белков – использование объёмной, или трёхмерной (3D) матрицы, заключающей белок в структурированную среду геля. Этот механизм основан на физическом захвате белков в гелях типа полиакриламида или агарозы. Такие матрицы представляют собой капельки или подушечки геля, нанесённые на подложку и пропитанные агентом захвата [172]. Объёмная структура этих подложек обычно увеличивает количество реагента захвата и не затрагивает его функциональные участки или регулярные домены. Кроме того, водная среда геля снижает денатурацию белка [20]. Однако структура геля служит барьером для диффузионных процессов и для осуществления молекулярных взаимодействий может потребоваться длительная инкубация [91]. Эта особенность является основным недостатком такого типа матриц. Кроме того, подобные матрицы нуждаются в бережном обращении и хранении, исключающем высыхание и механическое повреждение гелевых подушечек.

Суспензионные матрицы изготавливают путём иммобилизации агентов захвата на наборе шариков, содержащих флуоресцентную метку. Каждому типу шариков с иммобилизованным агентом захвата соответствует определённая флуоресцентная метка. При выполнении мультиплексного анализа смешивают различные типы шариков. Смесь шариков инкубируют с образцом, а затем с коктейлем флуоресцентно меченных антител. Флуоресцентные античастицы используются для подсчёта числа шариков, содержащих внутреннюю флуоресцентную метку и связанных за счёт иммунного взаимодействия с антителами исследуемого образца. Существуют поставщики полностью разработанных тестов подобного рода (Luminex – <http://www.luminexcorp.com/>;

Bender MedSystems – <http://www.bendermedsystems.com>; Biorad – <http://www.biorad.com/>; Biosource – <http://www.biosource.com/>; Linco – <http://www.lincoresearch.com/>; Miraibio – <http://www.miraibio.com/>; Qiagen – <http://www.qiagen.com/>; R&D Systems – <http://www.rndsystems.com/>; Upstate – <http://www.upstate.com>). Кроме того, доступны реагенты и типы шариков, свободные от агентов захвата, пригодные для самостоятельного изготовления необходимого теста (Luminex, Miraibio и Qiagen) [185].

Шарики можно смешивать в разных сочетаниях, поэтому анализ обладает высоким уровнем гибкости по многообразию выявляемых аналитов и по виду (или различию) их специфичности. Окончательный уровень мультиплексирования ограничен числом доступных типов шариков. Хотя изготовители заявляют, что возможен анализ 50–100 видов аналитов, большинство публикаций описывают тесты, ограниченные 15 специфичностями. Анализы, использующие суспензионные матрицы, могут выполняться в 96-ячеечных планшетах с одним мультиплексным тестом на ячейку. Таким образом, их производительность способна превышать производительность плоских белковых микроматриц [185]. Шарiki могут быть нагружены антигенами и применяться для анализа антительного ответа. Более высокая производительность суспензионных матриц способствует использованию их в качестве технологии скрининга [72]. Основными достоинствами суспензионных матриц являются упомянутые гибкость формата и высокая производительность анализа, а недостатками – высокая стоимость компонентов (шариков и флуоресцентных маркёров) и особенно аппаратуры, позволяющей фиксировать и дифференцировать спектры сложной смеси флуоресцентных маркёров.

Наиболее перспективными для разработки и внедрения мультиплексного анализа антител выглядят плоские аналитические матрицы антигенов. Далее более подробно будут рассматриваться успехи и проблемы, связанные с этим типом матриц.

В конструктивном исполнении плоские матрицы могут иметь высокую и низкую плотность нанесения антигенов. Сама идея мультиплексного анализа вытекает из желания извлечь максимум диагностической информации из исследуемого образца при минимальных объёмах пробы и оправданном расходе

реагентов и трудозатрат [99]. Это объясняет стремление большинства исследователей разместить в границах матрицы большое количество агентов захвата. Следствием такого подхода является нанесение аликвот реагентов захвата в диапазоне нано- и пиколитровых объёмов на крайне малые по площади зоны подложки [98, 100, 159]. Производство таких матриц, как и учёт результатов, возможны только при использовании высокоточной, сложной и дорогостоящей роботизированной техники. Поэтому до сих пор разработанные матрицы используются лишь в научных экспериментах [149].

В клинической практике перечень дифференцируемых заболеваний обычно укладывается в 6–12 наименований, а при обследовании больных большое значение имеют скорость, простота и приемлемая стоимость выполнения анализа [99]. Такие требования могут обеспечить мультиплексные тесты на основе белковых матриц с низкой плотностью нанесения агентов захвата. При изготовлении таких матриц антигены наносят в микролитровых объёмах, а зоны фиксации имеют диаметр от 1 до 5 мм. Такие тесты проще обеспечить необходимым набором агентов захвата, проще распределить эти агенты на подложке с помощью доступных и относительно недорогих устройств, проще учесть результаты визуально или с помощью обычного сканера [141, 151, 158].

Белковые матрицы с низкой плотностью нанесения антигенов могут оказаться полезными при тестировании ДВВИ. Одновременное выявление маркёров всех интересующих ДВВИ сможет дать существенные преимущества по скорости, трудоёмкости и стоимости обследования.

#### **1.4.2 Материалы, используемые в качестве твёрдой фазы**

Выбор подложки является первым шагом на пути создания белковой матрицы. Идеальная подложка должна соответствовать критериям, увеличивающим отношение «сигнал/шум» при постановке анализа [100]. К таким критериям относятся:

- однородная поверхность,
- нерастворимость,
- способность связывать достаточное количество белка на единицу площади носителя и удерживать их на поверхности в условиях анализа,
- инертность к реактивам в условиях анализа,

- совместимость с используемыми методами детекции,
- стабильность при хранении,
- технологичность при изготовлении диагностических устройств,
- удобство в обращении.

Известны попытки использования при создании белковых матриц модифицированных стеклянных слайдов [142]. Однако стеклянная поверхность слабо удерживает адсорбированные белки. Эффективная иммобилизация антигенов на стекле была достигнута только при модифицировании его поверхности, и ковалентном связывании amino- или карбоксильных групп белка с химически активированной поверхностью стекла [107]. Однако ковалентное связывание – технически сложный, длительный и относительно дорогой метод иммобилизации, а стекло – хрупкий материал, неудобный при изготовлении и применении матриц. Кроме того, прозрачность стекла затрудняет визуальный учёт результатов.

Пористые матрицы (фильтры) на основе органических полимеров (нитроцеллюлоза, поливинилхлорид, нейлон и др.) широко применяются в так называемых дот- и блот-вариантах методик иммуноанализа [141]. Адсорбирующие пористые мембраны благодаря развитой поверхности обладают высокой сорбционной ёмкостью. Существующий рынок позволяет выбрать мембраны, характеризующиеся различными размерами пор, сорбционной ёмкостью и прочностью связывания белков. В научных публикациях, посвящённых белковым матрицам, для реализации метода многопрофильного иммуноанализа часто используются именно пористые мембраны [100, 141, 151, 158, 163, 164]. Нитроцеллюлозные мембраны очень хорошо адсорбируют белки, однако изготовлены из хрупкого, ломкого материала, что значительно затрудняет их использование. Поливинилхлоридные мембраны эластичны и не ломаются, однако их сорбционная ёмкость невелика [32]. Основным недостатком пористых мембран является сложность их отмывки от несвязанных компонентов реакции [26]. Иногда такие компоненты могут быть удалены только многократными отмывками с механической активацией растворов на мешалке или шейкере. Это значительно усложняет и удлиняет процедуру анализа. Ещё одним существенным недостатком доступных пористых мембран является их высокая стоимость.

Непористые листовые материалы на основе органических полимеров весьма разнообразны. В качестве твёрдой фазы в иммунологических методах чаще используются планшеты, изготовленные из полистирола и поливинилхлорида (ПВХ). Известны случаи применения подложек из лавсана, полиэтилена и других пластиков [23]. Полистирол, ПВХ и лавсан имеют на своей поверхности функционально активные участки и/или функциональные группы, способные связывать amino- или карбоксильные группы белков [23]. Количество таких групп, а, следовательно, и способность поверхности полимера связывать и удерживать белки, зависит от химического состава, наличия добавок и примесей, а также технологии приготовления и штамповки (прокатки) полимера. Листовые пластмассы специально предназначенные для иммунологических исследований, на российском рынке практически отсутствуют. Перспективными кандидатами для изготовления подложки могут выступать комбинированные пластики (синтетическая бумага), включающие в себя органические и минеральные компоненты [32]. Рынок таких материалов стремительно развивается, однако в России он остаётся нестабильным и выбор подходящего материала и бесперебойного источника его поставки сопряжён со значительными трудностями.

Таким образом, можно заключить, что существующее разнообразие материалов, позволяет исследователю выбрать подложку оптимально совместимую с его конкретной методикой. Однако при разработке методики, предполагающей в дальнейшем практическое внедрение, материал должен быть максимально простым в обращении, коммерчески доступным и обладать приемлемой стоимостью.

#### **1.4.3 Иммобилизация биомолекул на поверхности твёрдой фазы**

Самый простой и технологичный способ связывания белка с поверхностью носителя – физическая адсорбция. Этот подход используется в ИФА и блот-методиках много лет [79, 109]. Адсорбция – сложный, многофакторный и не вполне изученный процесс, в котором участвуют вандервальсовы силы, гидрофобные, ионные, электронные и другие взаимодействия [25, 41, 102]. Основой этого процесса являются электрополяризационные эффекты, в значительной степени определяющиеся характеристиками среды, в которой происходит связывание твёрдой фазы с реагентом захвата. Основными достоинствами метода являются простота выполнения и отсутствие необходимости

в дополнительном оборудовании. Адсорбционный метод имеет и недостатки: белки могут быть удалены с поверхности жёсткими условиями отмывки; из-за неспецифической адсорбции – десорбции белка, уровень фона может быть сравнительно высоким; белки, адсорбированные на гидрофобных поверхностях, имеют тенденцию к денатурации [130].

Химический состав, ионная сила, pH и температура раствора влияют как на эффективность иммобилизации белка, так и на его специфические иммунологические свойства. Эти свойства определяются наличием в молекуле белка специфических участков – антигенных детерминант, которые в значительной степени представлены не только линейными, но и конформационными эпитопами. Изменения факторов среды могут влиять на конформацию макромолекулы, что может привести к изменению или деструкции таких эпитопов [100, 167]. Считается, что физическая сорбция тем эффективней, чем меньше ионная сила раствора [25]. Однако отсутствие или недостаток ионов в растворе могут вызывать катастрофические конформационные изменения [41], поэтому иммобилизацию белков обычно проводят из растворов с ионной силой в диапазоне 0,01–0,05 М, обеспечивающей необходимый уровень pH и устойчивость структуры макромолекул. Известно, что наиболее эффективное и прочное связывание белков с твёрдой фазой происходит в том диапазоне pH, где белок имеет нейтральный общий заряд (в так называемой изоэлектрической точке) [156]. Многие антигены имеют изоэлектрические точки в области pH 5,0–6,0, поэтому именно в этом диапазоне следует ожидать наиболее сильных взаимодействий. Однако слишком сильное взаимодействие белка с твёрдой фазой также может вызывать нарушения изменения третичной и четвертичной структуры белков и ослаблять их специфическую активность. Поэтому, сорбцию специфических белков принято осуществлять в щелочной области pH, где белок и подложка имеют общий заряд одного знака [102]. Поливалентные ионы (фосфатные, карбонатные, боратные и др.), входящие в состав буферных растворов, тоже вносят свой вклад в ионные взаимодействия [41, 151].

Существенное значение имеет концентрация белка в сорбционной смеси. Слишком высокие концентрации могут приводить к плотной упаковке макромолекул на поверхности адсорбента, к ограничению площади связывания, и,

следовательно, к снижению прочности удерживания антигена на твёрдой фазе. Кроме того, избыток антигенов во время этапа блокирования может диффундировать на свободные участки матрицы и становиться причиной артефактов или диффузного повышенного фона [33]. Следствием низких концентраций антигенов могут быть недостаточное насыщение поверхности подложки и, возможно, изменение конформации молекул за счёт образования множественных связей с поверхностью [102].

Существенно влияют на эффективность сорбции также время и температура инкубации сорбционной смеси на подложке. Инкубация сорбционной смеси с твёрдой фазой необходима для осуществления диффузионных процессов, правильной ориентации молекул, образования гидрофобных и других взаимодействий между белком и материалом подложки [151]. При изготовлении матриц белки захвата наносятся на поверхность в виде капель малого объёма (1-2 мкл). Такие капли быстро высыхают и этого времени часто недостаточно для достижения перечисленных эффектов. Известны случаи нанесения белков на охлаждённую подложку или их иммобилизации из растворов глицерина, замедляющего процесс высыхания, однако эффективность связывания при этом снижается [137]. Большое число публикаций по вопросам изыскания материалов для изготовления матрицы и способов фиксации на ней белков свидетельствует об отсутствии универсальных подходов и неудовлетворённости исследователей таким положением. По мнению D. Carville [82], выбор поверхности и способа для связывания реагентов захвата является наиболее изменяемой областью иммунодиагностических исследований.

Разные материалы подложки и различные антигены имеют свои особенности, влияющие на эффективность сорбции. Очевидно, что в каждом отдельном случае теоретически определить условия эффективной сорбции можно лишь приблизительно, задавая довольно широкие диапазоны для отдельных факторов. Ковалентное связывание обеспечивает более прочную фиксацию белков на поверхности подложки. Это особенно актуально при иммобилизации пептидов с низкой молекулярной массой, плохо удерживающихся на поверхности за счёт адсорбционных взаимодействий. Механизм ковалентного связывания требует присутствия на подложке активных групп, способных реагировать с

карбоксильными, амино-, тиольными или гидроксильными группами белка. Образование функциональных групп достигается путём модифицирования поверхности твёрдой фазы различными химическими реагентами [9, 107, 173]. Существуют стратегии опосредованного связывания, основанные на аффинности компонентов, делающие возможной фиксацию белков на подложке в строго определённой ориентации [83, 133, 173]. В одном из последних обзоров, посвящённых приёмам создания белковых и пептидных микроматриц, Voskuhl J. с соавт. [181] приводят ряд новых примеров химической модификации поверхности носителя и иммунокомпонентов для их эффективного ориентированного связывания в микропятнах. Однако все известные методики химического связывания белков с поверхностью подложки являются многостадийными, длительными, требующими значительного опыта оператора и весьма дорогими [76, 107, 133, 153, 181].

При опосредованном связывании поверхность материала подложки предварительно насыщается агентом-посредником, чаще стрептавидином или глутаровым альдегидом [9]. Затем на подложку наносят иммобилизуемый белок. При использовании в качестве посредника стрептавидина иммобилизуемый белок необходимо предварительно конъюгировать с биотином, что может негативно сказаться на специфических свойствах антигена. Связывание посредством глутарового альдегида не требует химической модификации антигенов и в этом отношении выглядит более предпочтительным. Иммобилизация белков с использованием глутарового альдегида осуществляется в два этапа и проводится в условиях влажной камеры [9]. Опосредованный подход имеет те же недостатки, что и ковалентное связывание: обработка ограниченной поверхности матрицы нетехнологична, а всей поверхности – нерациональна. Однако считается, что при таком способе иммобилизации белки в меньшей степени десорбируются с поверхности носителя во время инкубаций и отмывок.

Таким образом, подходы к иммобилизации белков на поверхности носителя достаточно разнообразны. Однако большинство из них довольно сложно реализуемы, требуют высокого профессионализма исполнителя и специального оборудования, их практическая реализация не всегда оправдана [159]. Если целью исследования является практическое внедрение разработки, актуальным остаётся

поиск простых и широкодоступных методик. В этом случае наиболее реалистичной стратегией иммобилизации белков выглядит проверенный адсорбционный метод.

#### **1.4.4 Способы распределения реагентов захвата на подложке**

При подготовке белковой матрицы иммунореагенты захвата должны быть нанесены на подложку матрицы в виде отдельных пятен определённого размера. Оптимальный размер пятен должен позволять проводить измерения, в которых количество аналита, захваченного из раствора, прямо отражает его концентрацию в системе анализа и обеспечивает сочетание высокой чувствительности с низким потреблением образца [98]. С увеличением размера пятна при постоянной поверхностной концентрации иммобилизованных молекул захвата суммарный аналитический сигнал в пятне возрастает, тогда как плотность сигнала уменьшается, потому что количество аналита становится фактором ограничения. Процесс захвата ведёт к значительному сокращению концентрации аналита в образце и, в то же время, комплексы аналита с молекулами захвата распределяются по большей площади. В результате максимальный удельный сигнал, который может быть получен в пятне, уменьшается. Уменьшение размера пятна снижает общий сигнал на пятне, но плотность сигнала для меньших пятен увеличивается. Однако ниже определённого размера пятна плотность сигнала приближается к максимальной (количество аналита не ограничено) и остаётся приблизительно постоянной при любом дальнейшем уменьшении размера пятна [98, 99]. Следовательно, самая высокая интенсивность сигнала и оптимальное отношение сигнал – шум могут быть достигнуто в пятне небольшого размера, однако их излишняя миниатюризация не позволяет выполнять количественные измерения аналита в образце [173]. Опыт серологических исследований на плоских матрицах свидетельствует о том, что достаточно чёткая корреляция оптического сигнала в пятне с концентрацией специфических антител в образце достигается при диаметре пятен 1–3 мм, максимально насыщенных реагентами захвата [23].

Выбор оптимального способа дозирования реагентов захвата, позволяющего экономить используемый реагент, обеспечивающий точность и воспроизводимость наносимого количества, а также автоматизацию и ускорение процесса изготовления матриц является непростой задачей. Мотивы поисков совершенных технологий дозирования включают в себя необходимость увеличения объёма

диагностической информации, которая может быть получена из образца пациента, и всеобщее давление рынка по снижению стоимости анализов. Характеристики успешных технологий должны включать в себя способность работать с широким спектром растворителей и растворённых веществ, дозирование реагентов в диапазоне от пиколитров до микролитров, а также высокую производительность с использованием бесконтактного метода дозирования [176].

Традиционные устройства дозирования реагентов для изготовления диагностических систем включают в себя объёмные насосы (шприцевые и роторно-поршневые), штифтовые массивы (игольчатые) и аэрозольные диспергирующие системы.

**Объёмные насосы** являются программируемыми и способными выдавать точное количество реагента, но для таких систем есть некоторые ограничения. Например, для нанесения капли объёмом менее 3 мкл они требуют контакта или полуконтакта реагента с подложкой, на которую она доставляется. Это требование увеличивает время между циклами нанесения, уменьшая тем самым скорость и производительность процесса. Кроме того, приведение реагента в контакт или полуконтакт с подложкой означает также, что наконечник наносящего элемента находится в опасной близости от неё, что может привести к перекрёстному загрязнению или повреждению подложки. Возможность повреждения поверхности может быть особенно важной при нанесении на мембрану или другие чувствительные поверхности. Эксплуатационные качества систем с объёмными насосами могут быть несколько улучшены с помощью метода сенсорного отключения, когда мениск наконечника шприца входит в контакт с поверхностью подложки или жидкостью в микропланшете. Этот метод может обеспечить нанесение капель объёмом более 500 нл, но потребность в контакте с целевым субстратом ограничивает полезность такого подхода [176].

**Штифтовые массивы** используются при передаче реагентов из одних микролунок микропланшета в другие или с планшета на мембрану. Для достижения необходимой производительности штифты, как правило, отформатированы в массивы (типичными являются 96- и 384-штифтовые массивы). Как правило, каждый штифт выдаёт только одну каплю на каждом цикле передачи, но переносы многих реагентов можно проводить параллельно, увеличивая тем

самым скоростью процесса. Воспроизводимость размеров капли может быть хорошей, но контроль объёма сильно зависит от физико-химических характеристик распределяемых реагентов. Объём капель может достигать пиколитрового диапазона. Чтобы предотвратить любую возможность перекрёстного загрязнения, контакты между передачами должны промываться. Потенциальный ущерб для поверхности подложки, также является проблемой, которую необходимо принимать во внимание [173].

**Рапидографы** могут быть использованы для нанесения реагентов захвата на подложку [165]. При правильном подборе режимов печати на модифицированном перьевом плоттере MP 4200 (Graphitec, Япония) с рапидографом толщиной 0,6 мм удаётся наносить приблизительно 1 мкл белковой смеси на пятно диаметром около 2 мм, что позволяет изготавливать белковые матрицы с низкой плотностью нанесения реагентов захвата. Кроме нанесения антигенов плоттер позволяет производить необходимую разметку и маркировку матриц с помощью фломастеров с водостойкими чернилами. С использованием такого подхода удаётся стандартно распечатывать до 2500 точек в час [33], что может удовлетворить потребности научной лаборатории, но явно недостаточно для производства.

**Аэрозольные системы** широко используются для дозирования широкого спектра реагентов на впитывающие поверхности, такие как мембраны [158]. Однако, поскольку воздушный поток, связанный с системами аэрозоля, легко перераспределяет реагенты, находящиеся на поверхности подложки, такие системы, как правило, непригодны для дозирования реагента на слабо сорбирующие материалы. Аэрозольные системы обычно обладают динамическим диапазоном (максимальная скорость распределения/минимальная скорость распределения) больше 1000 и поэтому могут быть запрограммированы для дозирования широкого спектра объёмов. При распределении на мембранах в формате линии аэрозольные системы могут достигать минимальных объёмов до 0,1 мкл/см, а при нанесении точек реагента минимальный объём капель может достигать 50 нл. Недостатком аэрозольных систем является то, что они должны часто калиброваться, потому что их расход может широко варьировать в зависимости от настройки системы и физико-химических характеристик распыляемого реагента [176].

**Струйная печать.** Хотя описанные выше типы систем наиболее часто используются для дозирования реагентов при разработке диагностических устройств, исследователи прилагают значительные усилия по разработке новых систем, которые будут удовлетворять потребности продвижения технологий диагностики. Одна из идей, которая привлекла большое внимание, является возможность адаптации технологии струйной печати к требованиям дозирования реагентов. Это концепция привлекает отчасти потому, что струйная печать по своей сути является бесконтактной технологией. Устраняя необходимость в контакте или полуконтакте с целевым субстратом, производители могут увеличить скорости и производительность дозирования, и при этом избежать потенциальных проблем перекрёстного загрязнения и повреждения подложки.

Отправной точкой в усилиях по адаптации технологии струйной печати к проблемам применения в биотехнологии послужили непрерывные струйные принтеры, такие как принтеры производства Videojet Systems International (Wood Dale, США), Domino Amjet Inc (Gurnee, США) и другие [176].

Этот тип струйных принтеров создаёт непрерывный поток капель в формате ограниченного контура. Вылетая из сопла, капельки проскакивают через заряжающий электрод. Получив электрический заряд, они попадают в поле отклоняющего электрода, на который подаётся высокое напряжение. Изменяя напряжение на отклоняющем электроде, можно заставить капельки изменить траекторию полёта. Если состоящая из заряженных капелек струя не отклоняется в сторону, она попадает в уловитель, из которого неиспользованный раствор стекает в накопитель, проходит стадию удаления воздушных пузырьков (дегазации) и снова сливается в основной резервуар [44].

Известны примеры успешного модифицирования непрерывных струйных принтеров для реагентов дозирования, оказавшихся полезными для некоторых применений [176]. Однако такие системы могут работать только с применением электропроводных растворов, способных получить заряд и соответствующих ограниченному физико-химическим профилям. Производительность сопел печатающей головки очень высока: из них в секунду вылетает от 50 до 150 тыс. капелек. Однако сам процесс печати нельзя назвать очень быстрым. Система

рециркуляции может приводить к загрязнению раствора и весьма сложна, что сказывается на общей стоимости струйных принтеров этого типа.

Струйные принтеры пузырькового типа, производимые фирмами Hewlett-Packard (США) и Canon (Япония), очевидно, не годятся для дозирования биокomпонентов, поскольку в процессе печати производят нагрев рабочего раствора практически до мгновенного испарения [176]. Белки при таких воздействиях денатурируют и в значительной степени утрачивают свои специфические свойства.

Напротив, ультразвуковое воздействие на растворы в принтерах с пьезоэлектрическими головками (например, принтеры фирмы Epson (Япония)) может оказаться полезным, так как такое воздействие разрушает белковые агрегаты и повышает дисперсность наносимых антигенов [23]. Для образования в камере избыточного давления применяется диск из пьезоэлектрика. Когда к нему подводится напряжение, он деформируется (изгибается). Выгнувшись, диск, который служит одной из стенок камеры с чернилами, резко уменьшает её объём, при этом оказавшиеся лишними чернила вылетают из сопла в виде капельки. Для заполнения камеры, когда напряжение снято и пьезоэлектрический диск возвращается к исходной форме, применяется капиллярный способ подачи чернил из резервуара [44]. Попытки приспособить пьезоэлектрический принтер фирмы Epson показали, что такой подход принципиально пригоден для изготовления иммуночипов. Однако удельный объём наносимых иммунореагентов недостаточен для получения сливных капель на гидрофобных подложках, вследствие чего не удаётся достигнуть однородности напечатанных пятен [33]. Доработка же печатающих головок, особенно с учётом вариабельности состава рабочих растворов, сложна и стоимость её может оказаться непомерно высокой.

Наиболее успешные попытки приспособить технику струйной печати для изготовления белковых матриц были достигнуты с использованием технологии «капли по требованию» [176]. В таких системах пользователь программы воздействует на клапан, который управляет функцией дозирования (спроса) таким образом, что каждое срабатывание клапана производит каплю реагента. Усилия по созданию функциональной струйной системы «падение по требованию» были сосредоточены на использовании электромагнитных и пьезоэлектрических

клапанов, которые способны производить капли размером на уровне нано- и пиколитров, соответственно,. В теории электромагнитный клапан «падения по запросу» может обеспечить размеры капель в диапазоне от 20 до 2000 нл, используя практическую частоту открытия клапана до 500 Гц [132]. Однако сих пор не создана коммерчески доступная система «падения по требованию», использующая только электромагнитный клапан [176].

Пьезоэлектрические клапаны при той же частоте могут производить капли с размерами в диапазоне 100–1000 пл. При создании системы «капля по требованию» с пьезоэлектрическими клапанами были достигнуты некоторые успехи, но для этого потребовалось использовать дегазацию растворов и применить систему контроля давления [147]. Основной проблемой всех систем струйной печати является то, что они чрезвычайно чувствительны к физико-химическим свойствам наносимых реагентов, таких как поверхностное натяжение, вязкость и растворённый воздух и, следовательно, не способны строго количественно воспроизводиться. Существует проблема, связанная с тем, что большинство реагентов имеют значительные температурные коэффициенты вязкости (порядка 1-2 %/°C), что делает процесс дозирования очень чувствительным к изменениям температуры. Система отлично работает как принтер, так как печатные краски специально оптимизированы для работы с определённой системой клапанов. Но для успешного использования в дозировании реагентов, система должна быть способна надёжно работать с жидкостями, которые имеют широкий спектр свойств и часто подвергаться калибровке, чтобы гарантировать нанесение необходимого объёма [176].

**Гибридные решения.** Одним из перспективных решений для количественного бесконтактного дозирования представляется собой система, в которой объёмный насос используется для подачи реагента в бесконтактный диспенсер. Подходящие бесконтактные диспергирующие элементы могут включать пьезоэлектрические головки, электромагнитные клапаны с открытием по времени, сопла или аэрозольные ячейки. Такая система сочетает в себе количественные характеристики объёмных насосов с характеристиками бесконтактного выброса выбранного элемента диспергирования. Например, в системе BioJet (Bio-Dot, Irvine, США) применён шприцевой насос, который

доставляет реагенты к элементу диспергирования - открывающемуся по времени электромагнитному клапану. Эта система количественна (распределяемые объёмы могут быть запрограммированы); имеет минимальную чувствительность к физическим и химическим свойствам реагентов, которые она распределяет; не требует или почти не требует контакта с целевой подложкой и подходит для небольших объёмов доставки в диапазоне от 4,16 до 10000 нл [176].

#### **1.4.5 Методы детекции иммунологического связывания**

Применяемые в настоящее время стратегии детекции классифицируются, как 1) свободные от метки и 2) стратегии с использованием зондов, несущих на себе различного рода метки. К свободным от метки относятся такие методы, как масспектрометрия, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), атомно-силовая микроскопия и др. Свободные от метки методы детектирования являются многообещающими средствами детекции иммунологического связывания на поверхностях, однако они требуют сложного оборудования, доступного не для всех диагностических лабораторий и клиник [92].

Стратегии детекции с мечеными зондами предполагают использование вторичных иммунореагентов, связанных с радиоактивными, флуорофорными или хромогенными метками [94]. Учёт результатов основан на обнаружении метки, иммобилизованной за счёт иммунохимического связывания, на определённых участках поверхности белковой матрицы. Наиболее часто для хромогенных реакций на матрицах используются меченные ферментом антитела. Ферменты действуют, преобразуя бесцветный субстрат в окрашенное нерастворимое соединение. Посредством хромогенной детекции на белковых матрицах генерируются стабильные сигналы, которые легко можно проанализировать визуально. Обычно используемые ферменты для хромогенных реакций – пероксидаза хрена (ПХ) и щелочная фосфатаза (ЩФ) [100]. Субстраты, наиболее часто используемые при проявлении этих маркёров, описаны *V. Espina et al.* [100] и приведены в таблице 1.

При проявлении пероксидазных конъюгатов наиболее успешно используется диаминобензидин (DAB) [9]. Преципитат производного диаминобензидаина стабилен и генерирует интенсивный сигнал с относительно низким фоном. Сигнал может быть усилен никелем, медью, серебром, золотом или кобальтом [115].

Реакции, использующие в качестве субстрата 4-хлор-1-нафтол (CN) и сульфосалициловую кислоту (SSA) менее чувствительны, кроме того CN-преципитаты в процессе проявления могут распространяться от участка их осаждения [100].

Таблица 1 - Субстраты, используемые при хромогенной детекции аналитов [100]

Метка	Субстрат	Аббревиатура	Цвет
Пероксидаза хрена (ПХ)	Diaminobenzidine	DAB	коричневый
	Diaminobenzidine - NiCl <sub>2</sub>	DAB+ NiCl <sub>2</sub>	черный
	(4-chloro-1-naphthol)	CN	фиолетовый
	(6-sulfosalicylic acid)	SSA	коричневый
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	Bromo-chloro-indolyl phosphate/ nitro blue tetrasolium	BCIP/NBT	синий
	Naphthol-AS-BI-phosphate/fast red TR	NABP/FR	красный
	Naphthol-AS-MX-phosphate/fast blue BB	NAMP/ FB	синий

Хромогенные субстраты для ЩФ включают галоидированные индолил-фосфаты, которые гидролизуются в присутствии ЩФ до образования красителей цвета индиго. В свою очередь этот краситель восстанавливает соль тетразолия до образования нерастворимого формаза, который, объединяясь с красителем цвета индиго, формирует цветной, преципитат. Наиболее широко используемой хромофорной системой для определения локализации фосфатазной активности является nitroblue tetrazolium chloride (NBT) и 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) [74, 136]. Окрашивание субстратов NAMP/FR и NABP/FB может исчезать при высушивании, что ограничивает их применение для микрочиповых стратегий, требующих анализа изображения высушенной матрицы. В отличие от них BCIP/NBT-субстрат выдаёт стабильный сигнал с низким фоном, но менее чувствителен, чем NAMP/FR [182].

Помимо ферментных меток, для хромогенной детекции применяются неорганические металлсодержащие золи [99, 100]. Коллоидное золото с серебряным проявлением ранее было использовано в гистохимии, в дот и блот-анализе, а позднее на ДНК- и белковых микроматрицах [81, 87, 158]. Для усиления сигнала при использовании коллоидного золота обычно используются «физические проявители», содержащие ионы серебра и слабые восстановители (метол, гидрохинон, амидол, п-фенилендиамин, глицин и др.) [7]. Частицы золота и серебра обладают способностью каталитически восстанавливать серебро из таких

нестабильных растворов на своей поверхности. Восстановленное серебро при этом осаждается на золотых частицах и в свою очередь катализирует процесс осаждения следующих порций серебра. В результате место иммобилизации коллоидного золота покрывается слоем серебра и приобретает чёрно-серую окраску, хорошо различимую на светлом фоне подложки.

Количество и скорость осаждения серебра прямо пропорциональны площади каталитически активных частиц (массе и дисперсности иммобилизованного коллоидного золота) [87]. С использованием частиц золота диаметром 20 нм, связанных с анти-IgG-антителами, удаётся выявлять до 1 пг иммуноглобулинов класса G, иммобилизованных на матрице, с линейным диапазоном изменения сигнала от 2 пг до 1 нг [158]. Такая чувствительность обнаружения сопоставима с методом флуоресцентной детекции. Однако в отличие от флуоресценции регистрацию хромогенных сигналов можно осуществлять визуально или с помощью недорогих устройств типа планшетного сканера или цифровой фотокамеры.

Проявители с п-фенилендиамином и амидолом формируют серую окраску низкой интенсивности. Напротив, проявители с гидрохиноном и метолом дают яркий, контрастный сигнал [30, 31]. Ряд зарубежных фирм выпускают физические проявители (Silver enhancer kit) в виде двух стабилизированных растворов, смешиваемых перед проявлением. Однако плотность оптического сигнала при таком проявлении значительно ниже, чем при использовании метолового усилителя, готовящегося непосредственно перед проявлением [34].

Предложены системы амплификации сигнала для повышения чувствительности иммуноанализа, в частности, биотинилтирамидная амплификация, получившая наименование CARD (catalyzed reporter deposition), снизившая предел обнаружения больше чем в 25 раз по сравнению с обычным дот-ИФА [75]. В этом методе иммобилизованная пероксидаза хрена производит радикалы биотинилированного тирамина, которые связываются со всеми остатками тирозина любого белка, находящего поблизости от области распознавания. Последующая обработка матрицы конъюгатом метки с авидином или стрептавидином позволяет достигнуть очень высокой плотности метки в зоне распознавания. Дальнейшее усовершенствование этого метода (модификация

Super-CARD) позволило за счёт применения блокирующих белков, «обогащённых электронами», снизить лимит обнаружения в  $10^5$  раз [71]. Следует отметить, что такая высокая чувствительность была достигнута в модельных экспериментах с прямым обнаружением очищенных антител и антигенов. Недостатком амплификации является применение нестандартных, дорогих, короткоживущих компонентов, что удорожает и усложняет реализацию анализа. Кроме того, амплификация вводит дополнительный этап в схему анализа и увеличивает время его выполнения.

Флуорофорные методы используют флуоресцентные, люминесцентные и хемилюминесцентные маркёры [142]. Преимущество таких методов заключается в том, что для них не нужна процедура проявления, за счёт длительность анализа сокращается. В большинстве существующих вариантов анализа на основе ДНК-или белковых матриц используется флуоресцентная детекция [99, 100, 142]. Флуоресцентные молекулы поглощают световую энергию из внешнего источника света, что приводит к возбуждению электронов в пределах молекулы и эмиссии света с длиной волны, отличной от падающего света. Флуорофоры входят в самые разные классы химических соединений и различаются по спектрам эмиссии. В настоящее время используются флуоресцеин, родамин (Texas Red), различные фикобилипротеины (phycobiliproteins), нитробензоксадиазол (nitrobenzoxadiazole), акридины (acridines), цианины (cyanines) и другие вещества и составы. Выбор флуорофора для использования на микроматрицах зависит от типа исследуемого образца, подложки и количества аналитов [100]. Флуоресцентный метод применим для матриц с прямой детекцией и для сэндвич-анализа, однако требует сложной специальной аппаратуры. Это ограничивает его применение, особенно в широкой клинической диагностике.

Хемилюминесценция — люминесценция, сгенерированная химической реакцией. Хемилюминесцентные методы используются для обнаружения комплекса первичных антигенсвязанных антител с вторичными антителами, которые связаны в свою очередь с щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена. Ферментное окисление субстрата, например люминола, заканчивается образованием продукта, обеспечивающего длительную эмиссию света, который фиксируется рентгеновской плёнкой, с помощью лазерно-фосфорного

визуализатора или цифровой камеры. Хемилюминесцентные методы могут использоваться в любом из методов детекции с мечеными зондами. Стратегии амплификации, такие как описанная выше биотинилтирамидная, также могут быть объединены с хемилюминесцентной детекцией [150]. Преимуществом хемилюминесцентных методов является возможность создавать постоянную запись результатов на плёнке; они обладают высокой чувствительностью и скоростью, однако имеют ограниченный диапазон изменения сигнала и также нуждаются в специальной аппаратуре и квалификации оператора [163].

Результаты радиоизотопного анализа могут быть учтены относительно простым способом радиографии, при котором иммобилизованные на матрице радиоизотопы, например  $^{135}\text{J}$ , производят фотоотпечаток при контакте с фоточувствительными материалами. Однако работа с радиоактивными изотопами небезопасна для здоровья исследователей и требует создания специальных условий, а для выполнения анализа необходимо длительное время (от нескольких часов до суток). В связи с перечисленными причинами метод не находит в настоящее время широкого применения [100].

Таким образом, при конструировании тестов на основе белковых микроматриц наиболее перспективными и приемлемыми для быстрого внедрения в практику представляются хромогенные методы, способные обеспечить высокую чувствительность и простой учёт результатов невооружённым глазом или с помощью компьютерной техники.

#### **1.4.6 Проблемы создания мультиплексных тестов**

Кроме описанных выше технических проблем, существует ряд теоретических ограничений и недостаточно отработанных практических вопросов, затрудняющих определение и количественное измерение белков в мультиплексном иммуноанализе. Эти сложности включают:

- совместимость на одном аналитическом устройстве реагентов захвата, полученных из разных источников, по аффинности, срокам изготовления, чистоте, размерам, химическому составу и условиям иммобилизации [92, 99, 173];
- перекрёстную реактивность реагентов захвата [99, 173];
- резкие отличия концентраций одновременно определяемых аналитов [181];

- различия в составе и свойствах анализируемого матрикса (фибриноген, активность комплемента, перекрёстно реагирующие и аутоантитела, различные антикоагуляционные системы и др.) [148, 149, 161];
- химическая и структурная неоднородность материала подложки [33];
- вариабельность в размере пятен реагентов захвата или в их плотности [99, 173];
- внутренние помехи [173].

Перечисленные факторы обуславливают проблемы с точностью и воспроизводимостью мультиплексного анализа [70, 117, 126, 129, 178]. Большинство из этих проблем присущи и моноспецифическим тестам, но для иммуночипов они возрастают кратно мультиплексности платформы. Основное число публикаций в области комплексного анализа сосредоточено на преодолении этих сложностей и свидетельствуют о том, что, несмотря на очевидные успехи, мультиплексный анализ пока далёк от совершенства.

### **1.5 Выводы**

Детские вирусные инфекции представляют и медицинскую и социальную проблему, поскольку наносят большой экономический ущерб и представляют реальную угрозу для национальной безопасности. Одними из наиболее значимых детских инфекций являются корь, краснуха и эпидемический паротит. Эти ДВВИ широко распространены среди населения, способны приводить к возникновению эпидемий, тяжёлым осложнениям и смерти, невынашиванию беременности, а также к поражениям плода и новорождённого.

Основным приёмом борьбы с ДВВИ является вакцинопрофилактика. За последнее десятилетие плановая и масштабная вакцинация привела к существенному снижению показателей заболеваемости этими инфекциями, что позволило ВОЗ в отдельных регионах мира прогнозировать ликвидацию этих болезней. Однако, несмотря на достигнутые успехи, в последние годы в ряде стран Европы и в России периодически отмечаются вспышки этих заболеваний. Среди причин ухудшения эпидемиологической обстановки наряду с неполным охватом вакцинацией выделяются недостаточная эффективность применяемых вакцин, нарушение правил обращения с вакцинами и истощение прививочного иммунитета у лиц старших возрастных групп. Вследствие этих причин значительная часть

населения не обладает защитным иммунитетом и нуждается в дополнительной вакцинации.

Выявление таких лиц может быть произведено путём серологического обследования. Применяемые в настоящее время методы обследования (преимущественно ИФА) моноспецифичны, могут выполняться в условиях специально оборудованной лаборатории, дороги и неоперативны. Таким образом, разработка более эффективных инструментов тестирования актуальна не только для медицины, но и в экономическом и социальном аспектах.

Одним из путей повышения эффективности серологического обследования может быть создание автономного мультиплексного теста для одновременного выявления необходимого спектра серологических маркёров ДВВИ. Такой тест может значительно облегчить проведение первичного тестирования, сделать его более оперативным, дешёвым и доступным для пациентов. Мультиплексный иммуноанализ – новый подход в диагностике, сопряжённый с большим числом технических проблем, не имеющих пока оптимального решения. Поэтому создание каждого мультиплексного набора требует тщательной экспериментальной проработки (начиная от выбора подложки, подбора совместимых иммунокомпонентов и способа их иммобилизации на матрице до условий выполнения теста и оценки его качества) с целью выбора наиболее эффективных решений.

Наиболее простым для изготовления и внедрения в медицинскую практику представляется мультиплексный тест, выполняемый на белковых матрицах с низкой плотностью нанесения реагентов захвата. В качестве реагентов захвата целесообразно использовать антигены, совместимые на одной подложке, а в качестве системы детекции – конъюгаты на основе коллоидного золота с усилением оптического сигнала путём физического проявления.

## Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы

В работе использовали казеин, натрия азид, детергент 7X; твин 20 («Sigma», США); химические реактивы отечественного производства с квалификацией не ниже «чда».

**Вирусные антигены.** Антиген вируса краснухи представлен композицией рекомбинантных белков E1, E2 и С (фирма «Капель», Москва). Антиген вируса кори [28] получен из штамма НовО/96 вируса кори, а антиген вируса паротита [27] – из штамма Драгун вируса эпидемического паротита, депонированных в коллекцию культур микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Вирусы культивировали на монослое клеток Vero с последующей очисткой и концентрированием в градиенте плотности сахарозы, а также инаktivацией вирусной активности прогреванием при 56 °С в течение 1 ч.

**Сыворотки.** В работе использовали рабочую панель из донорских сывороток, предоставленную ЗАО «ИмДи» (Новосибирск), а также калибровочные образцы из наборов «ВекторКорь-IgG» и «ВекторРубелла-IgG» (ЗАО «ВекторБест», Новосибирск). В оценочных экспериментах использовали 5 образцов сыворотки крови человека, характеристики которых, полученные на соответствующих наборах для моноспецифического ИФА (ЗАО «ВекторБест», Новосибирск), приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристики контрольных сывороток в ИФА

№ образца	ОП <sub>450</sub>					
	1	2	3	4 (К+)	5 (К-)	ОП <sub>крит.</sub>
Краснуха ( <i>Rubella</i> )	1,654	0,825	1,012	1,984	0,102	0,250
Корь ( <i>Measles</i> )	2,120	1,745	1,861	1,924	0,068	0,275
Паротит ( <i>Mumps</i> )	0,625	0,570	0,136	1,553	0,076	0,300

**Конъюгаты.** В серийных постановках дот-иммуноанализа в качестве конъюгата использовали иммунозоль *Au-a/Hum MAT* – золь (20 нм) золота, адсорбционно связанный с моноклональными антителами против IgG человека (Sigma, США). В отдельных экспериментах применяли конъюгаты коллоидного золота с белком G *Staphylococcus aureus* (фирма «Имтек», Москва), а также с

протеином А *Staphylococcus aureus* («Sigma», США). Получение золей золота цитратным методом, связывание их с антителами и очистку проводили по ранее описанной методике [156]. В сравнительных экспериментах использовали конъюгат щелочной фосфатазы с белком А *Staphylococcus aureus* (ЩФ-SpA) («Sigma», США).

**Проявляющие системы.** Для проявления конъюгата ЩФ-SpA использовали готовый к применению субстрат «BCIP/NBT Liquid Substrate System» («Sigma-Aldrich», Германия). Для проявления конъюгатов на основе коллоидного золота использовали физический проявитель с метолом, который готовили непосредственно перед применением, смешивая растворы 1 %-й лимонной кислоты, 0,4 %-го метола и 10 %-го нитрата серебра в соотношении 1:1:0,04 (по объёму), соответственно.

## 2.2 Методы

**Микроскопические исследования.** Структуру поверхности образцов синтетической бумаги исследовали методами:

- световой микроскопии с использованием микроскопа «AxioImager Z1» и камеры «MRC» с объективом  $\times 40$  (увеличение  $\times 400$ );

- сканирующей электронной микроскопии с использованием сканирующей приставки H-6010A к электронному микроскопу H-600 («Hitachi», Япония) и с подготовкой образцов по стандартной методике (напылением слоя золота толщиной 20 нм с помощью напылительной установки JFC-1100 («JEOL», Япония);

- атомно-силовой микроскопии с использованием микроскопа «Solver P47Bio» с кремниевыми зондами NGS11 (ЗАО «NT-MDT», Россия) в режиме прерывистого контакта [21].

**Изготовление белковых матриц.** Белковые матрицы изготавливали из синтетической бумаги «Pentaprint» марки PR-M480/09-07/8101-482D8 (ЗАО «ФорДа», Новосибирск) в виде блоков (гребней) по 5 матриц в блоке. Блоки вырубали в типографии ООО «Деал» (Новосибирск) с применением штанц-формы и тигельного пресса KLUGE E-14 с давлением натиска 40 тонн, отмывали в трёх сменах дистиллированной воды (по 10 мин) в ультразвуковой ванне ПСБ-44035-04 (ПСБ «Галс», Москва) и высушивали на воздухе. Антигены и иммуноглобулины

человека (положительный контроль – K+), разведённые в 0,005 М боратном буферном растворе (pH 6,0) до концентрации 10–20 мкг/мл, наносили на каждую матрицу отдельными пятнами по определённой схеме. Нанесение (аликвотами по 2 мкл) выполняли в ЗАО «ИмДи» с помощью специально изготовленного автоматического диспенсера. Блоки инкубировали в холодильной камере при 4 °С в течение 12 ч и досушивали в термостате при 40 °С в течение 2 ч. Блокировали погружением при комнатной температуре на 2 ч в 0,2 %-й раствор казеина в 0,01 М фосфатном буферном растворе (pH 7,3), затем погружали на 1 мин в стабилизатор, тщательно просушивали, упаковывали в полиэтиленовые пакеты и хранили до использования при 4 °С. Для отдельных экспериментов на небольшие партии матриц нанесение антигенов проводили вручную или с использованием модифицированного планшетного перьевого плоттера «Graphitex MP4200» [33].

**Дот-иммуноанализ.** При выполнении дот-иммуноанализа все операции выполняли при комнатной температуре (20 °С). Матрицы инкубировали в течение 25 мин с контрольными сыворотками в разведении 1/20 на ФСБТ (0,01 М натрия фосфорнокислого, 2-замещённого; 0,01 М калия фосфорнокислого, 1-замещённого; 0,15 М NaCl; 0,1 % твин 20 и 0,1 % натрия азида, pH 9,5) с добавлением 0,05 % казеина. По окончании инкубации подложки дважды по 1 мин отмывали ФСБТ, погружали в рабочее разведение иммунозоля *Au-a/Hum MAT* на ФСБТ и инкубировали в течение 25 мин, затем отмывали дважды ФСБТ и дважды дистиллированной водой, после чего проявляли связанное с подложкой золото в течение 7 мин в растворе «физического проявителя» (растворы 1 %-й лимонной кислоты, 0,4 %-го метола и 10 %-го нитрата серебра, смешанные непосредственно перед проявлением в соотношении 1:1:0,04 соответственно). Далее ополаскивали проявленные подложки дистиллированной водой и стабилизировали окраску в щелочном растворе тиомочевина в течение 1 мин, затем снова ополаскивали дистиллированной водой. Высушивали и визуально учитывали результаты по наличию или отсутствию тёмных пятен в местах нанесения соответствующих антигенов. После этого изображение иммуночипов оцифровывали с использованием планшетного сканера и анализировали с применением специально разработанной компьютерной программы. Эта программа позволяет определять оптическую плотность в каждой зоне нанесения антигена и выражать её в

процентах диапазона от положительного контроля – IgG человека ( $K^+ = 100\%$ ) до отрицательного контроля – зоны, свободной от антигенов ( $K^- = 0\%$ ); а также задавать отсекаемые значения – ОПкрит, определённые предварительно с помощью панели отрицательных сывороток, и выдавать на печать протокол исследования. Корреляционный анализ выполняли с помощью программы Excel.

*Иммуноферментный анализ.* В качестве тестов сравнения при оценке показателей многопрофильного анализа использовали коммерческие наборы для ИФА: «ВекторКорь-IgG», «ВекторПаротит-IgG» и «ВекторРубелла-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск); «Корь-IgG-ДС», «Мелиса Паротит-IgG» и «Мелиса Краснуха-IgG» (ЗАО «МБС», Новосибирск); «Корь-IgG-антитела», «Паротит-IgG-антитела» и «Краснуха-IgG-антитела» (ООО «ИмДи-спектр», Новосибирск). ИФА выполняли в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Результаты регистрировали на сканирующем спектрофотометре Multiscan 310C (Titerteck, Финляндия) при  $\lambda = 450$  нм.

## **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **3.1 Отработка способов изготовления белковых матриц**

#### **3.1.1 Исследование целевых свойств материалов для изготовления подложки**

Белковая матрица для выявления антител представляет собой плоскую подложку, на поверхности которой дискретно нанесены в определённом порядке антигены различных возбудителей. Расшифровка результатов после выполнения на них дот-иммуноанализа проводится по наличию окрашенных пятен в точно пространственно определённых зонах нанесения антигенов. Выбор материала подложки является первым шагом на пути создания белковой матрицы. Идеальная подложка должна соответствовать критериям, увеличивающим отношение "сигнал/фон" при постановке анализа. К таким критериям относятся: однородная поверхность, возможность связывать на ограниченной площади достаточное количество белка без нарушения его функциональных свойств, способность прочно удерживать белки на поверхности в процессе анализа, минимальное неспецифическое связывание, совместимость с используемыми методами детекции, технологичность при изготовлении диагностических устройств и удобство в обращении [92, 31, 142].

Ранее моими коллегами была проведена оценка широкого круга листовых материалов, потенциально пригодных для изготовления подложек белковых матриц. Эти материалы включали стекло, фильтрующие мембраны из нитроцеллюлозы, лавсана и поливинилхлорида, непористые пластические массы (полистирол, лавсан, ПВХ) и синтетическую бумагу Polyolith. Лучшим вариантом признана синтетическая бумага Polyolith марки GC-3, которая в течение ряда лет использовалась для изготовления матриц. Однако в 2011 г. этот материал снят с производства и в настоящее время недоступен, в связи с чем возникла необходимость изыскания альтернативы.

В этой работе мы рассматривали доступные сорта белой, матовой синтетической бумаги. Перечень материалов и источники их приобретения приведены в таблице 3.

Синтетическая бумага Polyolith поставляется ООО «Берег», С-Пб ([www.bereg.net](http://www.bereg.net)) в формате листов 700 × 1000 мм. Один из сортов бумаги «Polyolith»

под торговой маркой Lux-Print продаётся ООО Комус ([www.komus.ru](http://www.komus.ru)) в том же формате. Бумага изготавливается методом прокатки из полипропиленовой массы, прошедшей минеральное упрочнение с помощью смеси карбоната кальция и диоксида титана для придания белизны и матовости, и проходит финальную обработку коронным разрядом. Она устойчива к воздействию воды, тепла, масла и химических реактивов.

Таблица 3 - Основные целевые свойства и источники получения материалов, потенциально пригодных для изготовления подложки иммуночипов

Материал	Марка	Поставщик	Эффектив- ность сорбции	Фоновое связы- вание	Фоновое прояв- ление
Полипропилен	Lux-Print	ООО «Комус» <a href="http://www.komus.ru">www.komus.ru</a>	н/о	н/о	++
ПВХ	Zenofol-print	ООО «Зенон» <a href="http://www.zenonline.ru">www.zenonline.ru</a>	++++	-	-
ПВХ	Пластик для струйной печати	ЗАО «Корпорация знак» <a href="http://www.znak-korp.ru">www.znak-korp.ru</a>	н/о	н/о	++++
Полипропилен (синтетическая бумага Polyolith)	GC-3 (0,25 мм)	ООО «Берег» <a href="http://www.bereg.net">www.bereg.net</a>	+++++	-	-
	GH-1 (0,45 мм)		++++	+/-	-
	PA-1 (0,2 мм)		н/о	н/о	+++
ПВХ (синтетическая бумага Pentaprint)	PR-E281/49- 05/9200-542_4	ЗАО «ФорДа» <a href="http://www.forda.ru">www.forda.ru</a>	н/о	н/о	++
	PR-M180/09- 04/8400-542_4		++++	+/-	-
	PR-M180/09- 04/8400-462D8		+++	+/-	-
	PR-M480/09- 07/8101-482D8		+++++	-	-

Примечания: числом крестов в ячейках таблицы пропорционально выражена интенсивность оптических сигналов, знак «-» обозначает отсутствие оптического сигнала, а знак «+/-» — наличие артефактов проявления, н/о — исследования не проводились

Синтетическая бумага Pentaprint поставляется фирмой «ФорДа», Новосибирск ([www.forda.ru](http://www.forda.ru)). Она изготавливается фирмой «Klöckner Pentaplast», Германия ([www.kpfilms.com](http://www.kpfilms.com)) методом экструзии из жёсткого поливинилхлорида с добавлением диоксида титана. Некоторые сорта проходят обработку коронным разрядом. Листы с размерами 700–1000 мм не содержат пластификаторов и тяжёлых металлов. Материал обладает высокой устойчивостью к воздействию

ультрафиолетового излучения, низких температур, масел, грязи и различных химических веществ.

Синтетическая бумага Zenofol-print поставляется ООО «Зенон», Новосибирск ([www.zenonline.ru](http://www.zenonline.ru)). Пробники бумаги толщиной 0,5 мм предоставлены в формате А4. Согласно описанию, приведённому на сайте поставщика, бумага изготовлена на основе ПВХ и имеет на одной стороне плёночное покрытие. Материал этого покрытия в описании не приводится.

Пластик для струйной печати ЗАО «Корпорация знак» ([www.znak-korp.ru](http://www.znak-korp.ru)) толщиной 0,5 мм изготовлен на основе ПВХ методом экструзии. Этот материал используется для изготовления электронных карт и имеет с одной стороны клеевое покрытие.

При исследовании материалов в первую очередь оценивали совместимость его чистой поверхности с проявителем, используемым в тесте. Проявитель представляет собой раствор нитрата серебра и восстановителя в кислой среде, стабильный в течение 15–20 мин. Ионы серебра из раствора проявителя способны каталитически восстанавливаться на поверхности частиц золота, серебра, селена или графита с образованием металлического серебра, окрашивающего поверхность в чёрно-серый цвет. Дестабилизировать проявитель с диффузным выпадением серебра на доступные поверхности способны галогениды, сульфиды и некоторые другие вещества, которые потенциально могут присутствовать в материалах подложек.

Для оценки фонового проявления материалы, отмытые дистиллированной водой, нарезали стрипами 60 × 8 мм и погружали их одним концом в свежеприготовленный раствор проявителя при комнатной температуре на 10 мин, ополаскивали дистиллированной водой, подсушивали на воздухе и визуально учитывали результаты. Результаты оценки приведены на рисунке 4.

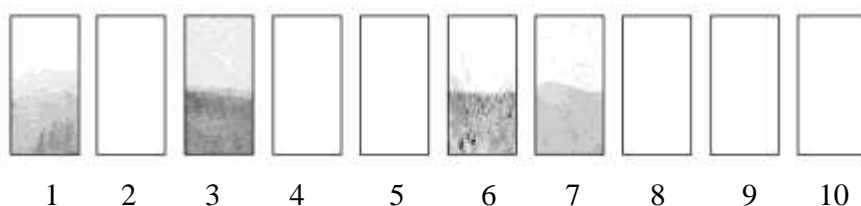


Рисунок 4 - Результаты оценки совместимости с проявителем материалов: 1 – Lux-Print; 2 – Zenofol-print; 3 – пластик (ПВХ) для струйной печати; 4, 5 и 6 – синтетическая бумага Polyolith марок GC-3, GH-1 и PA-1, соответственно; 7, 8, 9 и 10 – синтетическая бумага Pentaprint марок PR-E281/49-05/9200-542\_4, PR-M180/09-04/8400-542\_4, PR-M180/09-04/8400-462D8 и PR-M480/09-07/8101-482D8, соответственно

На рисунке 4 видно, что четыре образца бумаги: Lux-Print и синтетическая бумага Polyolith марки PA-1 (изготовленные на основе полипропилена), а также пластик для струйной печати и синтетическая бумага Pentaprint марки PR-E281/49-05/9200-542\_4 (на основе ПВХ) провоцируют проявление и не годятся для применения в иммуноанализе. Пластик для струйной печати вызывает наиболее интенсивные отложения серебра на своей поверхности, предположительно, из-за наличия клеевого слоя, нанесённого на одну из сторон материала. Причина дестабилизирующего проявителя воздействия других материалов не столь очевидна и, вероятно, кроется в особенностях их химического состава. Эти материалы были исключены из дальнейших исследований.

На следующем этапе изучали микроскопическую структуру поверхности с двух сторон оставшихся 6 образцов. Параллельно проводили адсорбцию на них четырех различных антигенов (см. разд. Материалы). После выполнения дот-анализа 4 контрольных сывороток оценивали эффективность адсорбции антигенов, о которой судили по интенсивности оптического сигнала в местах их нанесения; а также способность к неспецифическому связыванию компонентов, о которой судили по наличию или отсутствию фонового оптического сигнала на несенсибилизированных участках подложек. Результаты исследования представлены на рисунках 5 и 6.

Исследования методом световой микроскопии не выявили существенных различий между образцами и их результаты на рисунках не приведены. Однако более детальные исследования фактуры разных сортов синтетической бумаги методами сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии показали, что у всех образцов стороны листа имеют разную шероховатость. Стороны с более упорядоченной и мелкой структурой далее будут обозначены как лицевые, а с более грубой – как оборотные (на рисунке 5 и 6 они обозначены для каждого образца литерами F и R, соответственно).

Эталоном сравнения в этих исследованиях служила синтетическая бумага Polyolith марки GC-3. Лицевая сторона этой бумаги имеет достаточно однородную развитую поверхность с овальными структурами размером 1–2 мкм, прочно связывает антигены и обеспечивает адекватные результаты анализа, совпадающие с результатами моноспецифического ИФА.

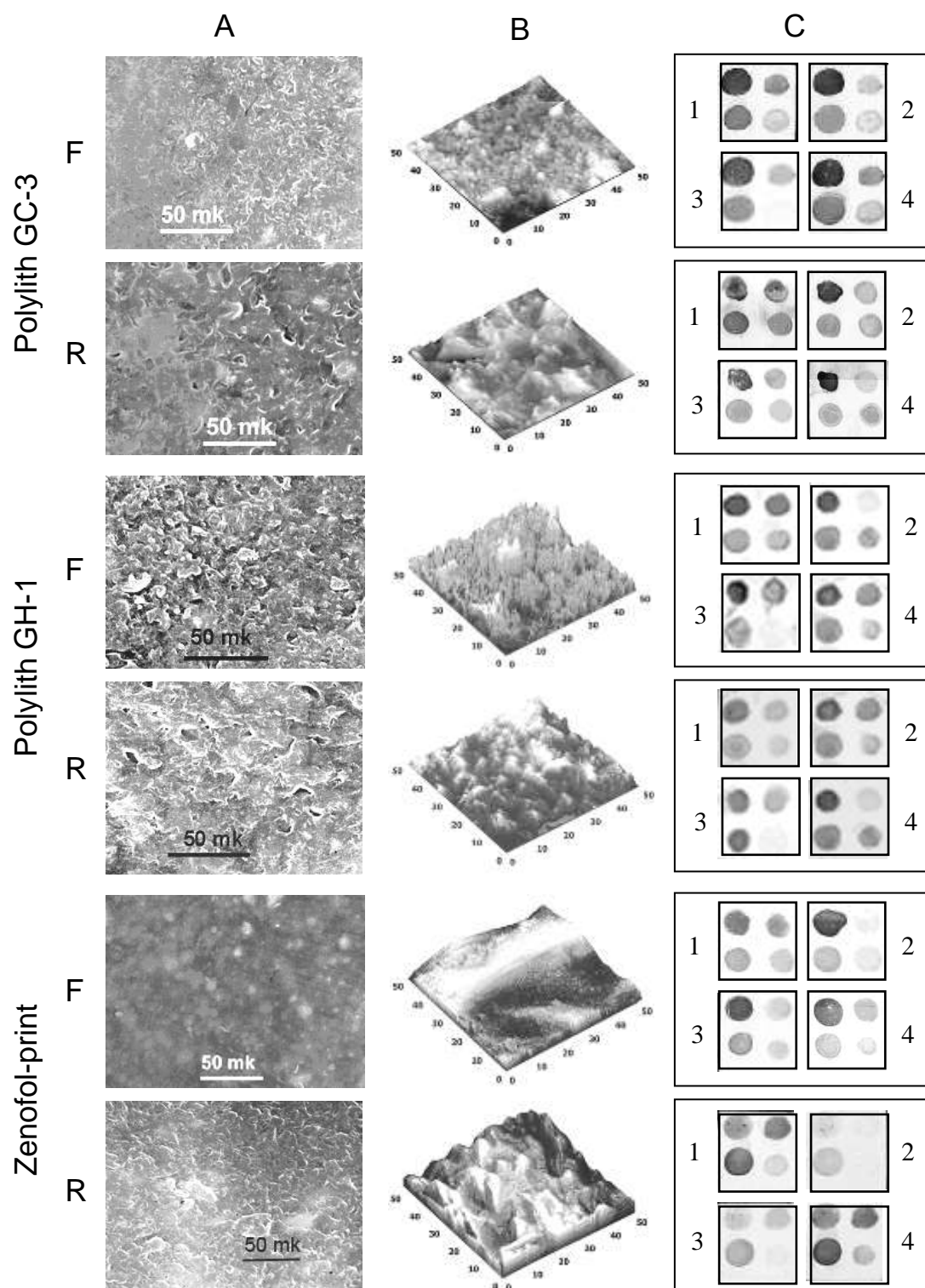


Рисунок 5 - Результаты оценки целевых свойств разных сортов синтетической бумаги. Колонка А – сканирующая электронная микроскопия (масштаб указан на каждом снимке). Колонка В – атомно-силовая микроскопия (масштаб в мкм указан на шкале, приведённой на каждом образце). Колонка С – результаты мультиплексного дот-иммуноанализа 4 контрольных сывороток, выполненного на тестируемой поверхности. F – лицевая, R – обратная сторона листа. Порядок нанесения антигенов на матрице слева направо: верхний ряд – IgG-антитела человека, антиген вируса краснухи; нижний ряд – антиген вируса кори, антиген вируса паротита

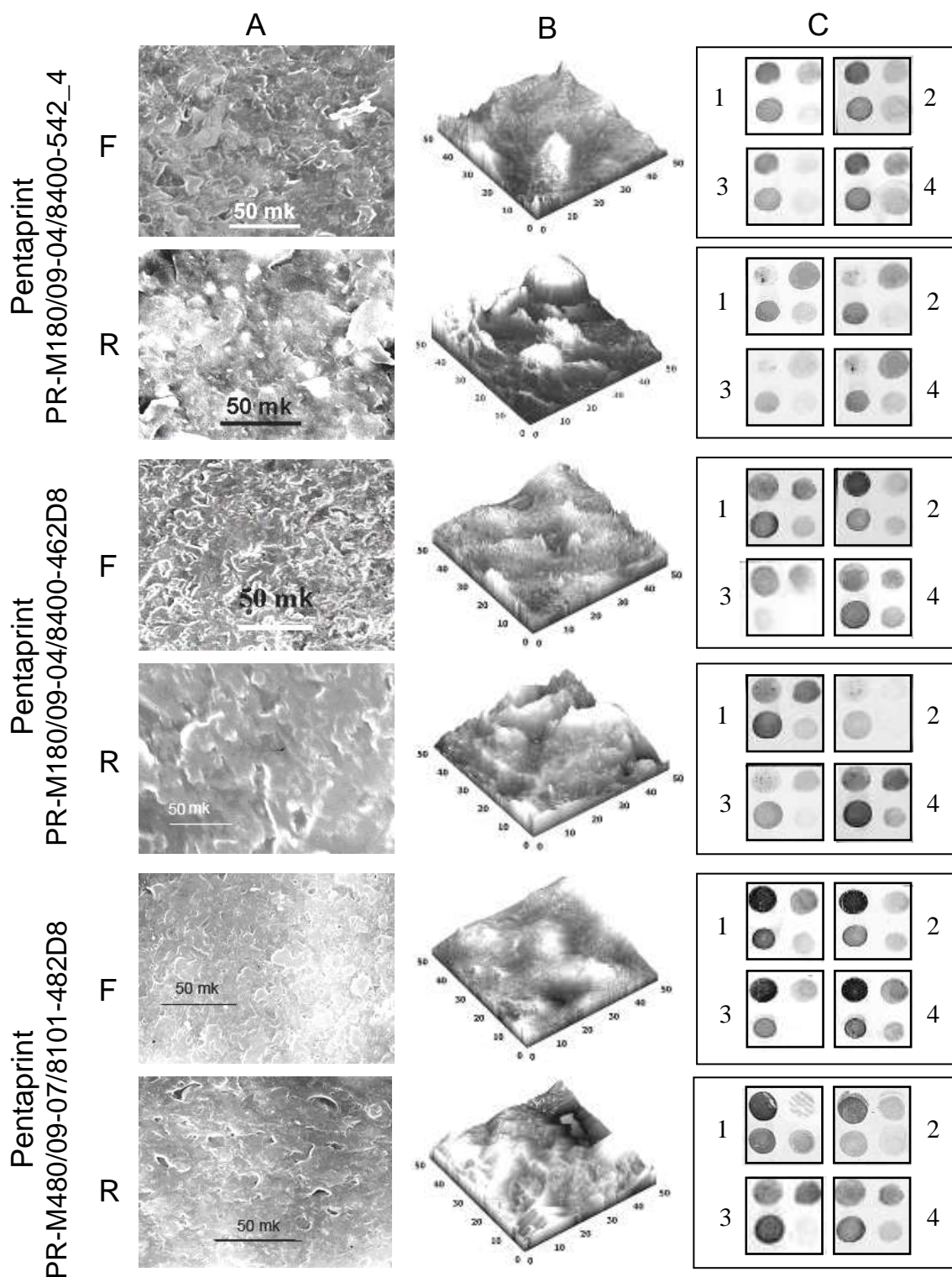


Рисунок 6 - Результаты оценки целевых свойств разных сортов синтетической бумаги Pentaprint -

Колонка А – сканирующая электронная микроскопия (масштаб указан на каждой снимке). Колонка В – атомно-силовая микроскопия (масштаб в мкм указан на шкале, приведённой на каждом образце). Колонка С – результаты мультиплексного дот-иммуноанализа 4 контрольных сывороток, выполненного на тестируемой поверхности. F – лицевая, R – оборотная сторона листа. Порядок нанесения антигенов на матрице такой же, как на рисунке 5

Другой сорт этой бумаги, GH-1, с обеих сторон имеет более грубую структуру поверхности, чем GC-3. Качественно результаты дот-анализа на лицевых сторонах этих материалов совпадают, однако на бумаге GH-1 пятна выглядят более размытыми и негомогенными, а на свободных от антигенов участках подложки видны артефакты проявления. Все эти признаки свидетельствуют о структурной и, возможно, химической неоднородности поверхности.

Как уже отмечалось выше, бумага Zenofol-print имеет на одной (вероятно, лицевой) стороне плёночное покрытие. Материал этого покрытия в описании не приводится, однако на рисунке 5 (фрагмент CF3) видно, что на его поверхности генерируется неспецифический оптический сигнал в месте нанесения антигена паротита (образец № 3 не содержит антител к этому вирусу – см. таблицу 2), а другие пятна выглядят размытыми и негомогенными. Обратная сторона материала по всем признакам выглядит очень грубой и неравномерной.

Результаты исследования вариантов ПВХ бумаги Pentaprint представлены на рисунке 6. Видно, что поверхность лицевой стороны марки PR-M480/09-07/8101-482D8 наиболее близка по структуре и эффективности адсорбции антигенов к эталону сравнения (Polyolith марки GC-3) и выглядит наиболее пригодной для изготовления иммуночипов. Лицевые стороны 2 других марок ПВХ-бумаги имеют заметно более выраженный рельеф, значительно хуже связывают белки и в ряде случаев генерируют фоновый сигнал (см. рисунок 6, фрагменты PR-M180/09-04/8400-542\_4 CF2 и 4; PR-M180/09-04/8400-462D8 CF1 и 2). Обратные стороны всех марок этих материалов имеют очень грубую структуру, слабо и неравномерно адсорбируют белки, а также провоцируют фоновые сигналы. Фоновые явления, вероятно, можно объяснить механической задержкой наночастиц золотого конъюгата в грубой фактуре подложки. Эти частицы не удаляются полностью при отмывках и катализируют восстановление серебра из раствора проявителя.

Преимущества марки PR-M480/09-07/8101-482D8, по-видимому, складываются из нескольких факторов. Во-первых, упорядоченная фактура поверхности, образованная мелкими (3–5 нм) структурами (вероятно, кристаллами диоксида титана), обеспечивает равномерную адсорбцию белков и не вызывает задержки частиц золота, содержащихся в конъюгате. Во-вторых, этот материал имеет повышенное (индекс 07 в обозначении марки) содержание диоксида титана,

по сравнению с двумя другими образцами Pentaprint (индекс 04): как известно, диоксид титана служит хорошим адсорбентом и широко применяется в этом качестве при лабораторных работах [41]. В-третьих, этот материал проходит финальную обработку коронным разрядом (на это указывает литера D в последнем 5-значном индексе обозначения марки), что, вероятно, повышает на поверхности ПВХ число активных радикалов, способных связываться с молекулами белков. Справедливость этого суждения можно подтвердить сравнением 2 других марок бумаги Pentaprint, имеющих одинаковое содержание диоксида титана. Марка PR-M180/09-04/8400-462D8 обработана коронным разрядом, а марка PR-M180/09-04/8400-542\_4 не подвергалась такой обработке и генерирует менее интенсивные оптические сигналы после выполнения анализа контрольных сывороток.

Для оценки вклада органической составляющей на эффективность адсорбции на образцы синтетической бумаги на основе полипропилена (Polyolith GC-3) и ПВХ (Pentaprint PR-M480/09-07/8101-482D8) аликвотами по 2 мкл наносили серию разведений IgG-антител человека, начиная с концентрации 10 мкг/мл. Обработку подложек и выполнение дот-иммуноанализа с использованием золя *Au-a/Hum MAT* выполняли так, как описано в разделе «Методы». Результаты эксперимента представлены на рисунке 7.



10 5 2,5 1,2 0,6 0,3 0,15 0,08 0,04 0,02 0,01 0,005 Концентрация IgG, мкг/мл  
Рисунок 7 - Эффективность адсорбции IgG на синтетической бумаге из ПВХ и полипропилена

Из рисунка 7 видно, что полипропиленовая подложка обеспечивает 4-кратное преимущество по чувствительности выявления IgG. Предел определения на ней составляет 10 нг/мл, а абсолютная чувствительность – 20 пг IgG в точке нанесения. Насыщение поверхности бумаги Polyolith GC-3 происходит при концентрации IgG около 1 мкг/мл. Также из рисунка 7 видно, что при нанесении растворов с более высокими концентрациями избыток антител диффундирует при блокировании матрицы за границы пятна, образуя вокруг него тёмный ореол. Лимит обнаружения IgG на подложке из ПВХ составляет 40 нг/мл (80 пг белка в точке нанесения). Насыщающая концентрация при этом составляет около 5 мкг/мл.

Динамический диапазон изменения окраски на обеих подложках составляет около 2 порядков: от 5 мкг/мл до 40 нг/мл на подложке из ПВХ и от 1 мкг/мл до 10 нг/мл на полипропиленовой подложке. При этом на бумаге Pentaprint более выражена линейная зависимость оптической плотности пятна от концентрации IgG, что крайне важно при выполнении количественных определений. Полученные результаты близки к опубликованным данным по чувствительности выявления IgG в дот-иммуноанализе на нитроцеллюлозе с использованием частиц золота, связанных с анти-IgG-антителами [158].

Таким образом, исследованные материалы значительно различаются по структуре поверхности, сорбционным свойствам и способности провоцировать фоновые сигналы. Фоновые оптические сигналы более заметно проявляются на поверхностях с грубой структурой и, вероятно, связаны с механической задержкой наночастиц золота из конъюгата в неровностях рельефа. Выявлена зависимость эффективности адсорбции белков от равномерности структуры поверхности и органической основы синтетической бумаги, а также от содержания в ней диоксида титана и обработки материала коронным разрядом.

Из исследованных доступных материалов наиболее пригодной для изготовления подложек белковых матриц является синтетическая бумага Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8, обладающая равномерной, тонкой фактурой поверхности; сравнительно высоким содержанием диоксида титана и прошедшая финальную обработку коронным разрядом.

### **3.1.2 Оценка способов выкройки подложек**

При проведении дальнейших исследований нами принят формат мультиплексного теста, позволяющий одновременно выполнять до 5 комплексных тестов. Блок из 5 белковых матриц в нём представлен гребнем с 5 зубцами, выполненным из синтетической бумаги. Чертёж с размерами блока матриц и схема нанесения антигенов на рабочую область иммуночипа приведены на рисунке 8.

Каждый зубец гребня является белковой матрицей. На него в определённом порядке наносят иммунореагенты захвата. Кроме антигенов, в верхнем левом углу рабочей зоны каждого иммуночипа наносят иммуноглобулины из сыворотки крови человека (K<sup>+</sup>), служащие для контроля работоспособности системы и уровня

погружения матрицы в рабочие растворы. Нижний правый сегмент рабочей зоны оставляют свободным (К-) для контроля фоновых явлений.

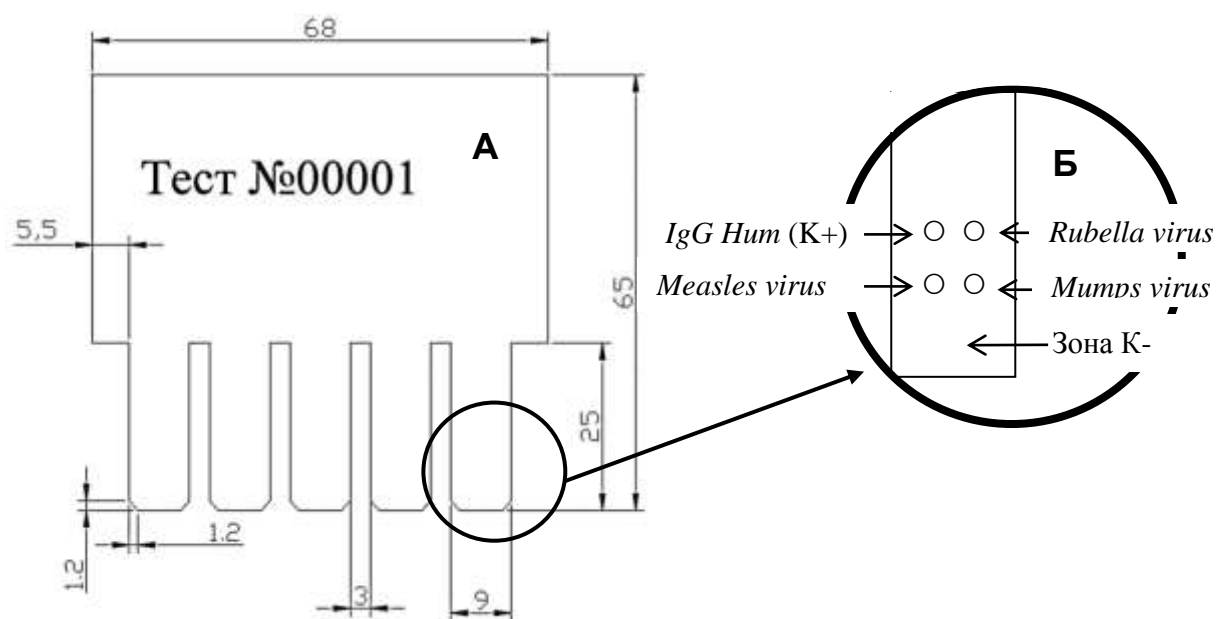


Рисунок 8 - Чертёж блока белковых матриц (А) и схема нанесения антигенов на рабочую область иммуночипа (Б)

Для повышения производительности нанесения иммунореагентов захвата с применением автоматических устройств целесообразно одновременно использовать раскроенный лист с множеством заготовок (подложек) матриц.

Ранее при работе с синтетической бумагой на основе полипропилена выкройку 20 блоков матриц на листе формата А3 выполняли в ЗАО «ИмДи» с применением лазерного гравера VersaLaser 4.60 (США). Однако метод лазерной резки непригоден для раскроя материалов на основе ПВХ. При термической деструкции поливинилхлорида выделяются диоксины - крайне токсичные вещества, проявляющие в организме человека и в окружающей среде кумулятивный эффект. Кроме того, при термическом разложении ПВХ выделяется хлористый водород, образующий при взаимодействии с влагой воздуха соляную кислоту, вызывающую необратимую коррозию важных оптических и механических частей установки. Таким образом, возникла необходимость изыскания альтернативного способа выкройки подложек.

Основными требованиями к выкройке заготовок матриц являются: точность и чистота выреза, отсутствие деформаций и стойких загрязнений материала, высокая скорость резки, а также стоимость конечного продукта. При изыскании способа, удовлетворяющего этим требованиям, опробовано несколько методов:

- вырезка при помощи режущего плоттера;
- фрезерная вырезка;
- механическая вырубка при помощи типографского пресса.

*Вырезка при помощи режущего плоттера* – это точная выкройка по заранее подготовленному векторному шаблону изделия из листового или рулонного пластика. Управляемый микропроцессором нож вырезает материал по контуру любой сложности. При этом за счёт правильно подобранного давления на нож достигается необходимая глубина реза. Этот способ позволяет, в зависимости от плотности материала, прорезать пластики толщиной до 3 мм. Однако попытки тестовой вырезки, проведённые силами специалистов ООО «Альфатех плюс» (г. Новосибирск), с использованием режущего плоттера Graphtec FC2250-60 и ножом 3OU/Force 60/60 (давление на нож 1000 г) окончились неудачей. Устройство смогло прорезать каждый тестируемый материал только за 2 прохода, что заняло примерно 60 минут. Полученная выкройка имела существенные недостатки в виде задиров материала в области реза. Другие устройства с меньшим давлением на нож вообще не смогли прорезать материал. Учитывая быстрый износ и достаточно высокую стоимость ножей, малую скорость резки и плохое качество получаемых заготовок, дальнейшие работы в этом направлении признаны нецелесообразными.

*Фрезерная вырезка.* Выкройка при помощи фрезерно-гравировального станка применяется при работе с плотными и толстыми материалами, которые нельзя обрабатывать при помощи вырубки и лазерной резки (например, ПВХ, древесины, композитных материалов и т.д.). На фрезерных станках, управляемых автоматикой, можно изготовить пластиковую продукцию любой сложности. К преимуществам фрезерной резки относят отсутствие разводов и нагара. Тестовая вырезка специалистами фирмы «Штамп-плюс» (Новосибирск) на фрезерно-гравировальном станке отечественного производства показала, что такой метод выкройки не устраивает ни по скорости обработки (время обработки значительно больше, чем при плоттерной резке), ни по качеству реза (выраженные задиры и деформации). В большинстве случаев края материала после фрезерования требуют дополнительной обработки для устранения дефектов. От дальнейшей разработки направления решено отказаться.

*Механическая вырубка при помощи типографского пресса.* Такой метод считается оптимальным по скорости изготовления большого количества однотипных деталей. Для вырубки заготовок гребёнок с помощью механического пресса высокого давления специалистами ООО «Лазер ТК» (Новосибирск) изготовлена штанцевальная форма по шаблону для лазерной вырезки. Штанцформа состоит из плоского основания с укреплёнными в нём ножами. После ряда экспериментов с участием специалистов ООО «Элит-Пак» (Новосибирск) и применением прессов, развивающих давление до 30 тонн, выяснилось, что такие устройства не способны полностью прорубить шаблон формата А3. Для ПВХ-пластика заметный эффект, облегчающий вырубку, даёт прогрев листа до 50–60 °С во время рубки, однако стандартных устройств, способных поточно выполнять такую операцию найти не удалось. В результате принято решение уменьшить размер штанцевальной формы до одной полосы с гребёнками. Окончательный шаблон для вырубки приведен на рисунке 9.

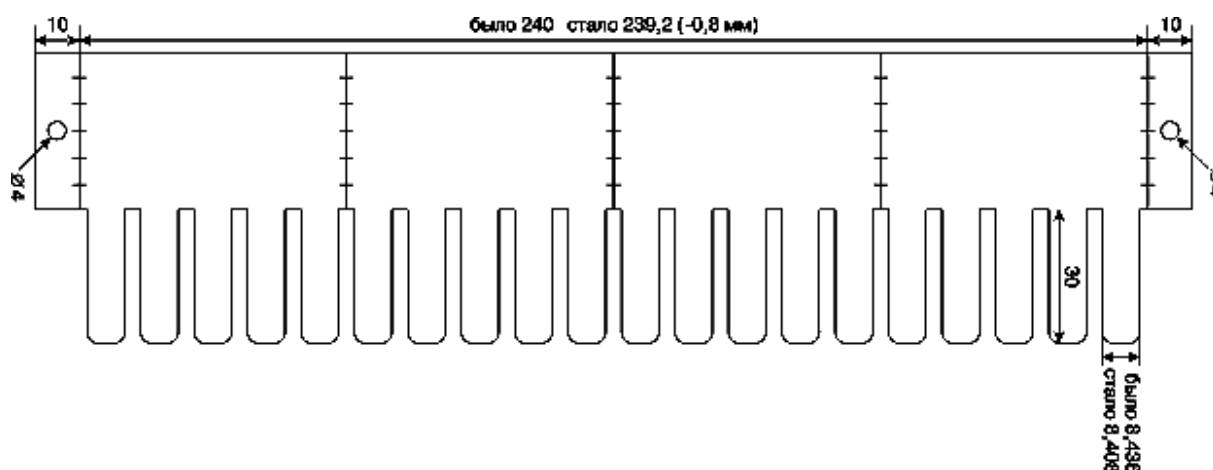


Рисунок 9 - Шаблон штанцевальной формы для вырубки заготовок матриц типографским прессом (приведены компенсирующие допуски размеров при вырубке)

Серийная вырубка заготовок с использованием новой штанцевальной формы выполненная сотрудниками типографии ООО «Деал» (г. Новосибирск) на тигельном прессе KLUGE E-14 с давлением натиска 40 тонн при рабочей температуре 25 °С показала, что такой подход к вырубке заготовок матриц пригоден для изготовления подложек как из бумаги на основе полипропилена, так и из ПВХ-пластиков и отвечает требованиям технологичности, чистоты материала и цены. Ресурс описанной штанц-формы для вырубки заготовок из синтетической бумаги составляет 15 тысяч оттисков при цене около 10 тыс. руб.

### **3.1.3 Оценка способов подготовки поверхности для иммобилизации антигенов**

Поверхность пластика обычно несёт на себе остатки компонентов, используемых при его производстве (минеральная смазка, пластификаторы, порошки для предотвращения слипания листов), и банальные загрязнения (жир, белки). Кроме того, поверхностный слой пластика может содержать производственные примеси и участки с дефектами химического состава и полимеризации. Грязь на поверхность материала может попадать в процессе изготовления заготовок матриц их транспортировки и хранения. Эти загрязнения и дефекты поверхности могут, с одной стороны, снижать эффективность иммобилизации антигенов, а с другой, – вызывать неспецифическое связывание биоконпонентов и спонтанное проявление. В конечном итоге они влияют на уровни специфических и неспецифических сигналов, а также на воспроизводимость результатов анализа.

Для удаления банальных загрязнений обычно применяют отмывку растворами детергентов или щёлочи, для удаления стойких жировых загрязнений – обработку растворителями, а для удаления дефектов поверхностного слоя – травление крепкими растворами кислот. Влияние таких видов обработки на специфический и фоновый оптические сигналы были исследованы коллегами в предыдущий период [32].

Для синтетической бумаги наиболее эффективным способом обработки оказались отмывки с применением додецилсульфата натрия с последующей обработкой фреоном, что указывает на банальный характер загрязнений поверхности. Улучшение воспроизводимости сорбции антигенов после дополнительной обработки подложки тампоном с фреоном свидетельствует, вероятно, о том, что такая обработка удаляет остатки детергента, которые могут удерживаться на поверхности бумаги и препятствовать связыванию с ней белков [133]. Однако такой способ подготовки пластика оказался недостаточно технологичным и экологичным при обработке больших объёмов материала. Поэтому в рамках настоящей работы изыскания более приемлемого способа очистки поверхности синтетической бумаги были продолжены. В результате были предложены 2 варианта обработки:

- механическая обработка в тёплом (40 °С) 0,2 %-м растворе детергента 7X («Sigma», США) с применением губки с последующей отмывкой заготовок в 2 сменах дистиллированной воды и сушкой на воздухе;

- отмывка в 3 сменах дистиллированной воды (по 10 мин) в ультразвуковой ванне ПСБ-44035-04 (ПСБ «Галс», Москва) и сушкой на воздухе, за один цикл может быть обработано до 5 листов формата А3.

Оба способа обеспечивают сходную эффективность сорбции белков на поверхности ПВХ-пластика Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8.

### **3.1.4 Подбор условий иммобилизации антигенов на подложке**

Ранее было показано, что для изготовления матриц на синтетической бумаге наиболее простым и технологичным способом фиксации антигенов является физическая адсорбция [33]. В настоящей работе при изучении условий адсорбции рекомбинантного антигена вируса краснухи и натуральных антигенов вирусов кори и паротита исследовали концентрации антигенов в сорбционной смеси, состав и pH буферных растворов, а также условия инкубации сорбционной смеси на подложках из синтетической бумаги Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8.

Сравнивали 2 режима инкубации: сушка каплей (объём 2,5 мкл) сорбционной смеси на воздухе при комнатной температуре и инкубация подложек с сорбционной смесью в холодильной камере при 4 °С в течение 12 ч с последующей сушкой в термостате при 40 °С в течение 2 ч. Разведения антигенов выполняли на бидистиллированной воде и 0,01 М буферных растворах: Na-карбонатно-бикарбонатном (КББ), pH 9,4 и Na-боратных (ББ), pH 8,0; 7,0 и 6,0. Эффективность иммобилизации оценивали по интенсивности окрашивания пятен в местах нанесения антигенов после выполнения дот-иммуноанализа с сыворотками К+ и К-, характеристики которых приведены в таблице 2. Обобщённые результаты исследования представлены в таблице 4. Количество крестов в ячейках таблицы пропорционально интенсивности визуально определяемого сигнала.

Адсорбция антигенов на синтетической бумаге наиболее эффективна в слабокислой среде (pH 6,0). Иммобилизация белка хорошо происходит при длительной инкубации в холодильной камере и последующем досушивании, напротив, при быстрой сушке каплей на воздухе в течение 10–15 мин интенсивность сигнала значительно снижается.

Таблица 4 – Оценка условий иммобилизации антигенов на подготовленных подложках из синтетической бумаги Pentaprint- M480/09-07/8101-482D8

Антиген (рабочее разведение)		<i>Корь</i> натуральный лизат (1:100)		<i>Паротит</i> натуральный лизат (1:100)		<i>Краснуха</i> Рекомбинантный (1:150)	
№	Условия иммобилизации	Сушка	Холод.	Сушка	Холод.	Сушка	Холод.
1	КБ, pH 9,4	++	++	+	++	+	++
2	ББ, pH 8,0	+	++	+	++	++	++
3	ББ, pH 7,0	+	++	+	++	+	++
4	ББ, pH 6,0	++	+++	++	+++	++	+++
5	Дистиллированная вода, pH 4,9	+	++	+	+	+	++

- Примечания: 1. Использованы буферные растворы с ионной силой 0,01 М.  
 2. Объём нанесения рабочих разведений антигенов – 2,5 мкл на пятно.  
 3. Числом крестов в ячейках таблицы обозначен относительный уровень сигнала.  
 4. ББ – боратный, КБ – карбонатный буферный раствор.

Оптимальные концентрации антигенов подбирали путём исследования серии 2-кратных разведений антигенов в различных буферных системах. После сорбции, блокирования и выполнения дот-иммуноанализа положительной и отрицательной сывороток сравнивали оптические сигналы в пятнах с разными концентрациями антигенов. За рабочее (оптимальное) разведение принимали наибольшее разведение антигена, обеспечивающее максимальный визуальный сигнал с положительной сывороткой (К+) при отсутствии сигнала на отрицательном образце (К-). Результаты исследований проиллюстрированы на рисунке 10.

В рассмотренном опыте лучшие результаты получены при разведении антигенов на боратном буферном растворе, pH 6,0. Оптимальный диапазон рабочего разведения для краснухи определён как 1/150–1/200. Это соответствует концентрации белков 33,3–25,0 мкг/мл. Для паротита оптимум рабочей концентрации находится в диапазоне от 11,0–7,3 мкг/мл (разведение 1/100–1/150), а для кори 32,0–21,0 мкг/мл. Вне этого диапазона снижение концентрации уменьшает сигнал, а повышение – вызывает появление ореола вокруг места иммобилизации за счёт диффузии избытка антигена на окружающие участки подложки, происходящей на этапе блокирования матрицы.

Следует отметить, что концентрации антигенов подобраны для ручного нанесения антигенов на подложку с помощью пипетки. Пригодны эти концентрации и для распечатки антигенов с помощью перьевого планшетного

плоттера. Однако при пробной печати устройством для автоматического нанесения антигенов на подложку «Диспенсер» (см. раздел 3.4.2) в объёме 2 мкл на точку установлено, что распечатанные антигены обладают в 2 раза более низкой активностью, чем аналогичные антигены, нанесённые с помощью пипетки. Причиной утраты активности могут быть адсорбция белков на внутренней поверхности путей подачи раствора, а также снижение специфической активности (вероятно, конформационные изменения) под влиянием сильного электромагнитного поля в клапанах-дозаторах. Учитывая это обстоятельство, при нанесении антигенов с помощью автоматического устройства использовали максимальные значения указанных выше диапазонов концентраций.

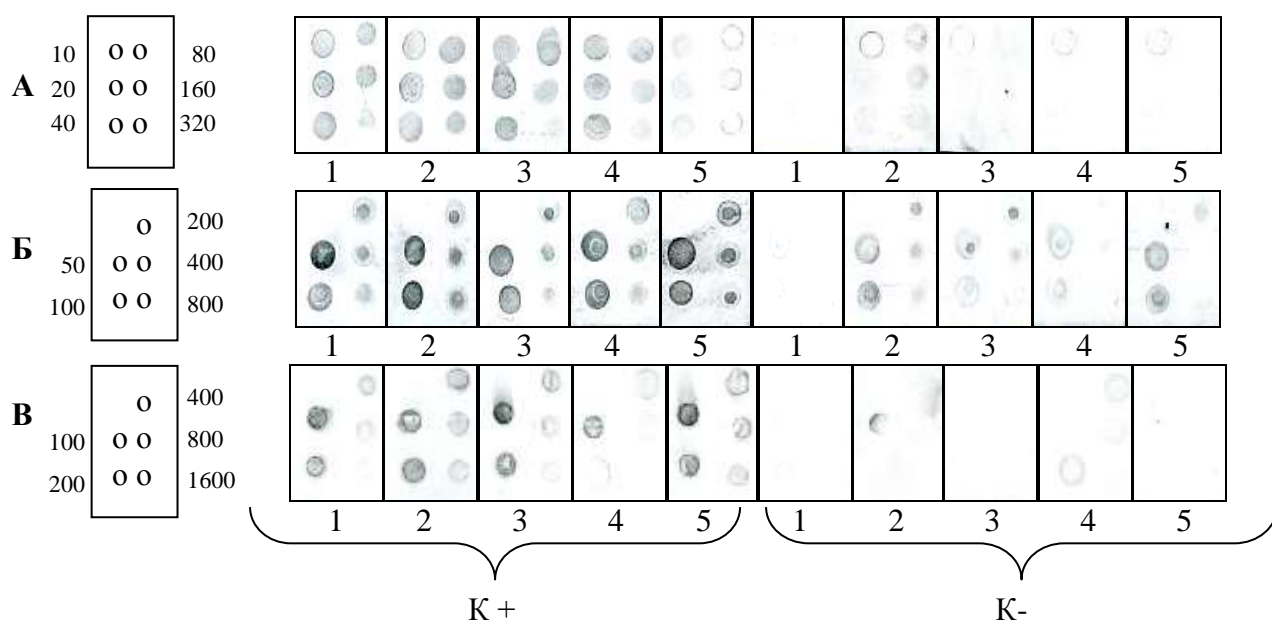


Рисунок 10 - Эффективность адсорбции на синтетической бумаге Pentaprint антигенов: (А) кори (исходная концентрация 3,2 мг/мл), (Б) паротита (исходная концентрация 1,1 г/мл) и (В) краснухи (исходная концентрация 5,0 мг/мл) из боратного буферного раствора: (1) pH 6,0; (2) pH 7,0; (3) pH 8,0; (4) карбонатного буферного раствора, pH 9,4 и (5) дистиллированной воды, pH 4,9. Антигены нанесены аликвотами по 2,5 мкл. Слева приведены схемы нанесения антигенов, цифры обозначают кратность их разведения. К+-положительная сыворотка, К-- отрицательная сыворотка

### 3.1.5 Выбор реагентов и условий блокирования матриц

Процедуру блокирования свободных от иммунореагентов участков матрицы выполняют для того, чтобы избежать неспецифического связывания антител из исследуемого образца и конъюгата непосредственно с материалом подложки [98]. Кроме того, некоторые исследователи считают, что блокированием может быть достигнута дополнительная стабилизация иммобилизованных антигенов за счёт их «стерической поддержки» [122]. Обычно для блокирования используют

естественные или искусственные инертные макромолекулы достаточно крупные для образования стабильной связи с поверхностью, но достаточно мелкие для того, чтобы не вносить стерических помех во взаимодействие антигенов с антителами. Наиболее часто в качестве блокирующих агентов применяют бычий сывороточный альбумин (БСА), казеин, пептон, обезжиренное молоко, желатин и полиэтиленгликоли (ПЭГ) различной степени полимеризации [101]. Растворы с наиболее употребляемыми (по данным литературы) концентрациями этих агентов мы и использовали в экспериментах для оценки эффективности блокирования. Матрицы с напечатанными на планшетном плоттере антигенами и IgG-Hum (K+) инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч в соответствующем растворе блокирующего агента, стряхивали с них избыток раствора и высушивали на воздухе. Затем выполняли анализ нескольких положительных и отрицательных сывороток. Наиболее демонстративные примеры анализа одинаковых образцов приведены на рисунке 11.

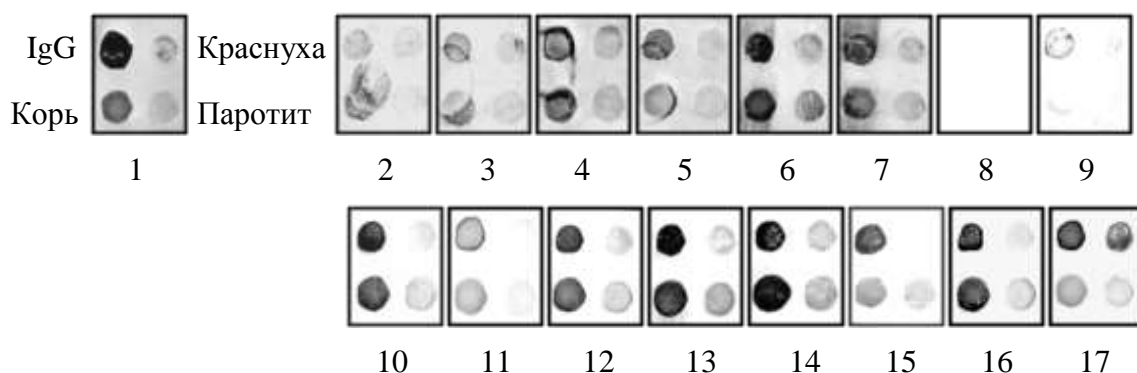


Рисунок 11 - Результаты экспериментов по блокированию матриц водными растворами, содержащими: (1) без блокирования; (2) 0,5 %-й ПЭГ-6000; (3) 0,25 %-й ПЭГ-6000; (4) 0,5 %-й ПЭГ-20000; (5) 0,25 %-й ПЭГ-20000; (6) 1 % триптона; (7) 0,5 % триптона; (8) 2 % БСА; (9) 1 % БСА; (10) 2 % желатина; (11) 1 % желатина; (12) 1 %, (13) 0,5 % и (14) 0,25 % обезжиренного молока; (15) 1 %, (16) 0,5 % и (17) 0,2 % казеина. Схема нанесения антигенов на матрицу приведена на примере (1)

На рисунке 11 видно, что на неблокированной матрице (см. рисунок 11, пример 1) после анализа появляется интенсивный фон, обусловленный, вероятно, связыванием иммуноглобулинов из образца с материалом подложки. Высокий фон подложки можно видеть на матрицах, обработанных полиэтиленгликолями с молекулярной массой 6 и 20 кДа (см. рисунок 11, примеры 2–5), при этом оба реактива ослабляют полезный оптический сигнал. Возможно, эти эффекты связаны со способностью ПЭГ электростатически взаимодействовать с белками [41], с одной стороны, экранируя антигены, а с другой стороны, связывая на себе антитела

из образца. ПЭГ-6000 более заметно ослабляет полезный оптический сигнал, чем ПЭГ-20000, вероятно, из-за более плотной укладки более мелких молекул этого полимера.

Триптон (см. рисунок 11, примеры 6–7) не блокирует свободную поверхность подложки, но десорбируют часть иммобилизованных антигенов, которые беспрепятственно фиксируются на окружающих участках матрицы (тёмные потёки вокруг мест нанесения IgG-Hum и антигена кори).

БСА, напротив, слишком эффективно блокирует матрицы, устраняя не только фоновые, но и полезные оптические сигналы (см. рисунок 11, примеры 8 и 9). Возможны два механизма ослабления полезного сигнала. Первый – десорбция иммобилизованных антигенов и замещение их БСА. Второй – экранирование антигенов крупными (65 кДа) молекулами БСА. Вероятно, имеют место оба механизма. В литературе описаны сходные эффекты устранения всех сигналов при блокировке БСА нитроцеллюлозных мембран [64].

Желатин (см. рисунок 11, примеры 10–11) действует, подобно БСА, но вызывает менее выраженное снижение полезного сигнала. Наиболее вероятно, это снижение связано со стерическими помехами иммунному взаимодействию, а разница в интенсивности окраски пятен после блокирования растворами с 2 % и 1 % желатина может быть объяснено различиями в укладке линейных молекул желатина на поверхности материала. Известно [7], что из более концентрированных растворов желатин предпочтительно связывается с подложкой ограниченными участками своей молекулы. Молекулы при этом образуют в растворе подвижные петли и только частично ограничивают доступ крупных молекул к подложке. При низких концентрациях желатина преобладает плотная линейная укладка его молекул, значительно снижая кинетику химических реакций на поверхности. Желатин мало подходит для наших целей ещё и потому, что в условиях блокирования при комнатной температуре растворы обладают высокой вязкостью, а нередко и желируются, затрудняя их применение.

Сухое обезжиренное молоко считается одним из наиболее популярных блокирующих агентов в различных форматах иммуноанализа [23]. Универсальность этого блокирующего агента объясняется тем, что молоко, помимо казеина, содержит богатый набор белков и полисахаридов с различной

молекулярной массой и физико-химическими свойствами. В наших экспериментах молоко также продемонстрировало хорошее блокирующее действие, обеспечивая одинаково надёжную защиту свободных зон матрицы во всём диапазоне использованных концентраций и линейное ослабление полезного сигнала с повышением концентрации блокирующего агента (см. рисунок 11, примеры 12-14). Однако испытания матриц, обработанных 0,2 %-м молоком, на большой панели сывороток показали, что в ряде случаев молоко экранирует рекомбинантный антиген краснухи, снижая оптический сигнал и вызывая ложноотрицательные результаты анализа. В связи с этим было решено отказаться от использования обезжиренного молока, а в качестве блокирующего агента применять казеин в концентрации 0,2 %, обеспечивающей надёжную блокировку и адекватные полезные сигналы (см. рисунок 11, пример 17).

### **3.2 Обработка способа применения белковых матриц**

#### **3.2.1 Обработка способа детекции иммунологического связывания**

Ранее было показано, что наиболее перспективной меткой конъюгатов в до-иммуноанализе является коллоидное золото [34]. Однако конъюгаты на основе коллоидного золота имеют существенный недостаток - для их визуализации применяют нестабильный проявитель, который необходимо готовить непосредственно в ходе анализа. Конъюгаты щелочной фосфатазы менее чувствительны, но для них существуют коммерчески доступные проявляющие субстраты, стабильные в течение года, что удобно для применения в автономной тест-системе. Учитывая указанные обстоятельства, в рамках настоящей части исследований проводилась сравнительная оценка эффективности применения в мультиплексном анализе этих хромогенных маркёров и систем их проявления с целью выбора наиболее подходящей системы детекции. Основным критерием оценки служил лимит выявления антител, позволяющий достигать чувствительности ИФА. Для сравнения взяты коммерческий конъюгат стафилококкового протеина А со щелочной фосфатазой (*ЩФ-SpA* («Sigma-Aldrich», кат. № P7488)) и конъюгат протеина А с коллоидным золотом (*Au-SpA*), изготовленный самостоятельно по известной методике [156]. Для проявления конъюгата *ЩФ-SpA* использовали готовый к применению субстрат BCIP/NBT Liquid Substrate System («Sigma-Aldrich», кат. № B1911), а для выявления

конъюгатов на основе коллоидного золота использовали проявитель с метолом, который готовили непосредственно перед применением. Принципиальные схемы дот-иммуноанализа, использованные в этом исследовании приведены на рисунке 12.

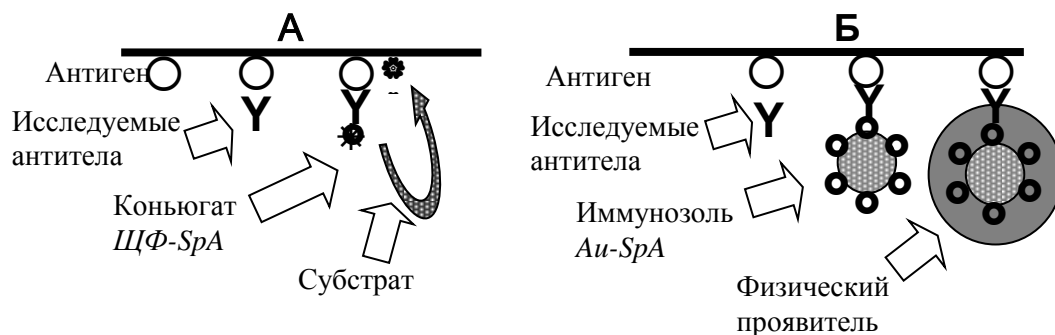
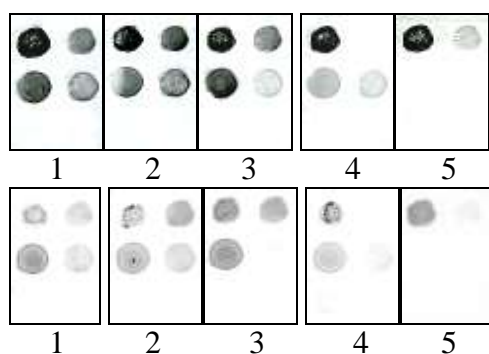


Рисунок 12 - Принципиальные схемы генерирования хромогенного сигнала в дот-иммуноанализе антител с использованием конъюгатов на основе (А) щелочной фосфатазы и (Б) коллоидного золота

Сравнительную оценку способов визуализации результатов анализа 5 образцов сыворотки крови человека проводили на матрицах с антигенами, распечатанными с помощью плоттера на синтетической бумаге Pentaprint. Параллельно выполняли ИФА на соответствующих тест-системах производства ЗАО «Вектор-Бест». Результаты сравнения представлены на рисунке 13.



Результаты ИФА, ОП <sub>450</sub>					
Образец	1	2	3	4	5
Краснуха	0,849	2,015	1,015	<i>0,103</i>	0,369
Корь	2,420	2,016	2,654	1,420	<i>0,095</i>
Паротит	1,824	2,020	0,645	1,422	<i>0,176</i>

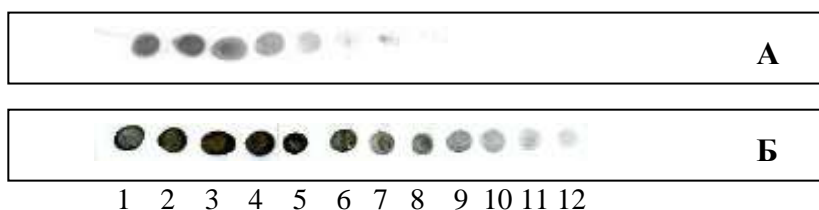
Рисунок 13 - Результаты сравнительного анализа 5 образцов сыворотки крови человека в дот-иммуноанализе с конъюгатами *SpA* с коллоидным золотом (верхний ряд) и щелочной фосфатазой (нижний ряд), а также в ИФА (таблица справа). Номера образцов приведены под матрицами и соответствуют образцам в таблице. Отрицательные значения ОП в таблице выделены курсивом. Схема нанесения антигенов на матрицу такая же, как на рисунке 8

Из рис. 13 видно, что система проявления со щелочной фосфатазой даёт существенно более низкие показатели ОП, чем система с коллоидным золотом и не позволяет выявлять антитела в образцах, содержащих их в низких концентрациях (см. рисунок 13, показатели паротита в образцах 3 и 4, показатели краснухи в образце 5). Конъюгаты на основе коллоидного золота обеспечивают чёткие

визуальные сигналы, идентичные показателям ИФА, а интенсивность окраски пятен на матрице изменяется пропорционально содержанию специфических антител в образце, что важно при количественной оценке результатов.

Для сравнительной оценки лимита определения иммуноглобулинов в дот-иммуноанализе на стрипы из синтетической бумаги аликвотами по 2 мкл наносили серии 2-кратных разведений IgG из сыворотки крови человека. Стрипы высушивали, блокировали казеином и выполняли дот-иммуноанализ с указанными выше конъюгатами. Результаты оценки приведены на рисунке 14.

На рисунке 15 наглядно показано, что конъюгат на основе коллоидного золота позволяет выявлять до 50 пг антител, нанесённых на подложку, что примерно в 30 раз превосходит чувствительность дот-иммуноанализа с применением конъюгата щелочной фосфатазы. Динамический диапазон изменения оптической плотности пятен при использовании конъюгатов коллоидного золота составляет около двух порядков – от 60 нг до 50 пг IgG. По приблизительным подсчётам стоимость использования конъюгата *SpA-ЩФ* и субстрата для его проявления в дот-иммуноанализе на 2 порядка превышает стоимость *SpA-Au* и метолового проявителя. Таким образом, система визуализации с золотым конъюгатом имеет существенные преимущества и выглядит наиболее перспективной для применения в мультиплексном дот-иммуноанализе.



№ разведения	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Концентрация IgG, мкг/мл	50000	25000	12500	6250	3125	1560	780	390	195	100	50	25
Содержание IgG в пятне, нг	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05

Рисунок 14 - Результаты сравнительного определения чувствительности дот-иммуноанализа с использованием конъюгатов белка A *Staphylococcus aureus* со щелочной фосфатазой (А) и коллоидным золотом (Б) в обычной постановке. На стрипы из синтетической бумаги Pentaprint PR-M480/09-07/8101-482D8 аликвотами по 2 мкл нанесены серии 2-кратных разведений IgG человека, начиная с концентрации 100 мкг/мл. Цифрами обозначены номера разведений, а соответствующие им концентрации IgG и их содержание в пятне приведены в таблице

Известно, что наибольшую чувствительность в дот-анализе обеспечивают конъюгаты на основе коллоидного золота с дисперсностью частиц около 20 нм [81, 85]. Кроме того, чувствительность и специфичность конъюгата определяются биоконпонентом, использованным для его нагрузки.

Золь золота получали восстановлением 100 мл 0,01 %-го раствора тетрахлорзолотой кислоты при добавлении 1,5 мл 1 %-го раствора цитрата натрия при 100 °С [156]. Результаты оценки дисперсности золя электронной микроскопией приведены на рисунке 15. Средний диаметр полученных частиц составляет 20 нм.

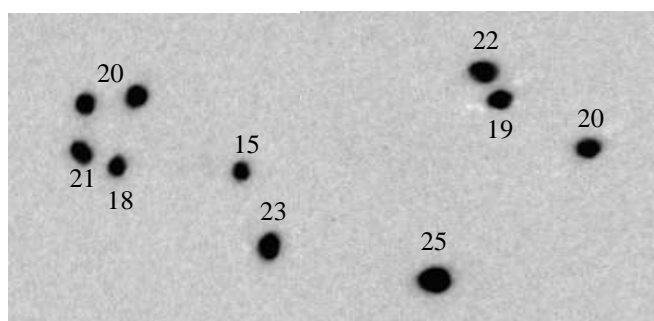


Рисунок 15 - Электронно-микроскопическая оценка дисперсности золя золота. Цифрами указаны размеры частиц в нм

Изучали влияние обычно применяемых для приготовления конъюгата вторичных иммунореагентов (антител против иммуноглобулинов человека, а также белков А и G *Staphylococcus aureus*) на чувствительность дот-иммуноанализа. Удельную дозу нагрузки (концентрацию иммунореагента, стабилизирующую полученный золь золота) определяли на основании коагуляционного теста [156]. Найденную дозу реагента вносили в золь, инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 1 ч при слабом перемешивании, а затем в тёмном месте в течение 5 ч в стационарном режиме. Далее проводили стабилизацию иммунозоля свежим 2 %-м раствором казеина, содержащим 10 % азида натрия (1 мл на 100 мл золя) и очистку 2-кратным центрифугированием в течение 30 мин при 14000 g. Осадок ресуспендировали в 0,02 М натрий фосфатном буферном растворе, pH 8,0, содержащим 0,02 % казеина и 0,1 % азида натрия. К золю добавляли глицерин до 40 % по объёму и хранили при 20 °С. Подробное описание процедуры приготовления конъюгата приведено в Приложении 1.

Рабочую концентрацию конъюгата готовили, используя раствор для разведения конъюгата (РБРК) состава: 0,01 М ФСБТ; pH 7,2; 0,05 % твин 20; 0,1 % азида натрия и определяли с помощью матриц с нанесёнными антителами человека как максимальное разведение конъюгата, обеспечивающее в дот-иммуноанализе

максимальную оптическую плотность точки с нанесёнными антителами. Характеристики полученных конъюгатов представлены в таблице 5.

Результаты оценки лимита определения IgG в дот-анализе с применением указанных конъюгатов проиллюстрированы на рисунке 16. Наиболее чувствительные результаты обеспечивают конъюгаты на основе белков А и G *Staphylococcus aureus* (см. рисунок 16, примеры В, Е и Ж). Они формируют контрастные оптические сигналы и позволяют выявлять в дот-иммуноанализе до 30 пг иммуноглобулинов, иммобилизованных на подложке из синтетической бумаги. При этом рекомбинантный аналог протеина А обеспечивает более высокую чувствительность, по сравнению с природным продуктом, что может быть связано с разницей в сроках изготовления препаратов, дату выпуска которых проконтролировать не представляется возможным. Эти конъюгаты наиболее выгодны и в экономическом плане, так как их стоимость значительно ниже других аналогов, однако применение этих конъюгатов сопровождается фоновыми сигналами.

Таблица 5 – Характеристики конъюгатов на основе коллоидного золота (20 нм), приготовленных с использованием вторичных иммунореагентов

Обозначение конъюгата	Иммунореагент, использованный при подготовке конъюгата (фирма-изготовитель, кат. №)	Концентрация стабилизирующая золь золота <sup>1</sup> , мкг/мл	Рыночная цена биокомпонента <sup>2</sup> , руб./мг	Конъюгат		
				Объем из 1 мг реагента, мл	Рабочее разведение	Стоимость на 1000 анализов, руб.
А	Антитела козы к иммуноглобулинам человека («ИмТек», GAIss)	30	3200	30	1:300	110
Б	Антитела козы к IgG-антителам человека («ИмТек», GAIgg)	60	2700	15	1:300	180
В	Белок G, аффинно очищенный («ИмТек», SPgg)	30	4300	30	1:400	107
Г	Моноклональные антитела мыши к IgG-антителам человека (Sigma, лот: I6135)	20	17600	50	1:500	211
Д	Антитела козы к IgG-антителам человека (Sigma, лот: I5260)	50	7900	20	1:200	592
Е	Белок А, рекомбинантный (Sigma, лот: P7837)	16	1650	60	1:1200	7
Ж	Белок А, нативный (Sigma, лот: P3838)	60	2400	15	1:800	60

Примечания: <sup>1</sup> Значения, полученные в коагуляционном тесте [Rashka].

<sup>2</sup> Цены 2013 г. на сайте компании.

Конъюгат на основе моноклональных антител к иммуноглобулинам человека значительно дороже и немного уступает в чувствительности, но формирует яркие пятна на чистом фоне (см. рисунок 16, пример Г).

Поликлональные антитела, поставляемые фирмой Sigma (США), обладают существенно более низкой активностью по сравнению с их моноклональным аналогом, и, хотя первые и обеспечивают сходную с моноклональными антителами чувствительность, они формируют менее интенсивные оптические сигналы (см. рисунок 16, пример Д). Кроме того, следствием низкой активности антител является необходимость использования конъюгата в сравнительно высокой концентрации (рабочее разведение 1:200) и высокой стоимости конечного продукта.

Конъюгаты на основе поликлональных антител, производимые фирмой «ИмТек» (Россия), обеспечивают худший лимит определения IgG (125 пг) среди всех использованных аналогов. Кроме того, антитела к суммарным иммуноглобулинам провоцируют фоновые сигналы на подложке (см. рисунок 16, пример А).

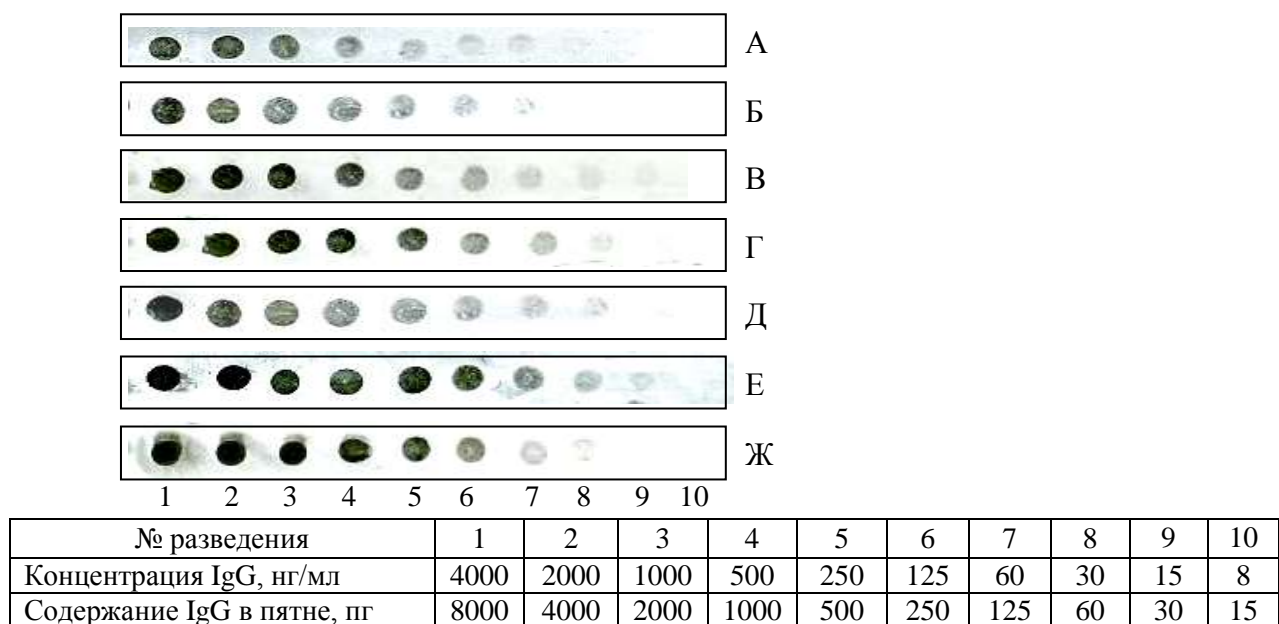


Рисунок 16 - Результаты сравнительного определения чувствительности дот-иммуноанализа с использованием конъюгатов коллоидного золота со вторичными иммунореагентами. Обозначения конъюгатов (А–Ж) соответствуют обозначениям в таблице 5. На стрипы из синтетической бумаги Pentaprint PR-M480/09-07/8101-482D8 аликвотами по 2 мкл нанесены серии 2-кратных разведений IgG человека, начиная с концентрации 4 мкг/мл. Цифрами обозначены номера разведений, а соответствующие им концентрации IgG и их содержание в пятне приведены в таблице. Процедура обработки стрипов и выполнения анализа описана в тексте

Полученные результаты носят ориентировочный характер, поскольку качество биологических препаратов может значительно варьировать в разных партиях реактива. Более того, такие препараты могут значительно изменять свои свойства в зависимости от сроков и условий их хранения, а контролировать дату изготовления и соблюдение холодовой цепи на стадиях хранения и транспортировки реактива в настоящее время не представляется возможным.

Из исследованных препаратов наиболее перспективными для использования в мультиплексном дот-иммуноанализе выглядят конъюгаты на основе стафилококковых протеинов А и G, а также моноклональных антител к иммуноглобулинам человека. Однако дальнейшие исследования показали, что рабочее разведение конъюгата на основе моноклональных антител значительно дольше (более года) сохраняет свои свойства в ячейках аналитических ванн. Этот препарат и взят за основу для использования в тест-системе.

Ранее отработана система визуализации золотых конъюгатов физическим проявлением в растворе, содержащем нитрат серебра и восстановитель в кислой среде [34]. В таком растворе происходит каталитическое восстановление серебра на поверхности частиц золота, вследствие чего выявляются места их локализации в виде пятен с тёмно-серой окраской. Лучшей проявляющей системой для визуализации результатов мультиплексного иммуноанализа нами признан раствор, содержащий 0,2 % метола, 0,5 % лимонной кислоты и 0,2 % нитрата серебра. Однако такой раствор стабилен только в течение 15–20 мин и должен быть приготовлен непосредственно перед применением. Для укомплектования автономного диагностического набора предложено использовать двухкомпонентный проявитель – таблетированную смесь метола и лимонной кислоты (сухой компонент) в соотношении 2:5 (в/в), а также 0,4 %-й раствор азотнокислого серебра (жидкий компонент). Таблетки сухой смеси (4 мг) в наборе помещаются в пустых ячейках 8-го ряда аналитической ванны. При выполнении анализа в ячейку с сухой смесью вносится 150 мкл бидистиллированной воды, а непосредственно перед проявлением - такой же объём 0,4 %-го раствора нитрата серебра. Время проявления 7–8 мин при комнатной температуре.

При проявлении серебро образует отложения разной плотности и может иметь разную окраску, что затрудняет учёт результатов. Чтобы устранить эту

проблему, в схему анализа введён дополнительный этап стабилизации окраски. На этом этапе проявленный иммуночип обрабатывается щелочным раствором тиомочевины, который переводит серебро в его сульфид, имеющий интенсивную и стойкую чёрную окраску.

### 3.2.2 Оптимизация условий выполнения дот-иммуноанализа

Мультиплексный дот-анализ антител включает несколько стадий, его принципиальная схема приведена на рисунке 17. На первом и втором этапах анализа оптимизации подлежали составы рабочих растворов, кратность рабочих разведений образца и конъюгата, режимы инкубации и отмывок.

Сравнивали два варианта базовых буферных растворов (фосфатного и трис-HCl), в которые при приготовлении растворов для разведения сывороток и конъюгата, а также растворов, используемых для отмывок, вводили одинаковые дополнительные компоненты. Оценка показала, что обе буферные системы могут быть использованы при проведении анализа, но фосфатный буферный раствор обеспечивал более заметную разницу между положительными и отрицательными образцами. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали 0,02 М фосфатный буферный раствор, pH 7,2–7,4.

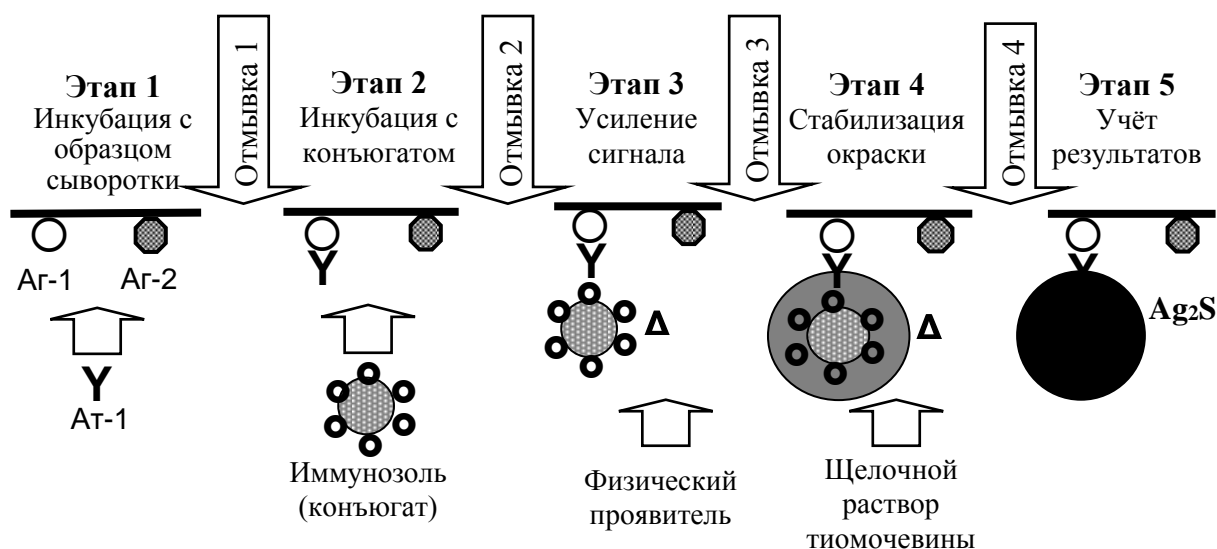


Рисунок 17 - Общая схема мультиплексного дот-иммуноанализа антител с применением иммунозоля золота, усилением сигнала физическим проявлением и стабилизацией окраски щелочным раствором тиомочевины

Образцы сывороток могут содержать низкоаффинные антитела, способные спровоцировать ложноположительные результаты анализа. Для снижения возможности появления таких результатов мы применяли щелочной (pH 9,5–9,8)

раствор для разведения сывороток (РБРС), в состав которого вводили 0,1 % детергента твин 20. Такой РБРС препятствовал связыванию низкоаффинных компонентов и на первом этапе служил своеобразным фильтром, обеспечивающим сортировку антител с низким и высоким аффинитетом. На втором этапе использовали РБРК – среду, призванную обеспечить максимальное связывание конъюгата с выделенными на матрице антителами. Известно, что наиболее эффективные иммунные взаимодействия происходят в физиологических условиях при нейтральных значениях pH 7,2–7,4. Для предотвращения неспецифических связываний с подложкой и блокирующим белком в состав РБРС вводили небольшие (0,05 % (в/о)) количества казеина. В качестве консерванта растворов использовали азид натрия. Составы рабочих растворов приведены в таблице 6, а процедуры приготовления растворов, используемых при производстве и применении мультиплексных тестов, приведены в Приложении 1.

Оптимальные концентрации иммунозоля золота подбирали опытным путём. Для этого несколько белковых матриц, проинкубированных в одинаковых условиях с образцом сыворотки, обрабатывали разными разведениями золя, приготовленными на РБР-К. За рабочее разведение принимали концентрацию иммунозоля, обеспечивающую наиболее высокие положительные сигналы при отсутствии визуально определяемых ложноположительных сигналов.

Таблица 6 – Составы растворов, используемых при проведении мультиплексного анализа

Компоненты		Содержание компонента		
Наименование	Производитель	РБРС	РБРК	Отмывочный раствор
ФСБ	Sigma, США	0,01 М	0,01 М	0,01 М
Твин 20	Sigma, США	0,1 % (о/о)	0,1 % (о/о)	0,1 % (о/о)
Казеин	Sigma, США	0,05 % (в/о)	0,05 % (в/о)	–
ПЭГ-20000	Serva, Германия	–	0,01 % (в/о)	–
Натрия азид	Sigma, США	0,1 % (в/о)	0,1 % (в/о)	0,1 % (в/о)
pH	–	9,5±0,2	7,2±0,2	7,2±0,2

С целью создания оперативного и автономного теста нами были предприняты попытки сокращения времени инкубации с образцами и конъюгатом и оценки возможности выполнения анализа в условиях комнатной температуры (20±3 °С). Для определения периода экспозиции с образцом матрицы инкубировали в одном образце сыворотки и удаляли по одной через

фиксированные промежутки времени, трижды отмывали погружением в отмывочный раствор, одновременно обрабатывали рабочим разведением иммунозоля, снова отмывали и проявляли в метоловом проявителе. При определении необходимого времени инкубации с иммунозолом все матрицы одновременно выдерживали в одной сыворотке, отмывали, помещали в золь, удаляли по одной через установленные промежутки времени, отмывали и одновременно проявляли. Для определения оптимального времени проявления матрицы одинаково обрабатывали сывороткой, конъюгатом и отмывочными растворами, затем одновременно помещали в проявитель и удаляли по одной через установленные промежутки времени. Результаты экспериментов по выбору условий инкубации и проявления приведены на рисунке 18.

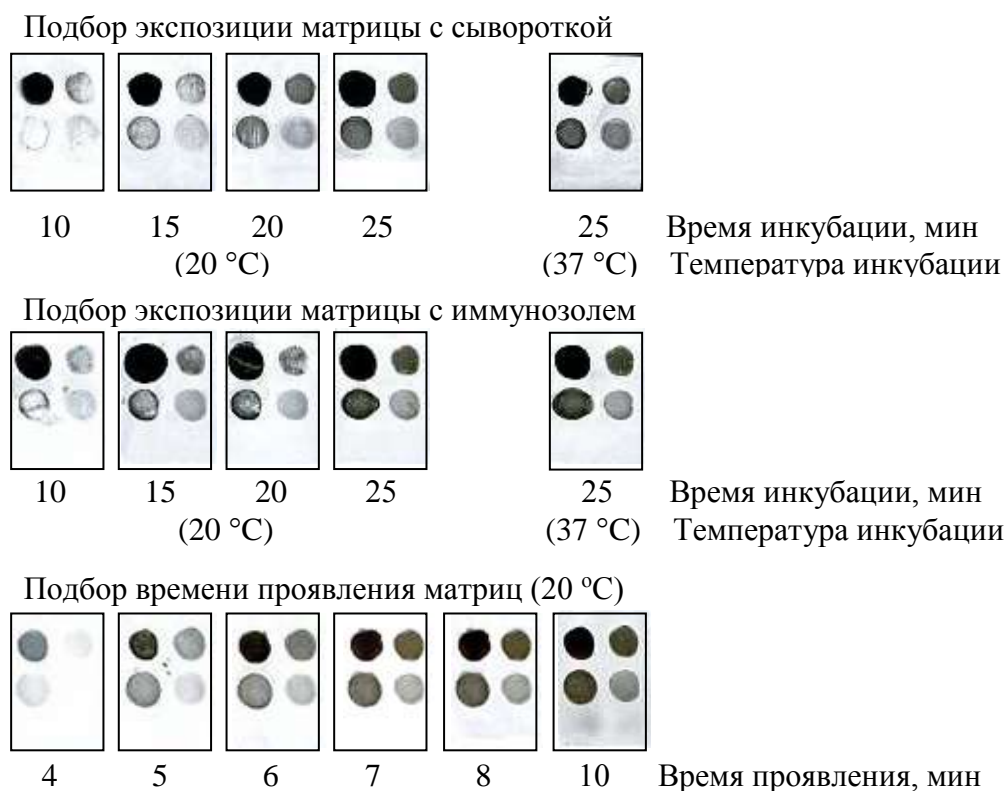


Рисунок 18 - Результаты экспериментов по подбору условий инкубации и проявления матриц при выполнении дот-иммуноанализа. Условия выполнения экспериментов описаны в тексте

Видно, что при инкубации менее 20 мин и в том, и в другом случае оптический сигнал выглядит существенно ослабленным, тогда как матрицы, инкубированные при 20 °C как с образцом, так и с золем в течение 25 мин, а также выдержанные с компонентами при 37 °C в течение 30 мин, не имеют заметных отличий. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при постановке анализа в условиях комнатной температуры, достаточно

25-минутного взаимодействия матрицы как с образцами, так и с конъюгатом. А оптимальное время проявления 8 мин.

Кратность и продолжительность отмывок должны быть подобраны так, чтобы максимально удалить не связавшиеся компоненты. Мы экспериментально установили, что в стационарном режиме (без активации раствора) для получения удовлетворительного результата достаточно 2-кратной отмывки после инкубации матрицы как с сывороткой, так и с конъюгатом. Время каждой такой процедуры – 1 мин, а минимальный объем отмывочного раствора – 0,5 мл.

Перед проявлением необходимо отмыть с матрицы дистиллированной водой остатки буферного раствора, который может реагировать с проявителем, переводя ионы серебра в нерастворимые соединения. Необходима промывка матрицы водой и после проявления, поскольку ионы серебра из остатков проявителя под воздействием стабилизатора образуют нерастворимый сульфид серебра, что повлечёт образование темной вуали на поверхности иммуночипа. Для промывки матрицы перед проявлением и стабилизацией сигналов достаточно погрузить её на 1 мин в дистиллированную воду. После стабилизации сигнала достаточно ополоснуть матрицу водой. Хронологическая схема выполнения анализа представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Хронологическая схема выполнения мультиплексного анализа антител

№ операции, п/п	Наименование этапа	Раствор	Время, мин	Кратность
1	Инкубация с образцом	Сыворотка 1/20 на РБРС	25	1
2	Отмывка 1	ФСБ-Т	1	2
3	Инкубация с конъюгатом	Рабочее разведение конъюгата на РБРК	25	1
4	Отмывка 2	ФСБТ	1	2
		Дистиллированная вода	1	1
5	Физическое проявление	Метоловый проявитель	7	1
6	Отмывка 3	Дистиллированная вода	1	1
7	Стабилизация сигнала	Раствор тиомочевины	1	1
8	Отмывка 4	Дистиллированная вода	1	1
	Всего		65	11

Таким образом, отработанная нами процедура мультиплексного анализа антител включает 11 последовательных операций и может быть выполнена при комнатной температуре в течение 70 мин (с учетом времени переноса иммуночипа по ячейкам).

### 3.3 Диагностический набор и основные приёмы его изготовления и применения

#### 3.3.1 Состав набора

Набор для комплексного выявления антител к возбудителям ДВВИ рассчитан на 20 мультиплексных анализов. Каждый набор включает: 4 блока белковых матриц, 4 аналитические ванны, флакон с жидким компонентом проявляющей системы, перфоратор для вскрытия ячеек аналитической ванны, цветовую шкалу для количественной оценки результатов и инструкцию по применению набора. Общий вид набора для комплексного выявления антител к возбудителям ДВВИ представлен на рисунке 19.



Рисунок 19 - Общий вид набора для мультиплексного анализа антител

#### 3.3.2 Белковые матрицы

Набор белковых матриц выполнен в виде плоского гребня с 5 зубцами, изготовленного из синтетической бумаги Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8 толщиной до 0,5 мм. Каждый зубец гребня представляет собой белковую матрицу с нанесёнными в определённом порядке антигенами и положительным контролем (см. рисунок 8). Отрицательным контролем служит свободный участок в нижней части матрицы. Порядок нанесения антигенов приводится в инструкции по применению. Матрицы могут использоваться как по одной (для индивидуальных анализов), так и в виде целого гребня (для массовых обследований).

**Изготовление подложек.** Изготовление подложек производили путём

механической вырубке блоков штанцевальной формой (4 блока по 5 матриц) при помощи типографского пресса.

**Очистка поверхности.** Очистку поверхности заготовок матриц производили путём механической обработки в тёплом (40 °С) 0,2 %-м растворе детергента 7X («Sigma», США) с применением губки, последующей отмывки заготовок в 2 сменах дистиллированной воды и сушки на воздухе.

**Хранение готовых подложек.** Высушенные листы с заготовками матриц одной партии хранили в шкафу пачками, упакованными в чистые полиэтиленовые пакеты. На каждую упаковку наносили маркировку с датой подготовки, способом и режимами резки, режимами отмывки и сушки.

**Нанесение иммунореагентов на подложку.** Нанесение антигенов на подложку вручную или с помощью планшетного плоттера не обеспечивает производительность, достаточную для промышленного изготовления наборов. Поэтому при участии сотрудников ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и ЗАО «ИмДи» специалистами ЗАО «ОлТех» (Новосибирск) разработано и изготовлено устройство «Диспенсер» для автоматического, производительного нанесения иммунореагентов на подложки матриц. Его общий вид приведён на рисунке 20.

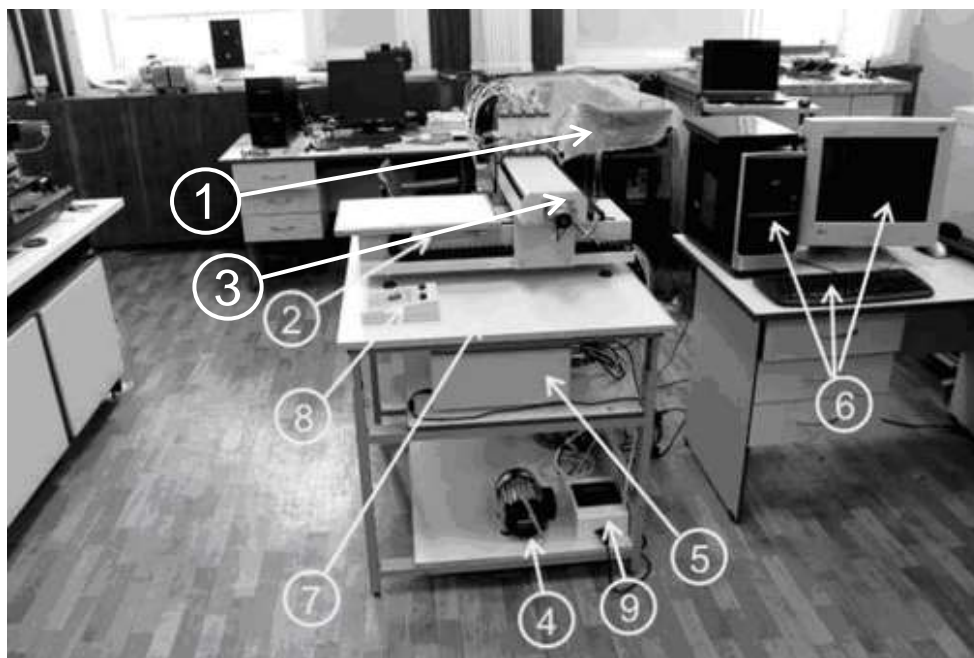


Рисунок 20 - Общий вид устройства «Диспенсер» для автоматического нанесения иммунореагентов на подложку матрицы. 1 – блок печати, 2 – операционный стол, 3 – емкости с растворами иммунореагентов, 4 – компрессор, 5 – электронный блок, 6 – блок управления и регулировки, 7 – рабочий стол, 8 – пульт оператора, 9 – ресивер

Нанесение антигенов в этом устройстве производили методом регулируемой капельной печати при помощи электромагнитных микрочлапанов-дозаторов. Одновременно может производиться печать до 11 иммунореагентов. Многоканальная система капельной печати позволяет формировать матрицы со скоростью 50 шт./мин. Матрицы для комплектования экспериментальных образцов набора распечатывали на производственной базе ЗАО «ИмДи» с применением устройства «Диспенсер».

**Сушка матриц.** Предварительную сушку подложек с нанесёнными реагентами осуществляли в горизонтальном положении при 4 °С в холодильнике в течение 12 ч. Окончательную сушку проводили при температуре 40 °С в термостате в течение 2 ч.

**Блокирование матриц.** Блокирование матриц выполняли в ходе её инкубации в 0,2 %-м растворе казеина, приготовленном на 0,01 М фосфатном буферном растворе, pH 7,2–7,4. После блокирования матрицы её рабочей частью погружали в раствор стабилизатора на 1–2 мин. Сушку проводили в вертикальном положении под потоком теплого (40–50 °С) воздуха.

**Упаковка матриц.** Высушенные матрицы герметично запаивали в чистые полиэтиленовые пакеты с использованием вакуумного упаковщика. Хранили при 4 °С до использования.

### **3.3.3 Аналитические ванны**

**Конструкция аналитической ванны.** Аналитическая ванна предназначена для последовательных инкубаций белковых матриц в рабочих растворах. Она изготовлена литьём под давлением из непрозрачного полипропилена и рассчитана на выполнение 5 анализов. В предыдущий период было опробовано несколько конструкций ванны. Последний, усовершенствованный вариант, чертёж которого представлен на рисунке 21, запатентован (Патент РФ № 2517035).

Этот вариант имеет следующие отличия от предыдущих версий:

- ячейки ванны в сечении выполнены в виде вытянутого асимметричного шестиугольника, продольные углы которого служат направляющими при введении в ячейку иммуночипа и препятствуют контакту их поверхностей;

- по верхнему краю ванны выполнен буртик, окантовывающий каждую ячейку, который повышает надёжность герметизации ячеек и препятствует деформации ячеек при термической запайке;

- количество рядов ячеек увеличено до 11, что позволяет реализовывать различные схемы анализа.

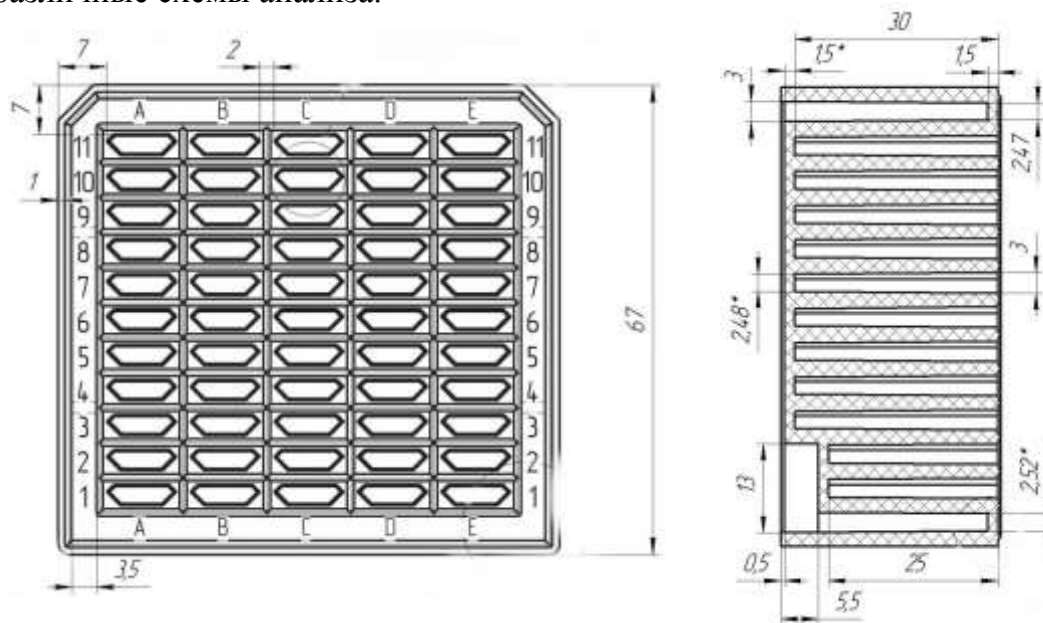


Рисунок 21 - Чертёж аналитической ванны

Ванна имеет 5 модулей с 11 ячейками, которые заполняются компонентами:

- 1-й ряд – раствор для разведения анализируемой сыворотки - РБРС (0,25 мл),
- 2-, 3-, 5- и 6-й ряды – отмывочный раствор - ФСБТ (0,35-0,50 мл),
- 4-й ряд – рабочее разведение конъюгата на РБРК (0,30 мл),
- 7-, 9- и 11-й ряды – дважды дистиллированная вода (ДДВ) (0,50 мл),
- 8-й ряд – таблетка сухого компонента физического проявителя,
- 10-й ряд – щелочной раствор тиомочевины – стабилизатор (0,30 мл).

Состав и процедура приготовления растворов приведена в Приложении 1.

**Заполнение ванны растворами.** Ручное заполнение ячеек ванны растворами чрезвычайно трудоёмко и связано с высокой вероятностью ошибок и погрешностей. В связи с этим специалистами ЗАО «ОлТех» (г. Новосибирск) при участии сотрудников ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и ЗАО «ИмДи» разработано и изготовлено устройство «Ранар» для автоматического, производительного заполнения ячеек аналитической ванны. Устройство выполняет автоматическую подачу и позиционирование аналитических ванн, одновременное заполнение ячеек

ванны растворами и выгрузку аналитических ванн в специальный лоток для последующей герметизации. Устройство изготовлено для ЗАО «ИмДи». Общий вид устройства «Ранар» представлен на рисунке 22.

Устройство работает циклами, за каждый цикл заполняется 5 ванн. Незаполненные аналитические ванны устанавливаются в ячейки на пластине - держателе (платформа аналитической ванны) и после команды «Старт» перемещаются в блок розлива.



Рисунок 22 - Устройство для автоматического заполнения аналитических ванн «Ранар»

Растворы поступают из герметичных ёмкостей R1...R5, находящихся под избыточным давлением, и разливаются с помощью регулируемых клапанов-дозаторов через опускающиеся дозирующие сопла блока розлива. В блоке розлива одновременно заполняются 11 ячеек модуля, после чего блок розлива перемещается к следующему модулю. Объём раствора в каждой ячейке зависит от времени открытого состояния клапана (дозатора). Дозаторы открываются набором ключей, управляемых блоком электроники. После заполнения всех 5 стрипов аналитические ванны последовательно выталкиваются в лоток для заполненных ванн. После выталкивания последней (пятой) аналитической ванны, пластина-

держатель с пустыми ячейками возвращается в исходное положение и устройство готово к новому циклу розлива.

Настройку устройства, а также оценку точности и воспроизводимости дозирования растворов проводили на производственной базе ЗАО «ИмДи». Результаты оценки погрешности при дозировании дистиллированной воды в зависимости от времени открытия клапанов приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты оценки объёмов и погрешностей при дозировании дистиллированной воды в зависимости от времени открытия клапанов-дозаторов

Время открытия клапана (с)	Объёмы дозирования (мкл)					Среднее значение	Отклонение			
	Фактические объёмы, полученные при использовании разных клапанов						Среднее		Максимальное	
							мкл	%	мкл	%
0,74	226	217	220	223	224	222	2,8	1,2	5,0	2,2
1,0	301	300	318	300	306	305	4,1	1,3	14,0	4,6
1,0	306	300	319	300	292					
1,0	300	300	300	302	302					
1,0	301	293	319	308	304					
1,0	306	304	307	317	315					
1,2	355	363	348	363	362	365	6,7	1,8	17,0	4,6
1,2	363	372	371	372	376					
1,5	458	457	463	461	459	462	3,2	0,7	11,0	2,4
1,5	461	462	460	466	473					
1,74	540	535	539	537	538	536	5,6	1,0	9,0	1,7
1,74	527	533	534	535	538					
1,8	538	562	552	556	552	552	5,6	1,0	14,0	2,5
2,0	600	598	600	600	602	600	0,8	0,1	2,0	0,3

В таблице обобщены данные, полученные при использовании разных клапанов. Из таблицы 8 видно, что эти данные в ряде случаев заметно отличаются от среднего показателя, однако даже максимальные отклонения не превышают 5 %, что удовлетворяет требованиям, предъявляемые к устройству. Тем не менее, в дальнейшей работе мы старались задействовать для заполнения конкретных ячеек те клапаны, которые давали меньшую погрешность в дозировании необходимого объёма.

В таблице 9 приведены результаты подбора времени открытия клапанов для достижения необходимых объёмов заполнения ячеек дистиллированной водой и оценки погрешности дозирования при переходе к рабочим растворам.

Таблица 9 – Результаты подбора времени открытия клапанов для достижения необходимых объёмов заполнения ячеек дистиллированной водой и оценки погрешности дозирования при переходе к рабочим растворам

№ ячейки	Открытие клапана			Требуемый минимальный объём заполнения, мкл	Средний фактический объём заполнения			
	№	Время, с	Время, относит. ед.		Раствор	Объём, мкл	Раствор	Объём, мкл
1	11	0,76	38	240	ДДВ	245	РБРС	195
2	6	1,2	60	350	ДДВ	360	ФСБТ	280
3	7	1,4	70	450	ДДВ	460	ФСБТ	365
4	8	1,0	50	300	ДДВ	305	РБРК	245
5	9	1,4	70	450	ДДВ	455	ФСБТ	380
6	10	1,4	70	450	ДДВ	455	ФСБТ	375
7	1	1,6	80	500	ДДВ	495	ДДВ	420
8	3	0,3	20	100	ДДВ	105	ДДВ	95
9	4	1,6	80	500	ДДВ	505	ДДВ	400
10	2	1,0	50	300	ДДВ	300	Стабилизатор	290
11	5	1,6	86	500	ДДВ	505	ДДВ	460

Примечание: ДДВ – дважды дистиллированная вода

В таблице 10 приведены результаты коррекции настройки клапанов-дозаторов, полученные в условиях кондиционирования (25 °С) воздуха в рабочем помещении.

Таблица 10 – Результаты коррекции времени открытия клапанов и фактические объёмы заполнения ячеек при 25 °С

№ ячейки	Компонент	Открытие клапана			Требуемый минимальный объём, мкл	Средний фактический объём, мкл
		№	Время, относит. ед.	Время, с		
1	РБРС	11	60	1,1	300	300
2	ФСБТ	6	77	1,4	400	390
3	ФСБТ	7	94	1,7	450	460
4	РБРК	8	65	1,16	350	365
5	ФСБТ	9	95	1,76	450	465
6	ФСБТ	10	100	1,98	450	465
7	ДДВ	1	85	1,5	500	530
8	ДДВ	3	100	0,33	100	105
9	ДДВ	4	95	1,7	500	540
10	Стабилизатор	2	80	1,6	350	360
11	ДДВ	5	115	2,1	500	520

Примечание: ДДВ – дважды дистиллированная вода

Из таблицы 9 видно, что отличия в составе, а, следовательно, и в физико-химических свойствах растворов вносят существенные погрешности в дозирование. Установлено, что значительное влияние на погрешность розлива рабочих растворов оказывают изменения температуры окружающей среды. Это согласуется с обсуждавшимися ранее данными Tisone T. [176] о влиянии состава и температуры растворов на точность дозирования.

Описанное устройство для автоматического заполнения ячеек аналитических ванн растворами обеспечивает точность дозирования с погрешностью, не превышающей 5 %, и производительность заполнения до 60 ванн в час с количеством ячеек 5×11. Точность дозирования устройством зависит от физико-химических свойств растворов и температуры окружающей среды.

### **3.3.4 Герметизация аналитических ванн**

По окончании розлива аналитическая ванна должна быть запаена герметизирующей плёнкой исключающей перетекание растворов между ячейками. Для герметизации использовали многофункциональный термопресс китайского производства с пластичным накаливающимся элементом. При изыскании герметизирующего материала установлено, что использование фольги с термолаком вызывает помутнение и изменение свойств ряда растворов, по-видимому, из-за химической реакции лака с компонентами растворов. Фольга со слоем пропилена оказалась инертной в этом отношении, но при перфорировании запаенных такой фольгой ванн сложно добиться полного открытия ячеек и, как следствие, иммуночип получает повреждения рабочей поверхности в процессе переноса его из ячейки в ячейку. Наиболее пригодным для термической запайки ванн признан материал «Coflex».

«Coflex» – комбинированный упаковочный материал на основе алюминиевой фольги, предназначенный для укупоривания полимерной тары, содержащей продукты с агрессивными свойствами. Представляет собой комбинацию из мягкой алюминиевой фольги с внешней стороны покрытой праймером под печать, а с внутренней стороны соединенный с трёхслойной плёнкой на основе полиолефинов. «Coflex» обеспечивает надежную герметизацию ванн при температуре 170–220 °С. Готовая ванна маркируется с указанием

наименования теста, а также обозначения буквами модулей и цифрами рядов однотипных ячеек. Устройство материала «Coflex» показано на рисунке 23.

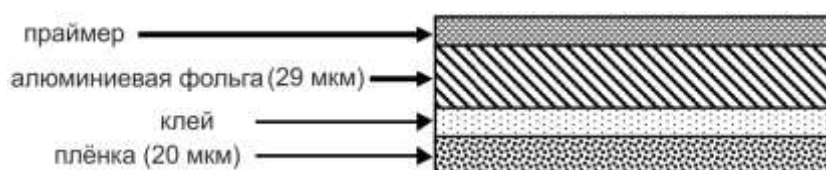


Рисунок 23 - Состав и устройство материала «Coflex»

### 3.3.5 Способ применения набора

При выполнении анализа ячейки вскрывают перфоратором, в 1-й ряд ячеек вносят исследуемые образцы препаратов крови и погружают в них иммуночипы. Затем иммуночипы вынимают и через определённые интервалы времени последовательно переносят по следующим рядам ячеек, после выемки из последнего ряда визуально учитывают результат по наличию или отсутствию тёмных пятен в местах нанесения на иммуночип иммунореагентов. Для одиночных анализов вскрывают и используют отдельные модули. При необходимости количественной оценки результатов анализа используют цветовую шкалу. Инструкция по применению набора приведена в Приложении 2.

### 3.4 Испытания экспериментальных образцов мультиплексного теста

Согласно приведенному выше описанию технологического процесса изготовлены экспериментальные образцы набора для комплексного выявления антител к вирусам краснухи, кори и паротита. Эту работу выполняли на производственной базе ЗАО «ИмДи» с использованием автоматических устройств для изготовления белковых матриц и заполнения аналитических ванн.

Сравнение эффективности выявления антител класса G к вирусам краснухи, кори и паротита с применением моноспецифических наборов для ИФА и многопрофильного дот-иммуноанализа проводили на рабочей панели сывороток, предоставленной ЗАО «ИмДи», а оценку лимита определения – на серии калибровочных образцов из соответствующих ИФА-тест-систем «Вектор-Бест». Результаты дот-иммуноанализа сначала учитывали визуально, а затем изображение иммуночипов оцифровывали с использованием планшетного сканера и анализировали с применением специально разработанной компьютерной программы (см. раздел Методы). Результаты сравнительного исследования приведены в таблице 11, а в обобщённом виде – в таблице 12.

Таблица 11 – Результаты определения антител класса G к вирусам кори, паротита и краснухи в образцах панели сывороток с применением моноспецифических наборов для ИФА и мультиплексного дот-иммуноанализа

№ обр.	КОРЬ				ПАРОТИТ				КРАСНУХА				
	ИмДи-спектр	МБС	Вектор-Бест	Имму-ночип	ИмДи-спектр	МБС	Вектор-Бест	Имму-ночип	ИмДи-спектр	МБС	Вектор-Бест	Имму-ночип	
1	0,088	0,065	0,078	6,0	0,073	0,142	0,086	3,3	>2	0,669	>2	67,0	
2	0,087	0,082	0,120	25,0	0,081	0,148	0,194	2,6	>2	1,214	>2	83,0	
3	0,112	0,262	0,237	16,0	0,079	0,167	0,123	11,0	>2	0,753	>2	57,0	
4	0,096	0,099	0,279	8,8	0,095	0,186	0,083	1,2	0,263	0,218	0,489	16,0	
5	0,087	0,079	0,128	7,2	0,073	0,172	0,112	5,5	>2	1,105	>2	49,0	
6	0,977	1,808	>2	68,0	1,539	1,268	1,564	85,0	1,839	0,830	>2	65,0	
7	0,114	0,083	0,096	8,8	1,364	1,141	0,987	55,0	>2	0,566	1,945	45,0	
8	1,253	1,235	1,464	50,0	0,761	0,649	0,738	37,0	1,632	0,412	1,929	36,0	
9	1,620	1,665	>2	58,0	0,626	1,180	0,913	51,0	1,444	0,355	0,999	22,0	
10	0,218	0,311	0,529	16,0	1,369	1,706	1,720	75,0	>2	0,854	>2	55,0	
11	0,084	0,173	0,086	1,3	0,108	0,165	0,072	1,0	0,246	0,168	1,539	21,0	
12	0,085	0,176	0,129	3,6	0,083	0,145	0,070	4,1	>2	0,832	>2	81,0	
13	0,091	0,071	0,113	1,0	0,140	0,348	0,483	18,0	0,533	0,103	0,797	30,0	
14	0,086	0,071	0,119	6,9	0,110	0,168	0,172	13,0	0,643	0,173	1,274	35,0	
15	0,085	0,075	0,095	4,6	0,116	0,143	0,139	3,2	>2	0,667	>2	74,0	
16	1,909	1,733	1,868	66,0	0,276	0,394	0,441	16,0	>2	1,365	>2	82,0	
17	0,414	1,246	1,673	49,0	0,106	0,257	0,182	11,0	0,093	0,046	0,089	2,4	
18	0,475	1,224	1,024	46,0	0,111	0,164	0,121	9,3	0,249	0,070	0,427	8,2	
19	0,095	0,403	0,542	12,0	0,126	0,176	0,149	5,0	0,982	0,268	0,893	21,0	
20	0,812	1,591	1,648	59,0	0,408	0,415	0,661	21,0	1,602	0,488	>2	39,0	
21	0,575	1,503	>2	24,0	0,224	0,372	0,407	8,1	0,843	0,234	0,642	20,0	
22	0,540	0,451	0,832	22,0	0,111	0,284	0,258	3,7	1,222	0,424	1,266	45,0	
23	0,137	0,317	0,668	34,0	0,113	0,325	0,304	7,8	>2	0,920	>2	87,0	
24	0,181	0,762	1,112	29,0	0,359	1,308	0,753	19,0	1,484	0,690	1,911	46,0	
25	0,715	1,576	>2	60,0	0,634	>2	0,698	29,0	1,519	0,729	1,646	49,0	
26	0,102	0,191	0,446	7,8	0,130	0,173	0,312	5,7	>2	0,985	>2	61,0	
27	0,580	1,277	1,999	40,0	0,148	0,611	0,333	14,0	0,446	0,219	0,758	24,0	
28	0,661	1,133	1,650	28,0	0,162	0,355	0,291	4,5	0,462	0,191	1,026	34,0	
29	1,442	1,822	>2	47,0	0,160	0,444	0,401	8,1	0,074	0,040	0,079	1,9	
30	0,100	0,078	0,230	1,4	0,111	0,187	0,104	0,7	0,072	0,036	0,079	0,4	
31	0,276	0,151	0,512	11,0	0,151	0,303	0,369	9,8	0,064	0,041	0,092	0,3	
32	0,323	0,467	0,423	13,0	0,742	1,475	0,804	20,0	0,069	0,040	0,082	1,7	
33	0,111	0,131	0,357	4,6	0,164	0,209	0,366	4,3	0,099	0,037	0,112	1,0	
34	0,269	0,537	0,999	22,0	0,329	1,042	0,582	22,0	0,080	0,042	0,118	0,2	
35	0,129	0,139	0,492	4,5	0,230	0,907	0,426	11,4	0,128	0,057	0,081	0,9	
36	0,207	0,386	0,121	4,0	0,247	0,499	0,348	1,6	0,215	0,041	0,078	0,5	
37	0,569	0,828	1,469	27,0	0,092	0,218	0,080	3,0	>2	1,645	>2	54,0	
38	0,474	0,878	0,957	25,0	0,101	0,212	0,085	9,0	1,125	0,836	0,639	29,0	
39	>2	>2	>2	62,0	0,070	0,112	0,074	4,0	>2	>2	>2	70,0	
40	1,671	1,826	1,678	39,0	0,068	0,113	0,077	7,0	0,657	0,438	0,535	26,0	
41	0,673	0,997	0,829	30,0	0,556	0,685	0,414	44,0	>2	>2	>2	69,0	
42	1,157	0,865	1,936	39,0	0,332	0,429	0,256	26,0	>2	>2	>2	63,0	
43	0,633	0,752	1,347	34,0	0,338	0,514	0,499	26,0	1,959	>2	>2	89,0	
44	0,315	0,412	0,646	24,0	0,274	0,385	0,422	20,0	0,076	0,123	0,159	2,4	
45	0,666	0,964	0,809	28,0	0,432	0,574	0,471	26,0	>2	>2	>2	62,0	
ОП крит	0,294	0,268	0,318	10,0	0,270	0,351	0,416	15,0	0,270	0,245	0,493	15,0	
Калибровочные образцы из соответствующих тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест»													
Антитела к вирусу кори, МЕ	МЕ		БЕСТ		Чип		Антитела к вирусу краснухи, МЕ	МЕ		БЕСТ		Чип	
	5		>2		98,3			800		>2		72,0	
	2		1,317		97,0			200		>2		63,0	
	1,5-1.7		1,280		98,0			50		1,595		54,0	
	1		0,906		57,0			25-55		1,176		26,0	
	0,5		0,600		20,0			10		0,493		20,0	
	0,15		0,218		5,6			5		н.о.		19,0	
	0		0,098		0,8			0		0,072		0,2	

Примечания к таблице 11: В таблице приведены оптические сигналы (ОП<sub>450</sub>), полученные при анализе образцов с использованием моноспецифических наборов ООО «ИмДи-спектр», ЗАО «МБС» и ЗАО «Вектор-Бест», а также оптические сигналы (в относительных единицах доли положительного контроля), зарегистрированные с применением иммуночипов. Более тёмным фоном ячеек выделены образцы, положительные по результатам теста. Жирным шрифтом выделены образцы с протективными титрами антител. МЕ – международные единицы. Н.о. – анализ не проводили.

Таблица 12 - Обобщённые данные, полученные при определении антител класса G к вирусам кори, паротита и краснухи в образцах панели сывороток с применением моноспецифических наборов для ИФА и мультиплексного дот-иммуноанализа

Тест-система	Вектор-Бест		МБС		ИмДи		Иммуночип	
Результат	+	--	+	--	+	--	+	--
Корь	32	13	29	16	23	22	31 (5)	14 (0)
Паротит	16	29	24	21	16	29	17 (3)	28 (5)
Краснуха	33	12	27	18	32	13	34 (0)	11 (1)

Примечания: В последних столбцах в скобках указано число образцов, дифференцированных с помощью программы учёта (визуальная оценка этих образцов затруднена),  
+ - положительные образцы,  
-- - отрицательные образцы

Из таблицы 11 видно, что использованные наборы по-разному классифицируют на положительные и отрицательные некоторые образцы панели. В основном это относится к сывороткам с низким содержанием определяемых антител. На иммуночипах образцы с оптическим сигналом ниже 10 % не различимы невооружённым глазом и однозначно трактуются как отрицательные результаты, а образцы с ОП > 20 % видны как отчётливое пятно и отнесение их к положительным пробам также не вызывает сомнения. Таким образом, основные разночтения результатов при визуальной оценке образцов могут быть только в диапазоне с ОП от 10 до 20 %. Обычно таких образцов немного. Из 135 показателей, полученных в нашей системе на панели из 45 сывороток, такими сигналами обладают 14, из которых 8 определены как положительные (см. таблицу 12). Тем не менее, они могут существенно повлиять на оценку эксплуатационных характеристик тест-системы. Мультиплексный тест с инструментальным учётом результатов адекватно определяет исследуемые образцы и в этом отношении выглядит не хуже, чем тесты сравнения. Данные корреляционного анализа оптических сигналов из таблицы 11 приведены в таблице 13.

Таблица 13 – Коэффициенты корреляции данных таблицы 11, полученных с использованием разных наборов для определения антител класса G к вирусам кори, паротита и краснухи

Заболевание	Набор	ИмДи-спектр	МБС	Вектор-Бест	Иммуночип
Корь	ИмДи		0,870	0,814	0,808
	МБС	0,870		0,926	0,904
	Вектор Бест	0,814	0,926		0,877
Паротит	ИмДи		0,818	0,924	0,935
	МБС	0,818		0,828	0,722
	Вектор Бест	0,924	0,828		0,902
Краснуха	ИмДи		0,801	0,940	0,916
	МБС	0,801		0,799	0,814
	Вектор Бест	0,940	0,799		0,913

Корреляция результатов, полученных с применением иммуночипов, и данных, зарегистрированных тремя наборами для ИФА, сопоставима по своему значению с корреляцией данных между этими ИФА-наборами. При этом лучшее совпадение значений оптической плотности дот-иммуноанализа антител к паротиту и краснухе наблюдается с результатами, полученными на наборах ООО «ИмДи-спектр», изготовленных с применением таких же антигенов.

Сравнительный анализ 230 образцов донорской плазмы, выполненный с применением наборов для ИФА производства ООО «ИмДи-спектр» и нашего мультиплексного набора, показал совпадение результатов по кори в 96,3 % случаев, по краснухе – в 97,2 % случаев и по паротиту в 95,7 % случаев.

Задачей оценки поствакцинального гуморального иммунитета является не только констатация наличия или отсутствия антител к инфекционному агенту, но и определение их уровня, достаточного для защиты от заболевания. Доступные в литературе данные относительно минимальных протективных уровней антител неоднозначны. Для краснухи этот уровень варьирует от 10 до 25 МЕ/мл [63, 123, 124, 134, 171], для кори – от 0,15 [124] до 0,5 МЕ/мл [68]. Вероятно, такая неоднозначность связана с различиями подходов авторов к комплексной оценке гуморальных и клеточных факторов иммунитета. Ряд ИФА-наборов для количественного определения антител к вирусам краснухи и кори содержит калибровочные образцы с определённым содержанием специфических антител. Такие образцы из наборов ЗАО «Вектор-Бест» мы использовали для калибровки мультиплексного теста. Результаты приведены в нижней части таблицы 11, а вид иммуночипов после калибровки показан на рисунке 24. Образцы с содержанием

антител к вирусам кори и краснухи, превышающим протективные уровни (0,5 МЕ/мл для кори и 10 МЕ/мл для краснухи), выделены в таблице 11 жирным шрифтом.



Рисунок 24 – Результаты анализа калибровочных образцов с разным содержанием антител к вирусам краснухи и кори. Слева приведена схема размещения антигенов на матрице

Из таблицы 11 видно, что результаты по определению защитных уровней антител с помощью набора ЗАО «Вектор-Бест» и набора для мультиплексного дот-иммуноанализа, совпадают, за исключением образца № 2, определённого с помощью нашего теста как сыворотка с протективным уровнем антител к вирусу кори, но как отрицательного по этому показателю в других использованных тест-системах. На иммуночипах оптические сигналы от сывороток, показавших протективные уровни антител, выглядят как отчётливо различимые невооружённым глазом тёмные пятна в местах нанесения соответствующих антигенов (см. рисунок 24). Таким образом, учёт результатов анализа таких образцов может легко и надёжно осуществляться визуально.

В отношении эпидемического паротита достоверных сведений о защитных уровнях антител в литературе нам найти не удалось. В такой ситуации при оценке наличия защитного иммунитета, вероятно, следует ориентироваться просто на наличие специфических антител без количественного учёта их содержания. Такие образцы, положительные по антителам к вирусу паротита, в таблице 11 также выделены жирным шрифтом.

Для проверки воспроизводимости результатов мультиплексного анализа матрицы распечатывали на нескольких заготовках подложек из синтетической бумаги (по 20 матриц). После блокирования и стабилизации заготовок матриц из разных мест каждой заготовки вырезали по 5 матриц и параллельно в одинаковых

условиях проводили на них анализ одного и того же образца сыворотки. Результаты учитывались визуально. Отмечены незначительные различия в интенсивности визуальных сигналов на отдельных стрипах, связанные с небольшими отклонениями во времени проявления и не сказывающиеся на учёте результатов анализа. Все использованные матрицы идентично выявляли спектр антител образца, что подтверждало удовлетворительную воспроизводимость при их серийном изготовлении.

Для проверки стабильности белковые матрицы, упакованные в полиэтиленовые пакеты, хранили при температуре 4 °С и 20 °С. Ежемесячно исследовали их работоспособность и чувствительность при выполнении анализа. Полученные данные показали, что белковые матрицы адекватно выявляют весь спектр контролируемых антител и не теряют чувствительности как минимум в течение 12 месяцев (срок наблюдения).

При оценке стабильности растворов в герметизированной аналитической ванне установлено, что наиболее критичным компонентом является рабочее разведение конъюгата. Сравнительное исследование конъюгатов на основе протеинов А и G *Staphylococcus aureus*, а также поли- и моноклональных антител к иммуноглобулинам человека показало, что только коллоидное золото, связанное с моноклональными антителами, сохраняет свои свойства более года при 4 °С. Другие конъюгаты в этих условиях обеспечивают хранение набора от 6 до 9 месяцев.

Контроль экспериментальных образцов набора в ОБТК ООО «ИмДи-спектр» на панелях сывороток показал 100%-ю чувствительность и специфичность анализа по всем 3 инфекциям, однако, поскольку испытанная серия образцов набора была изготовлена с использованием конъюгата на основе протеина А *Staphylococcus aureus*, наборы показали недостаточную стабильность в тесте термодеградациии при 37 °С (см. Приложение 4). В последующих сериях экспериментальных образцов набора мы использовали конъюгаты коллоидного золота с моноклональными антителами против IgG человека, что позволило продлить срок годности наборов до 1 года.

При апробации набора в ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия получено положительное заключение. Отзыв об апробации

приведен в Приложении 3.

Приведённые выше данные свидетельствуют о возможности эффективного использования мультиплексного набора для комплексной оценки поствакцинального иммунитета. При этом многопрофильный тест может значительно облегчить осуществление серомониторинга.

Предлагаемый набор имеет следующие преимущества:

- позволяет одновременно выявлять спектр антител к 3 возбудителям инфекций и значительно сократить время на обследование пациента;
- обладает чувствительностью и специфичностью, не уступающей чувствительности серийно выпускающихся планшетных моноспецифических иммунопероксидазных тестов;
- позволяет проводить оценку защитных уровней антител;
- содержит полный комплект компонентов для выполнения анализа;
- имеет встроенные положительный и отрицательный контроли;
- обеспечивает как визуальный, так и инструментальный учёт результатов;
- прост в использовании и не требует особой квалификации оператора;
- автономен и не нуждается в энергообеспечении и дополнительном оборудовании.

По предварительным подсчётам себестоимость одного анализа в мультиплексной системе в 1,5–2 раза превышает стоимость анализа в моноспецифическом ИФА.

Однако перед наборами для ИФА многопрофильный тест имеет более существенные экономические выгоды. Основную часть цены выполнения анализа в клинической лаборатории составляют расходы на забор и подготовку образца, зарплату сотрудников, амортизацию оборудования, расходные материалы и накладные расходы. При выполнении нескольких анализов эта цена фактически увеличивается кратно их числу. Если принять расходы лаборатории на выполнение многопрофильного теста такими же, как для ИФА, то один анализ на белковой матрице с 3 антигенами обойдётся пациенту примерно в 2,5–3 раза дешевле.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящей работы являлось создание мультиплексного диагностического набора для одновременного выявления в препаратах крови антител к возбудителям детских управляемых инфекций (вирусам краснухи, кори и паротита) методом дот-иммуноанализа с целью комплексной оценки гуморального поствакцинального иммунитета.

Наиболее простым для изготовления и внедрения в медицинскую практику представляется мультиплексный тест, выполняемый на белковых матрицах с низкой плотностью нанесения реагентов захвата. В качестве реагентов захвата целесообразно использовать антигены, совместимые на одной подложке, а в качестве системы детекции – конъюгаты на основе коллоидного золота и усиление оптического сигнала путём физического проявления.

Выполнены эксперименты по оценке целевых свойств 10 доступных на российском рынке образцов белой, матовой синтетической бумаги на основе полипропилена и ПВХ для изготовления подложки белковых матриц. Исследована структура поверхности (с использованием световой, сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии), эффективность адсорбции антигенов, а также совместимость материала с компонентами системы иммунологического анализа и фоновые явления в процессе его выполнения. Установлено, что материалы значительно различаются по структуре поверхности, сорбционным свойствам и способности провоцировать фоновые сигналы. Фоновые оптические сигналы более заметно проявляются на поверхностях с грубой структурой и, вероятно, связаны с механической задержкой наночастиц золота из конъюгата в неровностях рельефа. Выявлена зависимость эффективности адсорбции белков от равномерности структуры поверхности и органической основы синтетической бумаги, а также от содержания в ней диоксида титана и обработки материала коронным разрядом. Из исследованных материалов наиболее пригодной для изготовления подложек белковых матриц является синтетическая бумага на основе ПВХ Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8, обладающая равномерной, тонкой фактурой поверхности; сравнительно высоким содержанием диоксида титана и прошедшая финальную обработку коронным разрядом.

Проведены изыскания способов раскроя материала для изготовления подложек. С использованием оборудования и привлечением специалистов профильных организаций опробованы следующие методы: вырезки при помощи режущего плоттера, фрезерной вырезки, выкройки при помощи лазерного гравера и механической вырубки при помощи типографского пресса. Методы плоттерной и фрезерной выкройки признаны неперспективными, поскольку показали малую производительность и низкое качество конечного продукта. Лазерная вырезка не пригодна для бумаги на основе ПВХ, поскольку сопровождается выбросом токсичных продуктов, обладающих высоким корродирующим действием на элементы оборудования. Механическая вырубка при помощи типографского пресса оказалась эффективной при одновременной высечке до 20 заготовок и оптимальной по скорости изготовления большого количества однотипных деталей. Разработан шаблон, учитывающий изменения размеров заготовок в процессе вырубки, после чего по нему была изготовлена штанцевальная форма. Ресурс штанцформы для вырубки заготовок составляет около 15 тысяч оттисков (300 тыс. заготовок) при стоимости штанцформы – 15 тыс. руб.

Выполнены эксперименты по оценке способов отмывки заготовок матриц перед иммобилизацией антигенов. Предложены 2 способа подготовки поверхности ПВХ-пластика Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8, обеспечивающие сходную эффективность адсорбции белков:

- отмывка заготовок в растворе детергента 7X с применением губки и с последующей промывкой в 2 сменах дистиллированной воды;
- отмывка в ультразвуковой ванне в 3 сменах дистиллированной воды.

Установлено, что наиболее эффективная иммобилизация (около 60 нг белка на пятно диаметром 2–3 мм) на синтетической бумаге достигается при сорбции антигенов из 0,01 М боратного буферного раствора (рН 6,0) с инкубацией в течение 8 ч при температуре 4 °С и последующей сушкой при температуре 40 °С в течение 2 ч. Подобраны условия для автоматизированного нанесения антигенов на подложку нестандартным устройством «Диспенсер» с удовлетворительным качеством и производительностью 50 матриц/мин.

Экспериментально показано, что конъюгат на основе коллоидного золота позволяет выявлять до 50 пг антител, нанесённых на подложку, что примерно в 30

раз превосходит чувствительность дот-иммуноанализа с применением конъюгата щелочной фосфатазы. Динамический диапазон изменения оптической плотности пятен при использовании конъюгатов коллоидного золота составляет около двух порядков – от 60 нг до 50 пг IgG. Система визуализации с коллоидным золотом, конъюгированным с моноклональными антителами против IgG человека обеспечивает работоспособность диагностического набора в течение не менее года и выглядит наиболее перспективной для применения в мультиплексном дот-иммуноанализе.

Для укомплектования автономного диагностического набора предложено использовать 2-компонентный проявитель – таблетированную смесь метола и лимонной кислоты в весовом соотношении 2:5 (сухой компонент), а также 0,4 %-й раствор азотнокислого серебра (жидкий компонент). Таблетки сухой смеси в наборе помещаются в пустых ячейках 8-го ряда аналитической ванны. При выполнении анализа в ячейку с таблеткой сухой смеси вносится дистиллированная вода, а непосредственно перед проявлением – 0,4 %-й раствор нитрата серебра. Время проявления 7–8 мин при комнатной температуре. При проявлении серебро образует отложения разной плотности и может иметь разную окраску, что затрудняет учёт результатов. Чтобы устранить эту проблему, в схему анализа введён дополнительный этап обработки иммуночипа щелочным раствором тиомочевины, который переводит серебро в его сульфид, имеющий интенсивную и стойкую чёрную окраску.

Отработана общая схема и условия проведения мультиплексного дот-иммуноанализа антител. Анализ проводится в течение 70 мин при комнатной температуре и предусматривает 11 последовательных операций. Он выполняется в аналитической ванне оригинальной конструкции (получен Патент РФ № 2517035 «Ванна для выполнения мультиплексного дот-иммуноанализа»), заполненной рабочими растворами. Подобраны условия для автоматического заполнения ячеек ванны готовыми растворами нестандартным устройством «Ранар» с погрешностью не более 5 % и производительностью 60 ванн/ч. герметизация ячеек достигается термической запайкой ванны плёнкой «Кофлекс» (Coflex).

Определён состав набора для комплексного выявления антител к возбудителям ДВВИ (получен Патент РФ № 2495434 «Набор для

многопрофильного иммунологического анализа антител в препаратах крови»)). Набор рассчитан на 20 мультиплексных анализов и включает: 4 блока белковых матриц, 4 аналитические ванны, флакон с жидким компонентом проявляющей системы, перфоратор для вскрытия ячеек аналитической ванны, цветовую шкалу для количественной оценки результатов и инструкцию по применению набора.

Разработана инструкция по применению набора (Приложение 2). При выполнении анализа ячейки вскрывают перфоратором, в первый ряд ячеек вносят исследуемые образцы сыворотки и погружают в них иммуночипы. Затем иммуночипы вынимают и через определённые интервалы времени последовательно переносят по следующим рядам ячеек, после выемки из последнего ряда визуально учитывают результат по наличию или отсутствию тёмных пятен в местах нанесения на иммуночип иммунореагентов. Для одиночных анализов вскрывают и используют отдельные модули. При необходимости количественной оценки результатов анализа используют цветовую шкалу.

На производственной базе ЗАО «ИмДи» с использованием нестандартного оборудования для автоматизации наиболее трудоёмких процедур изготовлены экспериментальные образцы наборов и проведены их лабораторные и межлабораторные испытания. Произведены сравнительные эксперименты по эффективности выявления антител класса G к вирусам краснухи, кори и паротита с применением моноспецифических наборов для ИФА производства ЗАО «Вектор-Бест», ЗАО «МБС» и ЗАО «ИмДи», а также наших наборов для проведения мультиплексного дот-иммуноанализа. Показано, что мультиплексный тест адекватно определяет антитела в исследуемых образцах, обеспечивает чувствительность, специфичность и воспроизводимость, не уступающую тестам сравнения и сохраняет свои диагностические свойства в течение не менее года. Набор позволяет визуально регистрировать защитные уровни антител к ДВВИ и может эффективно использоваться для комплексной оценки поствакцинального иммунитета к ДВВИ, в том числе и в условиях недостаточно оснащённых медицинских учреждений.

## ВЫВОДЫ

1. По результатам сравнительных испытаний для изготовления подложек белковых матриц отобрана синтетическая бумага Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8. Показано, что для поточного изготовления заготовок матриц оптимальным является метод механической вырубки типографским прессом с последующей отмывкой заготовок в ультразвуковой ванне.

2. Определено, что оптимальная адсорбция антигенов вирусов кори, краснухи и паротита на подложке достигается при концентрации 0,03 мг/мл в 0,01 М боратном буферном растворе, pH 6.0, с инкубацией в течение 8 ч при температуре 4 °С и последующей сушкой при температуре 40 °С в течение 2 ч. Подобраны условия для автоматического нанесения антигенов на подложку аликвотами по 2 мкл с помощью устройства «Диспенсер» с производительностью 50 матриц/мин.

3. Предложена хромогенная система визуализации иммунологического связывания с использованием коллоидного золота, конъюгированного с моноклональными антителами против IgG человека, и физического проявителя с метолом. Система позволяет выявлять до 50 пг антител на подложке с динамическим диапазоном изменения оптического сигнала от 60 нг до 50 пг IgG и обеспечивает работоспособность диагностического набора не менее года.

4. Оптимизированы условия проведения мультиплексного дот-анализа антител. Анализ выполняется в аналитической ванне при комнатной температуре в течение 70 мин и включает 11 последовательных операций. Подобраны условия для автоматического заполнения ячеек ванны рабочими растворами с погрешностью не более 5 % и производительностью 60 ванн/ч. Определен режим термической герметизации ячеек ванны.

5. Разработан состав набора для комплексного выявления антител к возбудителям кори, краснухи и паротита. Набор рассчитан на 20 мультиплексных анализов и включает 4 блока белковых матриц, 4 аналитические ванны, флакон с жидким компонентом проявляющей системы, перфоратор для вскрытия ячеек, цветовую шкалу для полуколичественной оценки результатов и инструкцию по применению набора.

6. Изготовлены экспериментальные образцы набора и проведены их испытания, показавшие, что мультиплексный дот-иммуноанализ обеспечивает чувствительность, специфичность и воспроизводимость, не уступающую коммерческим иммуноферментным тестам, и сохраняет свои диагностические свойства в течение года. Набор позволяет визуально регистрировать защитные уровни антител к вирусам кори и краснухи и может использоваться для комплексной оценки поствакцинального иммунитета к ДВВИ, в том числе и в условиях недостаточно оснащенных медицинских учреждений.

### Список использованных источников информации

1. Белов А.Б., Огарков П.И. Актуальные вопросы эпидемиологии и иммунопрофилактики воздушно-капельных инфекций у населения и военнослужащих // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012. - № 1 (62). - С. 4-11.
2. Бичурина М.А., Тимофеева Е.В., Железнова Н.В. и др. Вспышка кори в детской больнице Санкт-Петербурга в 2012 году // Журнал инфектологии. - 2013. - Т. 5. - № 2. - С. 96-102.
3. Брико Н.И., Покровский В.И. Эпидемиологическая хрестоматия. - М.: ООО Издательство «Медицинское информационное агенство», 2011.- 400 с.
4. Брико Н.И. Эпидемиология: В 2-х т. - М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агенство», 2013.
5. Воробьев А.А. Проблемы биологической безопасности на современном этапе // Вестн. РАМН. – 2002. - № 10. - С. 9-12.
6. Гафаров Р.Р., Юминова Н.В., Балаев Н.В., Зверев В.В. Сравнительная оценка иммуноферментных тест-систем для количественного определения IgG к вирусу краснухи // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. - № 5 (66). – С. 41-43.
7. Джеймс Т.Х. Теория фотографического процесса / пер. с англ. / под ред. А.Л. Картужанского. - Л.: Химия. - 1980. - С. 384-392.
8. Дроздов И.Г. Вакциноуправляемые респираторные вирусные инфекции. Грипп, корь, краснуха, эпидемический паротит. – Новосибирск 2008. – 210 с.
9. Егоров А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. - М.: Высшая Школа, 1991. - 315 с.
10. Зверев В.В., Юминова Н.В. Проблемы кори, краснухи и эпидемического паротита в Российской Федерации // Вопросы вирусологии. - 2004. - № 3. - С. 8-11.
11. Зверев В. В., Семенов Б. Ф., Хаитов Р. М. Вакцинопрофилактика в XXI веке: настоящее и будущее // Иммунология. – 2009. - № 9. – С.324-335
12. Зверев В.В., Хаитов Р.М. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 880 с.

13. *Кишкун А.А.* Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. - 712 с.
14. *Комар Е.Р.* Детские инфекции // Росс. педиатр. журнал. – 2007. - № 4. – С. 32-38.
15. *Контарова Е.О., Юминова Н.В., Борисова Т.К., Зверев В.В.* Современное состояние вакцинопрофилактики эпидемического паротита // Ж. Инфекция и иммунитет. - 2011. - № 1. - С. 77-80.
16. Корь. Информационный бюллетень ВОЗ № 286, Февраль 2013 г.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/ru/index.html>
17. *Лучиев В.И.* Атлас инфекционных болезней. - М.: ГЭОТАР – Медиа, 2014. – 224 с.
18. *Лыткина И.Н., Михеева И.В.* Унификация системы управления эпидемическим процессом кори, эпидемического паротита и краснухи / Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. - № 1 (56). – С. 9-16.
19. *Ляшенко В.А., Лавров В.Ф., Юминова Р.В.* Иммуносупрессивный эффект коревого и паротитного вируса in vitro // Вопросы вирусологии. - 1999. - Т. 44. - № 1. - С. 39-41.
20. *Мирзабеков А.Д.* Биочипы в биологии и медицине 20го века. Выступление на научной сессии общего собрания РАН // Вестник российской академии наук. - 2003. - № 5. - С. 412-418.
21. *Миронов В.Л.* Основы сканирующей зондовой микроскопии.- Нижний Новгород. - 2004. - 160 с.
22. Национальный календарь профилактических прививок России, 2014 г. (приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. N 125н).
23. Новые методы иммуноанализа / под ред. W.P. Collins / пер. с англ. - М.: Мир, 1991. - 280 с.
24. Обновленная приверженность достижению к 2015 г. целей элиминации кори и краснухи и профилактики синдрома врожденной краснухи и устойчивое поддержание свободного от полиомиелита статуса в Европейском регионе

ВОЗ // Резолюция 60-й сессии Европейского регионального комитета ВОЗ. - Москва. - 13–16 сентября 2010 г. (доступно на [www. EUR/RC60/R12](http://www.eur/rc60/r12)).

25. *Парфит Г., Рочестер К.* Адсорбция из растворов на поверхностях твердых тел / пер. с англ. / под ред. В.И. Лыгина. - М.: Мир. - 1986. - 488 с.
26. Патент РФ № 2133469. Маркер для иммунохимического и гибридизационного анализа / Полтавченко А.Г., Серпинский О.И.
27. Патент РФ № 2348691. Штамм вируса паротита Драгун для получения антигена – компонента тест-системы и иммуноферментная тест-система для диагностики антител к вирусу паротита / Агафонов А.П., Пьянков С.А., Дутов В.Н. и др.
28. Патент РФ № 2441666. Комплексный антиген вируса кори, используемый в качестве компонента иммуноферментной тест-системы для диагностики антител к вирусу кори / Пьянков С.А., Агафонов А.П., Лебедев Л.Р и др.
29. *Пилле Э.Р., Андреева А.П.* Заболеваемость эпидемическим паротитом в различных странах // ЖМЭИ. -1975. - № 11. - С. 86-90.
30. *Полтавченко А.Г., Караваев В.С., Тузиков Ф.В.* Использование золей серебра как маркеров иммуноанализа на микротитровальных планшетах // ЖМЭИ. - 1998. - № 2. - С. 108-111.
31. *Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю.* Проявление золей серебра в микротитровальных планшетах // Сибирь-Восток. - 2002. - т. 9. - № 57. - С. 7-9.
32. *Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А., Зайцев Б.Н.* Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 1. Выбор формата белковых чипов и материала для изготовления подложки // Биотехнология. - 2006. - № 5. - С. 77-87.
33. *Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А.* Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 2. Иммобилизация антигенов на подложке белкового чипа // Биотехнология. - 2007. - № 1. - С. 86-94.
34. *Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А., Карпышев Н.Н.* Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 3. Визуализация результатов анализа // Биотехнология. - 2007. - № 2. - С. 63-71.

35. Постановление Главного государственного врача РФ от 12.04.2010 № 23 «О реализации Программы ликвидации кори в Российской Федерации к 2010 год в рамках стратегического плана Европейского региона ВОЗ 2005-2010».
36. Постановление Главного государственного врача РФ от 28 июля 2011 г. № 108 «Об утверждении СП 3.1.2952-11 «Профилактика кори, краснухи и эпидемического паротита».
37. Приказ Министерства здравоохранения РФ № 375 от 18.12.1997 г.
38. *Репина И.Б.* Современные проблемы краснухи // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П.Павлова. – 2003. - № 1-2. – С. 126-129.
39. *Сандахчиев Л.С., Мартынюк Р.А., Нетесов С.В.* Исследовательские приоритеты и будущие программы исследований // Материалы 11 сессии общего собрания РАМН «Медицинские проблемы биобезопасности» (3-6 апреля 2002 г., Москва) – <http://www.bio.su/sar.htm>.
40. *Селезнева Т.С., Заргарьянц А.И., Яковлева И.В.* Эпидемиологические особенности эпидемического паротита на территории Российской Федерации в современных условиях // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. - № 5 (54). – С. 12-23.
41. *Скоупс Р.К.* Методы очистки белков / пер. с англ. - М.: Мир. - 1985. - 358 с.
42. *Смеликов Я.А., Касымбекова К.Т., Джолбунова З.К. и др.* Клинико-эпидемиологические особенности кори у детей старше 1 года // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. – 2013. - № 2. – С. 84-87.
43. *Сморodinцев А. А., Тарос Л. Ю.* История выделения, аттенуации и испытаний коревого вакцинного штамма "Ленинград-16" (Л-16) // Вирусные инфекции: Труды Института им. Пастера. – СПб. - 1992. - Т. 67. - С. 76-85.
44. *Соболенко Р.* Принципы струйной печати // [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://www.nestor.minsk.by/kg/1997/45/kg74505.htm> (дата обращения 30.08.2014).
45. *Таточенко В.К.* Перспективы развития иммунопрофилактики в России // Микробиология. - 2010. - № 5. - С. 90-98.

46. *Тимченко В.Н.* Инфекционные болезни у детей // Учебник для педиатрических факультетов медицинских вузов. – 4-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2012. – 623 с.
47. *Топтыгина А.П., Алешкин В.А.* Созревание специфического гуморального ответа у детей, привитых вакциной «Приорикс» // Иммунология. - 2008. - Т. 29. - № 6. - С. 353-356.
48. *Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А.* Возрастные особенности формирования гуморального звена иммунного ответа у детей // Медицинская иммунология. - 2012. - Т. 14. - № 4-5. - С. 289-294.
49. *Топтыгина А.П., Алешкин В.А.* Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс» // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. 3. - № 4. - С. 359-364.
50. *Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алешкин В.А.* Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. 3. - № 3. - С. 243-250.
51. *Топтыгина А.П.* Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи / Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4. - № 1. – С. 7-14.
52. *Трясцина Е.С., Баринова М.С., Шилов Д.Ю.* Роль гуморального иммунитета при вакцинации против вируса краснухи // Материалы конференции «Успехи современного естествознания». - 2011. - № 8. – 139 с.
53. *Учайкин В.Ф.* Руководство по инфекционным болезням у детей. - М., 2001. - С. 193-207.
54. *Харит С.М., Черняева Т.В., Начарова Е.П., Голева О.В.* Вакцинация детей против кори и паротита и витаминотерапия / Педиатрическая фармакология. - 2007. - Т. 4. - № 6. – С. 28-33.
55. *Цвиркун О.В., Лыткина И.Н., Ежлова Е.Б. и др.* Влияние специфической профилактики кори на уровень и структуру годовой заболеваемости в Российской Федерации // Инфекционные болезни. – 2011. – Т. 9. - № 1. – С. 23-27.

56. Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т. и др. Структура заболевших корью в период элиминации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. - № 2 (63). – С. 21-25.
57. Шевченко Ю.Л. Экология человека: Вызовы цивилизации, долг общества, ответственность здравоохранения // Вестн. РАМН. – 2002. - № 10. - С. 3-6.
58. Юминова Н.В. Научные основы совершенствования вакцинопрофилактики кори и эпидемического паротита: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1998. — 44 с.
59. Юминова Н.В., Зверев В.В. Роль лабораторной диагностики кори в выполнении программы элиминации кори в РФ // НИИ вирусных препаратов им. О. Г. Анджапаридзе - М.: РАМН, 2002.
60. Юминова Н.В., Александер С.К., Зверев В.В. Диагностика кори, эпидемического паротита и краснухи // НИИ вирусных препаратов им. О.Г. Анджапаридзе. – М.: РАМН, 2004.
61. Юминова Н.В. Диагностика краснухи в Российской Федерации // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. – 2004. - № 6. – С. 18-22.
62. Юминова Н.В., Колышкин В.М., Россошанская Н.В. и др. Многолетняя пострегистрационная оценка качества отечественных моно- и комбинированных паротитных вакцин из штамма Ленинград-3 // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2006. - № 6 (31). - С. 8-10.
63. Юминова Н.В. Диагностика краснухи в Российской Федерации // Бюллетень вакцинации. - 2009. - № 6 (36). - С. 5-6.
64. Юминова Н.В., Контарова Е.О., Балаев Н.В. и др. Вакцинопрофилактика кори, эпидемического паротита и краснухи: задачи, проблемы и реалии / Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2011. - № 4 (59). - С. 40-44.
65. Ющук Н.Д. Эпидемиология инфекционных болезней: учебное пособие / 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 496 с. : ил.
66. Ярилин А.А. Иммунология. - М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2010. - 752 с.
67. Abedi G.R., Mutuc J.D., Lawler J. et al. Adverse events following a third dose of measles, mumps, and rubella vaccine in a mumps outbreak // Vaccine. – 2012. – Vol. 30. - № 49. – P. 7052-7058.

68. *Arguelles M.H., Orellana M.L., Castello A.A. et al.* Measles Virus-Specific Antibody Levels in Individuals in Argentina WHO Received a One-Dose Vaccine // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. - Vol. 44. - № 8. - P. 2733–2738.
69. *Bacarese-Hamilton T., Gray J., Ardizzoni A., Frisanti A.* Allergen microarrays // *Methods Mol. Med.* - 2005. - Vol. 114. - P. 195-207.
70. *Bastarache J., Koyama T., Wickersham N. et al.* Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: A validation study // *J. Immunol. Meth.* - 2011. - Vol. 367. - P. 33-39.
71. *Bhattacharya R., Bhattacharya D., Dhar T.K.* A novel signal amplification technology based on catalyzed reporter deposition and its application in a Dot-ELISA with ultra high sensitivity // *Immunol. Meth.* - 1999. - Vol. 227. - P. 31-39.
72. *Biagini R.E.* Comparison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxins // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* - 2004. - Vol. 11. - P. 50-55.
73. *Blackburn J.M., Hart D.J.* Fabrication of protein function microarrays for systems-oriented proteomic analysis // *Methods Mol. Biol.* - 2005. - Vol. 310. - P. 197-210.
74. *Blake M.S., Johnston K.H., Russell-Jones G.J., Gotschlich E.C.* A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots // *Anal. Biochem.* - 1984. - Vol. 136. - № 1. - P. 175-179.
75. *Bobrow M.N., Shaughnessy K.J., Litt G.J.* Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification: Application to membrane immunoassays // *J. Immunol. Meth.* - 1991. - Vol. 137. - P. 103-107.
76. *Bora U., Chugh L., Nahar P.* Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures // *J. Immunol. Meth.* - 2002. - Vol. 268. - P. 171-177.
77. *Botelho-Nevers E., Gautret P., Biellik R., Brouqui P.* Nosocomial transmission of measles: an updated review // *Vaccine.* – 2012. - № 30 (27). - P. 3996–4001.
78. *Braeye T., Linina I., De Roy R. et al.* Mumps increase in Flanders, Belgium, 2012–2013: Results from temporary mandatory notification and a cohort study among university students // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32. - № 35. – P. 4393-4398.

79. *Bussow K., Cahill D., Nietfeld W. et al.* A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed c DNA library // *Nucleic Acids Res.* - 1998. - Vol. 26. - № 21. - P. 5007-5008.
80. *Cahill D.J.* Protein and antibody arrays and their medical applications // *J. Immunol. Meth.* - 2001. - Vol. 250. - P. 81-91.
81. *Carney J., Braven H., Seal J., Whitworth E.* Present and future applications of gold in rapid assays // *IVDT.* - 2006. - № 3. - P. 41-46.
82. *Carville D.* Microparticle technology in clinical diagnostics // *IVDT.* - 2007. - № 3. - P. 38-35.
83. *Cha T., Guo A., Zhu X.Y.* Enzymatic activity on a chip: the critical role of protein orientation // *Proteomics.* - 2005. - Vol. 5. - № 2. - P. 416-419.
84. *Chandler J., Robinson N., Writing K.* Handling false signals in gold-based rapid tests / *IVDT.* - 2001. - Vol. 7. - № 2. - P. 34-45.
85. *Chaudhuri B., Raychaudhuri S.* Manufacturing high-quality gold sol // *IVDT.* - 2001. - Vol. 7. - № 2. - P. 46-54.
86. *Chiari M., Cretich M., Corti A. et al.* Peptide microarrays for the characterization of antigenic regions of human chromogranin A // *Proteomics.* - 2005. - Vol. 5. - N 14. - P. 3600-3603.
87. *Chu X., Xiang Z., Fu X. et al.* Silver-enhanced colloidal gold metalloimmunoassay for *Schistosoma japonicum* antibody detection // *J. Immunol. Meth.* - 2005. - Vol. 301. - P. 77-88.
88. *Clements C., Strassburg M., Gutts F. et al.* The epidemiology of measles / *World Health Statist. Quart.* - 1992. - Vol. 45. - №№ 2-3. - P. 285-291.
89. *Combare V., Bergeron C., Brejon S. et al.* Protein chip array profiling analysis of sera from neuroblastoma patients // *Cancer Lett.* - 2005. - Vol. 228. - № 1. - P. 91-96.
90. *Communicable diseases 2000.* - Geneva: WHO/CDS. - 2000.
91. *Cretich M., Pirri G., Damin F. et al.* A new polymeric coating for protein microarrays // *Anal. Biochem.* - 2004. - Vol. 332. - P. 67-74.
92. *Cretich M., Damin F., Pirri G., Chiari M.* Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions // *Biomolecular Engineering.* - 2006. - Vol. 23. - P. 77-88.

93. *David H. Sniadack, Walter A.* A measles eradication goal is upon us; can rubella and congenital rubella syndrome be far behind? // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31. - № 24. – P. 2659-2660.
94. *Delehanty J.B., Ligler F.S.* A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria // *Anal. Chem.* - 2002. - Vol. 74. - P. 5681-5685.
95. *Dhiman N., Jespersen D.J., Rollins L.O. et al.* Detection of IgG-class antibodies to measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus using a multiplex bead immunoassay // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2010. - № 67. – P. 346-349.
96. *Díaz-Ortega J.-L., Bennett J.V., Castañeda-Desales D. et al.* Booster immune response in children 6–7 years of age, randomly assigned to four groups with two MMR vaccines applied by aerosol or by injection // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. - № 29. – P. 3680-3686.
97. *Dimech W., Panagiotopoulos L., Francis B. et al.* Evaluation of eight anti-rubella virus immunoglobulin G immunoassays that report results in international units per milliliter // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2008. - Vol. 46. - P. 1955 – 1960.
98. *Ekins R., Chu F.* Multianalite microspot immunoassay. The microanalytical «compact disk» of the future // *Ann. Biol. Clin.* - 1992. - Vol. 50. - P. 337-353.
99. *Ekins R.* Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays // *Clinical Chemistry*. - 1998. - Vol. 44. - P. 2015-2030.
100. *Espina V., Woodhouse E.C., Wulfschlegel J. et al.* Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies // *J. Immunol. Meth.* - 2004. - Vol. 290. - P. 121-133.
101. *Esser P.* Blocking agent and detergent in ELISA // Nunc Laboratories. - Bulletin №9. / доступно на электронном ресурсе: <http://www.nuncbrand.com>. (дата обращения 12.07.2014).
102. *Esser P.* Principles in Adsorption to Polystyrene // Nunc Laboratories. - Bulletin №6 // доступно на электронном ресурсе: <http://www.nuncbrand.com>. (дата обращения 12.07.2014).
103. *Galazka A.M., Robertson S.E., Kraigher A.* Mumps and mumps vaccine: Global review // *Bull. World Health Org.* - 1999. - Vol. 77. - № 1. - P. 3-14.

104. *Garman L., Vineyard A.J., Crowe S.R. et al.* Humoral responses to independent vaccinations are correlated in healthy boosted adults // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. - № 43. – P. 5624-5631.
105. *Geho D., Lahar N., Gurnani P. et al.* Pegylated, streptavidin-conjugated quantum dots are effective detection elements for reverse-phase protein microarrays // *Bioconjug. Chem.* - 2005. - Vol. 16. - № 3. - P. 559-566.
106. *Gobet A., Mayet A., Journaux L. et al.* Mumps among highly vaccinated people: Investigation of an outbreak in a French Military Parachuting Unit, 2013 // *Journal of Infection*. – 2014. – Vol. 68. - № 1. – P. 101-102.
107. *González-González M., Bartolome R., Jara-Acevedo R. et al.* Evaluation of homo- and hetero-functionally activated glass surfaces for optimized antibody arrays // *Anal. Biochem.* - 2014. - Vol. 450. - P. 37-45.
108. *Gupta R.K., Best J., Mac-Mahon E.* Mumps and the UK epidemic 2005 // *BMJ*. – 2005. - № 330. – P. 1132-1135.
109. *Haab B.B., Dunham M.J., Brown P.O.* Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions // *Genome Biol.* - 2001. - Vol. 2. - № 2. - P. 4-7.
110. *Heymann D.L.* Strengthening Global Preparedness for Defense against Infections Disease Threats. - Geneva: WHO. – 2001.
111. *Halperin S.A., Ferrera G., Scheifele D. et al.* Safety and immunogenicity of a measles-mumps-rubella-varicella vaccine given as a second dose in children up to six years of age // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. - № 20. – P. 2701-2706.
112. *Hanaoka M., Hisano M., Watanabe N. et al.* Changes in the prevalence of the measles, rubella varicella-zoster, and mumps virus antibody titers in Japanese pregnant women // *Vaccine*. - 2013. - Vol. 31. - № 19. - P. 2343-2347.
113. *He H., Chen E., Chen H. et al.* Similar immunogenicity of measles-mumps-rubella (MMR) vaccine administered at 8 months versus 12 months age in children // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. - № 31. – P. 4001-4005.
114. *Helfand R.F., Kebede S., Gray J.H. et al.* Timing of development of measles-specific Immunoglobulin M 26 and G after primary measles vaccination // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1999. - Vol. 6 (2). - P. 178–180.

115. *Hsu S.M., Soban E.* Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry // *J. Histochem. Cytochem.* - 1982. - Vol. 30. - P. 1079-1084.
116. *Hueber W., Kidd B.A., Tomooka B.H. et al.* Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 2005. - Vol. 52. - № 9. - P. 2645-2655.
117. *Hultschig C., Kreutzberger J., Seitz H. et al.* Recent advances of protein microarrays // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2006. - Vol. 10. - P. 4-10.
118. *Hungerford D., Cleary P., Ghebrehewet S. et al.* Risk factors for transmission of measles during an outbreak: matched case-control study // *Journal of Hospital Infection.* – 2014. - Vol. 86. - № 2. - P. 138-143.
119. *James F., Bale Jr.* Measles, mumps, rubella, and human parvovirus B19 infections and neurologic disease // *Handbook of Clinical Neurology.* – 2014. – Vol. 121. – P. 1345-1353.
120. *Jamil R.K., Taqavian M., Sadigh Z.-A. et al.* Evaluation of the thermal stability of a novel strain of live-attenuated mumps vaccine (RS-12 strain) lyophilized in different stabilizers // *Journal of Virological Methods.* – 2014. – Vol. 199. – P. 35-38.
121. *Janzi M., Odling J., Pan-Hammarstrom Q. et al.* Serum microarrays for large scale screening of protein levels // *Mol. Cell. Proteomics.* - 2005. - Vol. 4. - № 12. - P. 1942-1947.
122. *Jitsukawa T.* Increased coating efficiency of antigens and preservation of original antigenic structure after coating in ELICA / *J. Immunol. Methods.* – 1989. – № 116. - P. 251-257.
123. *Kakoulidou M., Forsgren M., Lewensohn-Fuchs I. et al.* Serum levels of rubella-specific antibodies in Swedish women following three decades of vaccination programmes // *Vaccine.* - 2010. - Vol. 28. - № 4. - P. 1002-1007.
124. *Kakoulidou M., Ingelman-Sundberg H., Johansson E. et al.* Kinetics of antibody and memory B cell responses after MMR immunization in children and young adults // *Vaccine.* – 2013. – Vol. 31. - № 4. – P. 711-717.
125. *Kim S.H., Tamrazi A., Carlson K.E., Katzenellenbogen J.A.* A proteomic microarray approach for exploring ligand-initiated nuclear hormone receptor pharmacology,

- receptor selectivity, and heterodimer functionality // *Mol. Cell. Proteomics*. - 2005. - Vol. 4. - № 3. - P. 267-277.
126. *Kingsmore S.F.* Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2006. - Vol. 5. - P. 310-317.
  127. *Kogot J.M., Sarkes D.A., Val-Addo I. et al.* Increased affinity and solubility of peptides used for direct peptide ELISA on polystyrene surfaces through fusion with a polystyrene binding peptide tag // *BioTechniques*. - 2012. - Vol. 52. - P. 95-101.
  128. *Kopf E., Shnitzer D., Zharhary D.* Panorama Ab microarray cell signaling kit: a unique tool for protein expression analysis // *Proteomics*. - 2005. - Vol. 5. - № 9. - P. 2412-2416.
  129. *Kricka L.J., Master S.R.* Validation and quality control of protein microarray-based analytical methods // *Mol. Biotechnol.* - 2008. - Vol. 38. - P. 19-23.
  130. *Kusnezow W., Hoheisel J.D.* Solid supports for microarray immunoassays // *J. Mol. Recognit.* - 2003. - Vol. 16. - № 4. - P. 165-176.
  131. *Lasher L.E., Ayers T.L., Amornkul P.N. et al.* Contacting passengers after exposure to measles on an international flight: implications for responding to new disease threats and bioterrorism // *Public Health Rep.* - 2004. - № 119. - P. 458-463.
  132. *Lemmo A., Fisher J., Geysen H. et al.* Characterization of an Inkjet Chemical Microdispenser for Combinatorial Library Synthesis // *Anal. Chem.* - 1997. - Vol. 69. - P. 543-551.
  133. *Lesaicherre M., Uttamchandani M., Chen G., Yao S.* Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2002. - Vol. 12. - N 16. - P. 2079-2083.
  134. *Levine H., Ankol O., Rozhavski V. et al.* Rubella seroprevalence in the first birth cohort reaching fertility age after 20 years of two dose universal vaccination policy in Israel // *Vaccine*. - 2012. - Vol. 30. - № 50. - P. 7260-7264.
  135. *Lievano F., Galea S., Thornton M. et al.* Measles, mumps, and rubella virus vaccine (M-M-R<sup>TM</sup>II): A review of 32 years of clinical and postmarketing experience // *Vaccine*. - 2012. - Vol. 30. - № 48. - P. 6918-6926.
  136. *Lingwood D., Ballantyne J.S.* Alkaline phosphatase-immunoglobulin conjugate binds to lipids in vitro, independent of antibody selectivity // *J. Immunol. Meth.* - 2006. - Vol. 311. - P. 174-177.

137. *Liotta L.A., Espina V., Mehta A.I. et al.* Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications // *Cancer Cell.* - 2003. - Vol. 3. - № 4. - P. 317-325.
138. *Livingston K.A., Rosen J.B., Zucker J.R. et al.* Mumps vaccine effectiveness and risk factors for disease in households during an outbreak in New York City // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32. - № 3. – P. 369-374.
139. *Lowe A.M.* Reemergence of measles. Current operation «vaccination» in our schools // *Perspect Infirm.* – 2012. - № 9. - P. 25–26.
140. *Maillet M., Bouvat E., Robert N. et al.* Mumps outbreak and laboratory diagnosis // *Journal of Clinical Virology.* – 2014. – Vol. 62. – P. 14-19.
141. *Morais S., Maquieira A., Puchades R.* Selection and characterisation of membranes determination of the insecticide carbar by means of an immunofiltration assay. Application to the rapid and sensitive // *J. Immunol. Meth.* - 1999. - Vol. 224. - P. 101-109.
142. *Nielsen U., Geierstanger B.* Multiplexed sandwich assays in microarray format // *J. Immunol. Meth.* - 2004. - Vol. 290. - P. 107-120.
143. *Okada H., Sato T.A., Katayama A. et al.* Comparative analysis of host response related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated vaccines // *Arch. Vir.* - 2001. - № 146. - P. 859–874.
144. *Ortega-Sanchez I.R., Vijayaraghavan M., Barskey A.E., Wallace G.S.* The economic burden of sixteen measles outbreaks on United States public health departments in 2011 // *Vaccine.* – 2014. - Vol. 32. - № 11. – P. 1311-1317.
145. *O'Shea S., Corbett K.M., Barrow S.M. et al.* Rubella reinfection; role of neutralising antibodies and cell-mediated immunity // *Clinical and Diagnostic Virology.* – 1994. - Vol. 2. - № 6. - P. 349-358.
146. *Panum P., Petersen J.* Observation made the epidemic of measles on the Faros Islands in the 1846 // Distributed by the American Public Health Association, 1940.
147. *Papen R.* Nanoliter Dispensing for Drug Discovery // Presented at the IBC Conference on Microfabrication and Microfluidic Technologies. - San Diego, August 7-8, 1997.

148. *Papp K., Szekeres Z., Erdei A., Prechl J.* Two-dimensional immune profiles improve antigen microarray-based characterization of humoral immunity // *Proteomics*. - 2008. - Vol. 8. - P. 2840-2848.
149. *Papp K., Végh P., Hóbor R. et al.* Characterization of factors influencing on-chip complement activation to optimize parallel measurement of antibody and complement proteins on antigen microarrays // *J. Immunol. Meth.* - 2012. - Vol. 375. - P. 75-83.
150. *Paweletz C.P., Charboneau L., Bichsel V.E. et al.* Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front // *Oncogene*. - 2001. - Vol. 20. – 1981 p.
151. *Peluso P., Wilson D.S., Do D., Tran H. et al.* Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays // *Anal. Biochem.* - 2003. - Vol. 312. – 113 p.
152. *Plotkin S.A.* Vaccines, vaccination and vaccinology // *J. Infect. Dis.* - 2003. - Vol. 187 (9). - P. 1349-1359.
153. *Prechl J., Papp K., Erde A.* Antigen microarrays: descriptive chemistry or functional immunomics? // *Trends in Immunol.* - 2010. - Vol. 31. - № 4. - P. 133-137.
154. *Quinlisk P., Harris M., Thorton T.* Mumps Epidemic // *Iowa*, 2006. - № 55 (13). – P. 366-368. (Доступно на: <http://www.idph.state.ia.us/>).
155. *Ramachandran N., Larson D.N., Stark P.R. et al.* Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays // *FEBS J.* - 2005. - Vol. 272. - № 21. - P. 5412-5425.
156. *Raska I.* Electron microscopic immunocytochemistry with colloidal gold. - Laboratory manual of the practical course organized by the Institute of Experimental Medicine, Czechoslovak Academy of Sciences in collaboration with the Czechoslovak Biochemical Society of the Czechoslovak Academy of Sciences // Prague. - May 29th-June 3rd, 1988. – 110 p.
157. Rubella (Measles) / In: *PATHOLOGY AND PATHOGENESIS OF HUMAN VIRAL DISEASE*. - Academic Press - 2000. - P. 337-407.
158. *Ru-Qiang L., Cui-Yan T., Kang-Cheng R.* Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement // *J. Immunol. Meth.* - 2004. - Vol. 285. - P. 157-163.

159. *Ruwona T.B., McBride R., Chappel R. et al.* Optimization of peptide arrays for studying antibodies to hepatitis C virus continuous epitopes // *J. Immunol. Meth.* - 2014. - Vol. 402. - P. 35-42.
160. *Saitoh A., Okabe N.* Recent progress and concerns regarding the Japanese immunization program: Addressing the «vaccine gap» // *Vaccine.* - 2014. - Vol. 32. - № 34. – P. 4253-4258.
161. *Sauer U., Pultar J., Preininger C.* Critical role of the sample matrix in a point-of-care protein chip for sepsis // *J. Immunol. Meth.* - 2012. - Vol. 378. - P. 44-50.
162. *Sawada A., Yamaji Y., Nakayama T.* Mumps Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains // *Journal of Infection and Chemotherapy.* – 2013. – Vol. 19. - № 3. – P. 480-485.
163. *Schweitzer B., Roberts S., Grimwade B. et al.* Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification // *Nat. Biotechnol.* - 2002. - Vol. 20. - P. 359-363.
164. *Schweitzer B., Predki P., Snyder M.* Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale // *Proteomics.* - 2003. - Vol. 3. - № 11. - P. 2190-2199.
165. *Sheehan P.E., Edelstein R.L., Tamanaha C.R., Whitman L.J.* A simple pen-spotting method for arraying biomolecules on solid substrates // *Biosensors and Bioelectronics.* - 2003. - Vol. 18. - P. 1455-1459.
166. *Simone B., Balasegaram S., Gobin M. et al.* Evaluation of the measles, mumps and rubella vaccination catch-up campaign in England in 2013 // *Vaccine.* – 2014. - Vol. 32. - № 36. – P. 4681-4688.
167. *Sinclair J.C.* Constructing arrays of proteins // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2013. - Vol. 17. - P. 946-951.
168. *Speer R., Wulfkuhle J.D., Lotta L.A.* Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis // *Curr. Opin. Mol. Ther.* - 2005. - Vol. 7. - № 3. - P. 240-245.
169. *St-Martin G., Knudsen L.K., Engsig F.N. et al.* Mumps resurgence in Denmark // *Journal of Clinical Virology.* – 2014. – Vol. 61. - № 3. – P. 435-438.
170. *Strohfus P.K., Collins T., Phillips V. et al.* Health care providers' knowledge assessment of measles, mumps, and rubella vaccine // *Applied Nursing Research.* – 2013. – Vol. 26. - № 4. – P. 162-167.

171. *Sultana R., Rahman M. M., Hassan Z., Hassan M. S.* Prevalence of IgG Antibody Against Measles, Mumps and Rubella in Bangladeshi Children: A Pilot Study to Evaluate the Need for Integrated Vaccination Strategy // *Scand. J. Immunol.* - 2006. – Vol. 64. – P. 684-689.
172. *Tabatabai L.B.* Developments in diagnostic technologies for bioterrorism agents // *IVD Technology.* - 2005. - № 6. - P. 32-38.
173. *Templin M.F., Stoll D., Schrenk M. et al.* Protein microarray technology // *Trends Biotechnol.* - 2002. - Vol. 20 - P. 160-169.
174. *Tischer A, Gerike E.* Immune response after primary and re-vaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella // *Vaccine.* - 2000. - Vol. 18. - № 14. – P. 1382-1392.
175. *Tisher A., Andrews N., Kafatos G.* Standardization of measles, mumps and rubella assays to enable comparisons of seroprevalence data across 21st European countries and Australia // *Epidemiol. Infect.* - 2007. - Vol. 135. - P. 787 – 797.
176. *Tisone T.C.* Dispensing systems for miniaturized diagnostics // *IVDT.* - 1998. - № 3. - P. 8-12.
177. *Tomizaki K.Y., Usui K., Mihara H.* Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements // *Chembiochem.* - 2005. - Vol. 6. - № 5. - P. 782-799.
178. *Urbanowska T., Mangialaio S., Zickler C. et al.* Protein microarray platform for the multiplex analysis of biomarkers in human sera // *J. Immunol. Meth.* - 2006. - Vol. 316. - P. 1-12.
179. *Usonis V., Anca I.* Francis André et al. Rubella revisited: Where are we on the road to disease elimination in Central Europe? // *Vaccine.* - 2011. - Vol. 29. - № 49. - P. 9141-9147.
180. *Vareil M.O., Rouibi G., Kassab S. et al.* Epidemic of complicated mumps in previously vaccinated young adults in the South-West of France // *Médecine et Maladies Infectieuses.* – 2014. – Vol. 44. - №№ 11-12. – P. 502-508.
181. *Voskuhl J., Brinkmann J., Jonkheijm P.* Advances in contact printing technologies of carbohydrate, peptide and protein arrays // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2014. - Vol. 18. - P. 1-7.

182. *Wiese R., Belosludtsev Y., Powdrill T., Hogan M.* Simultaneous multianalytes ELISA performed on a microarray platform // *Clin. Chem.* - 2001. - Vol. 47. - P. 1451-1458.
183. *Tyor W., Harrison T.* Mumps and rubella // *Handbook of Clinical Neurology*, Chapter 28. – 2014. – Vol. 123. – P. 591-600.
184. *Wilson D.S., Nock S.* Recent developments in protein microarray technology // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2003. - Vol. 42. - P. 494.
185. *Witte K.L., Nock S.* Recent applications of protein arrays in target identification and disease monitoring // *Drug Discovery Today: Technology.* - 2004. - Vol. 1. - № 1. - P. 35-40.
186. World Health Organization. Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012–2020. Geneva: WHO 2012. Available at [http://www.who.int/immunization/newsroom/Measles\\_Rubella\\_StrategicPlan\\_2012\\_2020.pdf](http://www.who.int/immunization/newsroom/Measles_Rubella_StrategicPlan_2012_2020.pdf) [accessed 22.03.13].
187. *Zhu H., Snyder M.* Protein chip technology // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2003. - Vol. 7. - № 1. - P. 55-63.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
"ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ  
"ВЕКТОР"



УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ГНЦ ВБ "Вектор"

В. Н. Михеев  
20\_\_ г.

Методика приготовления компонентов диагностического набора для  
мультиплексного выявления в препаратах крови антител к возбудителям  
инфекционных заболеваний.

Новосибирск  
2015

## 1 НАЗНАЧЕНИЕ МЕТОДИКИ

Настоящая методика предназначена для приготовления основных компонентов диагностических наборов для одновременного выявления в препаратах крови антител к возбудителям инфекционных заболеваний.

## 2 СУЩНОСТЬ МЕТОДИКИ

Сущность методики заключается в проведении процедур по приготовлению основных компонентов, указанных в разделе 3, используемых при производстве и применении диагностических наборов для одновременного выявления в препаратах крови антител к возбудителям инфекционных заболеваний.

## 3 ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУР МЕТОДИКИ

### 3.1 Приготовление растворов , используемых при изготовлении белковых матриц

#### 3.1.1 Реактивы, материалы, оборудование:

- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный (РФ, ООО ТД «СИБДИАМЕД», «чда», ГОСТ 11773-76);
- натрий тетраборнокислый (РФ, ООО «Реахим», «хч», ГОСТ 4199-76);
- полиэтиленгликоль с мол. м. 20 000 кДа («SERVA», Германия);
- метол (ООО «Реактив», «хч», ГОСТ 25664-83);
- кислота лимонная («Sigma», США, ACS reagent, >99.5 %);
- натрий углекислый (РФ, «ЭКОС-1», «хч», ГОСТ 83-79);
- сахараза («Реактив», «чда», ГОСТ 5833-75 (изм. 1));
- трис («Хеликон», РФ, кат. № Am-O497-0.5, чистота 99,8 %);
- детергент 7X;
- тиомочевина («Sigma», США);
- натрий гидроокись (РФ, ООО «Реахим», «чда», ГОСТ 4328-77);
- натрий хлористый (РФ, ООО «Реахим», «хч», ГОСТ 4233-77);
- натрия азид («Мерк», Германия, Кат. № VK 36916388);
- спирт этиловый ректификованный (РФ, «Реахим», ГОСТ 18300-87);
- весы лабораторные ВМ-II (РФ, ООО «ОКБ Веста», Госреестр СИ РФ № 52773-13) или аналогичные других производителей;
- термостат электрический суховоздушный ТС 80 М-2 (ПО «Медлабортехника», РФ, ТУ 64-1-1382-76) или аналогичный других производителей;
- холодильник бытовой типа «Бирюса 22» (ОАО «Красноярский завод холодильников «Бирюса», г. Красноярск, РФ, ГОСТ 16317-87 и ТУ 92-01.02.029-88);

- мешалка магнитная с подогревом (АОЗТ «Экрос», РФ);
- дозаторы пипеточные (пипетки одноканальные) переменного объема 0,5-10; 5-50; 2-200; 100-1000 мкл; 1-10 мкл со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3,5 %) типа «Ленпипет» (ЗАО «Термо Электрон», СПб., РФ, ТУ 9452-002-33189998-2002; ТУ 9452-003-33189998-2002);
- бумага фильтровальная;
- стаканы химические объемом 100-300 мл;
- колба плоскодонная, круглая объемом 250 мл (4100-250);
- ступка с пестиком фарфоровый (РФ, ООО «Луч-Метео», ГОСТ 9147).

Спецодежда:

- халат лабораторный;
- перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88).

### **3.1.2 Приготовление 1 %-го раствора детергента 7X для отмывки заготовок матриц (7X)**

Растворяют 100 мл детергента 7X в 10 л дистиллированной воды. Используют полученный раствор для отмывки заготовок матриц многократно. Хранят в закрытом сосуде при комнатной температуре до 2 мес.

### **3.1.3 Приготовление 1 %-го раствора казеина на 0,025 М фосфатном буферном растворе (x10 концентрат)**

*Раствор готовят на дважды дистиллированной воде!*

Растворяют в 700 мл дистиллированной воды 9 г натрия фосфорнокислого двузамещенного ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) и 1 г натрия азиды. Вносят в полученный раствор 10 г казеина натриевой соли и растворяют при интенсивном перемешивании на мешалке. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 1000 мл. Проводят коррекцию до pH  $7,2 \pm 0,2$  растворами гидроокиси натрия или соляной кислотой с концентрацией 0,1 моль/л.

### **3.1.4 Приготовление 10 %-го раствора полиэтиленгликоля с мол. м. 20000 кДа (ПЭГ-20)**

*Раствор готовят на дважды дистиллированной воде!*

Растворяют 10 г ПЭГ-20000 и 0,1 г натрия азиды в 80 мл воды. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.

### **3.1.5 Приготовление 0,5 М Na-карбонатного буферного раствора, pH $9,5 \pm 0,2$ (КББ) (x20 концентрат)**

*Раствор готовят на дважды дистиллированной воде!*

Растворяют 0,8 г натрия углекислого и 1,4 г натрия углекислого кислого в 40 мл воды. Объем раствора доводят до 50 мл. Корректировку pH проводят 0,1 М растворами гидроокиси натрия или соляной кислоты. Для использования необходимое количество концентрата разводят бидистиллированной водой в 20 раз.

### **3.1.6 Приготовление 0,05 М боратного буферного раствора для сорбции антигенов (10X концентрат)**

*Раствор готовят на дважды дистиллированной воде!*

Растворяют 0,8 г натрия тетрабонокислого и 0,25 г натрия азида в 40 мл дистиллированной воды. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 50 мл. Проводят коррекцию до pH  $6,0 \pm 0,2$  растворами гидроокиси натрия или соляной кислотой с концентрацией 0,1 моль/л.

### **3.1.7 Приготовление раствора для блокировки свободных участков матрицы**

*Раствор готовят на дважды дистиллированной воде!*

В 500 мл дистиллированной воды вносят 200 мл 1 %-го раствора казеина (по п. 1.2.), добавляют 1 г натрия азида, объем раствора доводят дистиллированной водой до 1000 мл и перемешивают. Проводят коррекцию до pH  $7,2 \pm 0,2$  растворами гидроокиси натрия или соляной кислотой с концентрацией 0,1 моль/л.

### **3.1.8 Приготовление стабилизирующего раствора**

*Раствор готовят на дважды дистиллированной воде!*

Растворяют 100 г сахарозы, 1 г натрия азида и 20 г триптона в 750 мл дистиллированной воды. Доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 мл. Проводят коррекцию до pH  $7,2 \pm 0,2$  растворами гидроокиси натрия или соляной кислотой с концентрацией 0,1 моль/л. При использовании погружают рабочую часть белковых матриц в полученный раствор на 1-2 мин, вынимают матрицы и высушивают под потоком теплого ( $40-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) воздуха в течение не менее 8 часов.

## **3.2 Приготовление компонентов, входящих в состав набора**

### **3.2.1 Приготовление буферного раствора для отмывок (ФСБТ)**

Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный	- 2,6 г.
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный 2-водный	- 0,35 г.
Натрий хлористый	- 8,5 г.
Натрия азид	- 1,0 г.

Растворяют указанные выше компоненты в 750 мл дистиллированной воды по ГОСТ 6709-72 при температуре  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и добавляют 1 мл твин-20. Доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 мл. Проводят коррекцию до pH  $7,2 \pm 0,2$

растворами гидроокиси натрия или соляной кислотой с концентрацией 0,1 моль/л. Вносят в ячейки 2, 3, 5 и 6 аналитической ванны по 500 мкл.

Можно приготовить ФСБТ из 25Х концентрата. Для этого флакон (25 мл) концентрата вливают в мерную посуду, разбавляют дистиллированной водой до объема 650 мл и добавляют 3 мл 10 %-го раствора твин-20. Перемешивают на мешалке, избегая обильного вспенивания.

### **3.2.2 Приготовление буферного раствора для разведения сывороток (РБРС)**

Вносят 50 мл 1 %-го раствора казеина и 1 мл Твин-20 в 700 мл ФСБТ (по п. 1.5.). Доводят объем раствора до 1000 мл ФСБТ и полученный раствор тщательно перемешивают. Проводят коррекцию до pH  $9,5 \pm 0,2$  растворами гидроокиси натрия или соляной кислотой с концентрацией 0,1 моль/л. Вносят в ячейки 1 аналитической ванны по 350 мкл.

### **3.2.3 Приготовление буферного раствора для разведения конъюгата (золя) (РБРК)**

Вносят 50 мл 1 %-го раствора казеина в 700 мл ФСБТ. Доводят объем раствора до 1000 мл ФСБТ и полученный раствор тщательно перемешивают. Проводят коррекцию до pH  $7,2 \pm 0,2$  растворами гидроокиси натрия или соляной кислотой с концентрацией 0,1 моль/л. При применении готовят рабочее разведение конъюгата (золя) на РБР-К и вносят в ячейки 4 аналитической ванны по 350 мкл.

### **3.2.4 Приготовление жидкого компонента физического проявителя (ФП-Ж)**

Растворяют в 700 мл бидистиллированной воды 4 г серебра азотнокислого. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 1000 мл и перемешивают. Приготовление раствора производят в месте, защищенном от прямого солнечного света, в химически чистой посуде из темного стекла. Фасуют в непрозрачные флаконы по 4 мл.

### **3.2.5 Приготовление сухого компонента проявителя (ФП-С) (таблетки массой 4 мг)**

Сухой компонент физического проявителя представляет собой тритурационные таблетки, изготавливаемые путем формования увлажненной спиртом смеси метола и лимонной кислоты во фторопластовой или силиконовой матрице с последующей сушкой. Смешивают метол и лимонную кислоту в соотношении 2:5 и тщательно перемешивают и измельчают в фарфоровой ступке до образования однородного порошка. Необходимую для заполнения матрицы дозу смеси помещают в чашку Петри, увлажняют спиртом до состояния густой пасты и еще раз тщательно перемешивают. Полученной пастой шпателем равномерно заполняют ячейки матрицы и удаляют излишки пасты. Сушат заполненную матрицу не менее суток при 30-40 °С в темном месте, после чего извлекают

таблетки из ячеек и досушивают их в указанных условиях еще сутки. Проводят выборочный весовой контроль таблеток (определяют погрешность дозирования) и упаковывают их в непрозрачный флакон с осушителем. Хранят без доступа света при комнатной температуре в сухом помещении.

### **3.2.6 Приготовление стабилизатора оптического сигнала**

Растворяют 10 г натрия гидроокиси и 10 г тиомочевины в 700 мл дистиллированной воды. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 1000 мл и перемешивают.

## **3.3 Подготовка конъюгата коллоидного золота с антителами против иммуноглобулинов человека (иммунозоля)**

### **3.3.1 Оборудование, материалы и реактивы:**

- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- моноклональные антитела мыши к IgG человека Fab-специфичный изотип IgG<sub>1</sub> («Sigma», США, Кат. № 041M4752);
- тетрахлорзолотая кислота («Sigma-Aldrich», США, Кат. № G4022-1G);
- натрия цитрат («Acros Organics» Бельгия, Кат. № A0240446 );
- полиэтиленгликоль с мол. м. 20 000 кДа («SERVA», Германия);
- натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный (РФ, ООО ТД «СИБДИАМЕД», «чда», ГОСТ 11773-76);
- натрий хлористый (РФ, ООО «Реахим», «хч», ГОСТ 4233-77);
- натрия азид («Мерк», Германия, Кат. № VK 36916388);
- глицерин (РФ, ООО «Реахим», «чда», ГОСТ 6259-75);
- планшет для иммуноферментного анализа (ПО «Красноярский химкомбинат «Енисей», РФ; ТУ 64-02-375-86);
- весы лабораторные ВМ-II (РФ, ООО «ОКБ Веста», Госреестр СИ РФ № 52773-13) или аналогичные других производителей;
- холодильник бытовой типа «Бирюса 22» (ОАО «Красноярский завод холодильников «Бирюса», г. Красноярск, РФ, ГОСТ 16317-87 и ТУ 92-01.02.029-88);
- мешалка магнитная с подогревом (АОЗТ «Экрос», РФ);
- центрифуга Allegra 64R («Beckman Coulter», США, GS30(G)-IM-11AA);
- дозаторы пипеточные (пипетки одноканальные) переменного объема 0,5-10; 5-50; 2-200; 100-1000 мкл; 1-10 мкл со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3,5 %) типа «Ленпипет» (ЗАО «Термо Электрон», СПб., РФ, ТУ 9452-002-33189998-2002; ТУ 9452-003-33189998-2002);

- бумага фильтровальная;
- стаканы химические объемом 100-300 мл;
- колба плоскодонная, круглая объемом 250 мл (4100-250).

Спецодежда:

- халат лабораторный;
- перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88).

### **3.3.2 Приготовление растворов**

*Все операции по приготовлению растворов и подготовке иммунозоля проводят с использованием дважды дистиллированной воды!*

#### **3.3.2.1 Приготовление 0,01 М фосфатного буферного раствора, pH 8,0 (ФБР)**

Растворяют 3,6 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного в 750 мл воды при температуре 20 °С ( $\pm 5$  °С). Доводят объем раствора до 1000 мл. Проводят коррекцию до pH 8,0 $\pm$ 0,2 растворами соляной кислоты или гидроокиси натрия с концентрацией 0,1 моль/л. Хранить в плотно закупоренной склянке до 2 недель в холодильнике.

#### **3.3.2.2 Приготовление 20 %-го раствора натрия хлористого**

Растворяют 2 г натрия хлористого в 10 мл воды. Хранят в плотно закупоренной склянке при комнатной температуре.

#### **3.3.2.3 Приготовление 10 %-го раствора полиэтиленгликоля с мол. м. 20 000 кДа (ПЭГ-20)**

Растворяют 1 г полиэтиленгликоля с мол. м. 20 000 кДа в 10 мл воды. Хранят в плотно закупоренной склянке до 2 недель в холодильнике.

#### **3.3.2.4 Приготовление 10 %-го раствора натрия азида**

Растворяют 1 г натрия азида в 10 мл воды. Хранят в плотно закупоренной склянке при комнатной температуре.

#### **3.3.2.5 Приготовление 1 %-го раствора тетрахлорзолотой кислоты (ТХЗК)**

Ампулу с ТХЗК (0,5 г) обмыть водой, поместить в стеклянный сосуд для приготовления раствора и разбить. Залить в сосуд 0,5 л воды и перемешать взбалтыванием. Хранят в плотно закупоренной склянке из темного стекла при комнатной температуре.

#### **3.3.2.6 Приготовление 1 %-го раствора натрия цитрата**

Растворяют 0,7 г натрия цитрата в 50 мл воды. Используют в течение 1 часа.

### **3.3.3 Получение 20-30 нм золя золота**

В 100 мл горячей воды при перемешивании добавляют 1 мл 1 % ТХЗ, доводят до кипения, быстро добавляют 2,5 мл 1 %-го свежеприготовленного раствора натрия цитрата.

Продолжают кипячение 10 мин, затем колбу снимают с мешалки, остужают и хранят без доступа света при комнатной температуре до использования.

### **3.3.4 Проведение коагуляционного теста**

Готовят серию двукратных разведений антител к иммуноглобулинам человека (*a/IgG-Hum*) в ячейках планшета в объеме 50 мкл воды, начиная с разведения 1/20 до 1/2560. Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл золя, перемешивают встряхиванием и, спустя 10 мин, вносят по 50 мкл 20 %-го раствора натрия хлористого. Через 5 мин визуально учитывают результаты. Стабилизированный золь не меняет окраски (розовый), недостаточно нагруженный золь синее.

Расчет нагрузки белка на 10 мл золя (Y) проводят по формуле:

$$Y = 50/X * 100 + 20 \%,$$

где X – кратность последнего разведения, стабилизирующего золь.

### **3.3.5 Нагрузка золя**

В чистую колбу вносят расчетное количество белка, быстро добавляют расчетное количество золя, закрывают колбу и легко перемешивают. Спустя 2 ч добавляют раствор ПЭГ-20 до конечной концентрации 1 %.

### **3.3.6 Очистка иммунозоля**

Спустя сутки после приготовления центрифугируют золь при 15 000 g в течение 25 мин. Удаляют супернатант, осадок ресуспендируют в ФБР, pH 8,0 с 0,05 % ПЭГ и повторно осаждают в том же режиме. Ресуспендируют осадок *Au-a/IgG-Hum* в ФБР с 0,05 % ПЭГ-20.

## **3.4 Определение ориентировочного рабочего разведения иммунозоля**

Готовят серию двукратных разведений (от 1/50 до 1/400) концентрата золя на РБРК в объеме 0,5 мл и погружают в них матрицы с иммобилизованными IgG человека и кролика. Инкубируют 30 мин при 37 °C (±2 °C). Отмывают дважды по 2 мин в ФСБТ и дистиллированной воде. Проявляют матрицы в физическом проявителе с метолом 7-8 мин. Визуально определяют последнее разведение золя, обеспечивающего максимальный оптический сигнал на IgG человека при отсутствии окрашивания мест нанесения IgG кролика. Это разведение принимают за ориентировочное рабочее. Более точно рабочее разведение устанавливают с использованием белковых матриц с антигенами и рабочей панели сывороток. Критерием выбора служат отчетливый сигнал в положительных точках и отсутствие сигнала в отрицательных.

## **3.5 Хранение иммунозоля**

Добавляют к концентрату золя глицерин до 40 % (о/о) и хранят при –20 °C до использования.

#### 4 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

4.1 Помещение должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.2 Содержание вредных веществ не должно превышать допустимых концентраций по ГОСТ 12.1.005.

4.3 Организация обучения работающих безопасности труда проводится по ГОСТ 12.0.004.

#### 5 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ПЕРСОНАЛА

К проведению работ допускаются лица не моложе 18 лет, имеющие высшее или среднетехническое специальное образование, ознакомленные с инструкцией по эксплуатации и устройством оборудования, обученные методике проведения работ.

После первичного инструктажа работник проходит стажировку по охране труда в соответствии с ГОСТ 12.0.004-9 сроком до 14 рабочих смен.

#### 6 ОХРАНА ТРУДА И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ


Работы проводят с использованием индивидуальных средств защиты (халат, резиновые перчатки), соблюдая следующие инструкции по технике безопасности:


- Инструкция по противопожарной безопасности.
- Инструкция по охране труда при работе с едкими веществами (кислотами и щелочами).
- Инструкция по охране труда при работе с использованием лабораторного вытяжного шкафа.
- Инструкция по охране труда при работе со стеклянной посудой, оборудованием.
- Инструкция по охране труда при работе с электрооборудованием.

Методику разработали:

Зав. лаб., д.б.н.

м.н.с.

  
\_\_\_\_\_  
А.Г. Полтавченко

  
\_\_\_\_\_  
А.В. Ерш

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор  
ЗАО «ИмДи»

Н.А. Кривенчук  
« 10 » 01 2013 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа антител класса G к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций.

«ДВВИ-спектр-IgG-антитела»

### НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор «ДВВИ-IgG-антитела» предназначен для бесприборного одновременного выявления в сыворотке (плазме) крови человека протективного уровня антител класса G к возбудителям: краснухи (*Rubella virus*), кори (*Measles virus*) и паротита (*Mumps virus*).

Набор позволяет оценить наличие или отсутствие гуморального иммунитета к указанным возбудителям.

Набор рассчитан на проведение 20 анализов.

### ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

#### Принцип анализа

В наборе «ДВВИ-спектр-IgG-антитела» использован принцип непрямого твердофазного дот-иммуноанализа. Схема анализа приведена на рисунке 2.1.

Твердой фазой является белковая матрица, на рабочей зоне которой дискретно расположены сигнальные точки. Аналитическая ванна содержит 11 рядов ячеек с готовыми к использованию растворами и компонентами. Белковая матрица последовательно переносится из первого ряда ячеек в последующий (до одиннадцатого ряда) с инкубацией на каждом этапе. Результаты анализа наблюдаются визуально в виде серых точек на рабочей зоне белковой матрицы.

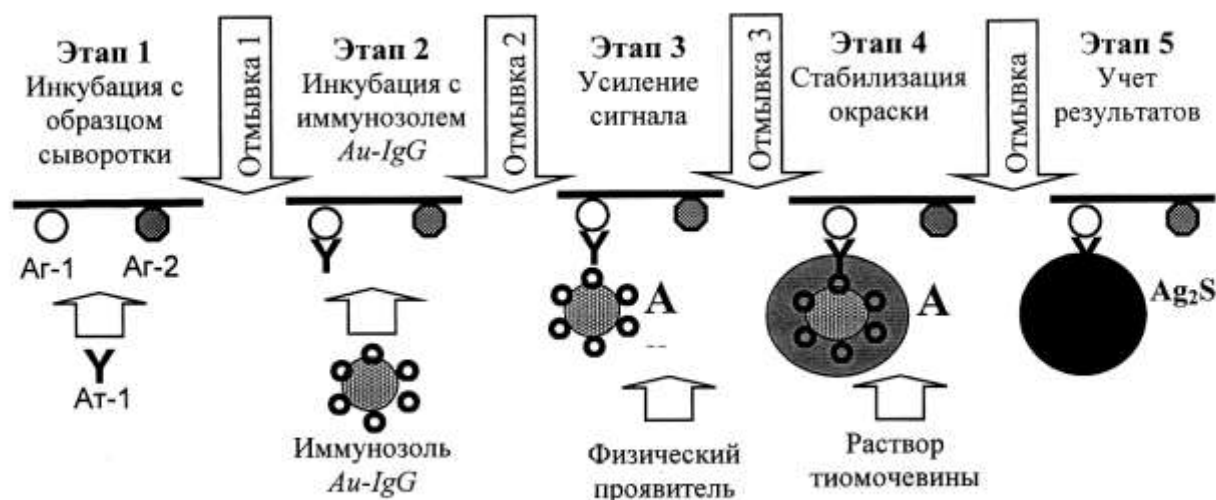


Рисунок 2.1. Общая схема дот-иммуноанализа антител.

## Состав набора

- **Комплект белковых матриц** (см. рисунок 2.2) выполнен в виде гребня из 5 белковых матриц (лицевая сторона пронумерована), на каждой из которых имеется рабочая зона с 4 сигнальными точками. В верхней слева точке нанесены антитела класса G человека, эта точка служит контролем работоспособности системы (**К+**). 3 точки содержат антигены возбудителей инфекционных заболеваний: вирусов краснухи, кори и эпидемического паротита. Нижняя зона свободна от антигенов и является зоной контроля фонового сигнала системы (**К-**).

Комплекты белковых матриц упакованы в пакеты – 4 шт.

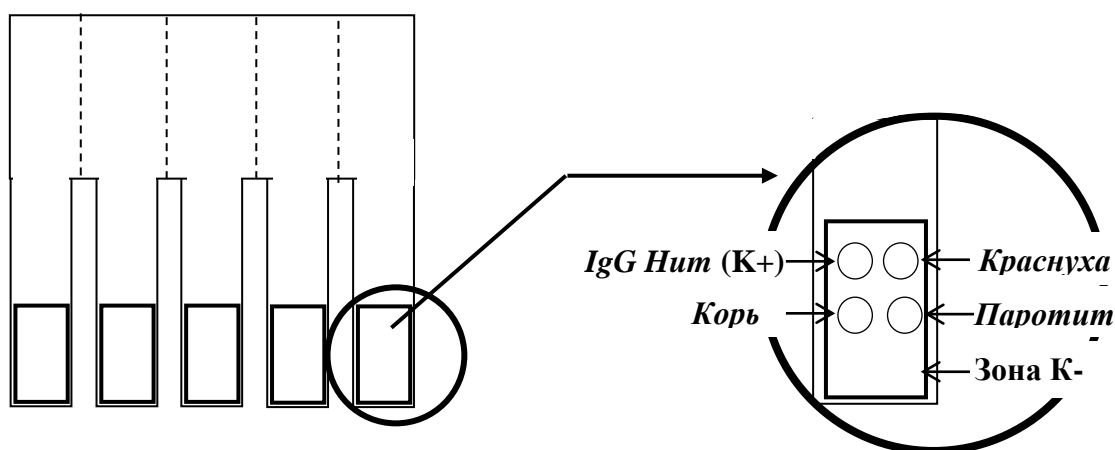


Рисунок 2.2. Схема комплекта белковых матриц и рабочей области матрицы

- **Аналитические ванны** с 11 рядами ячеек, заполненных рабочими растворами и герметизированных фольгой. Содержимое ячеек аналитической ванны отражено в таблице

Таблица - Содержимое ячеек аналитической ванны

№ ряда	Содержимое ячеек в ряду
A1-E1	Раствор для разведения сывороток, 300 мкл
A2-E2	Отмывочный раствор, 350 мкл
A3-E3	Отмывочный раствор, 400 мкл
A4-E4	Рабочий раствор конъюгата, 300 мкл
A5-E5	Отмывочный раствор, 350 мкл
A6-E6	Бидистиллированная вода, 400 мкл
A7-E7	Бидистиллированная вода, 450 мкл
A8-E8	Таблетка сухого компонента проявителя, 4 мг
A9-E9	Бидистиллированная вода, 500 мкл
A10-E10	Стабилизатор окраски, 300 мкл
A11-E11	Бидистиллированная вода, 350 мкл

- **Жидкий компонент физического проявителя (ФП-Ж)** - 1 флакон (4 мл);
- **Бидистиллированная вода** – 1 флакон (4 мл);
- **Перфоратор** для вскрытия фольги - 1 шт.;
- **Цветовая гамма**, состоящая из 10 тонов серого цвета (пронумерованных от светлого к темному) - 1 шт.;
- **Бумага фильтровальная** – 2 шт.

## **АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Набор реагентов «ДВВИ-спектр-IgG-антитела» предназначен для одновременного выявления в сыворотке (плазме) крови человека антител класса G к возбудителям инфекций: Rubella virus, Measles virus, Mumps virus.

Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G Rubella virus по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G Rubella virus по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G Measles virus по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G Measles virus по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G Mumps virus по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G Mumps virus по Стандартной панели сывороток предприятия - 100 %.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Биоматериалы, используемые при изготовлении набора, не содержат потенциально опасных инфекционных материалов.

При работе с сывороткой или плазмой крови следует соблюдать все меры предосторожности, во избежание прямого контакта с исследуемым образцом.

При работе с набором следует использовать лабораторную одежду и надевать одноразовые резиновые перчатки.

Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

Все отработанные материалы подвергать обработке дезинфицирующим раствором не менее 2 ч.

## **ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 10 и 150 мкл;

- перчатки резиновые хирургические;
- лабораторный таймер или часы.

## **АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Для проведения анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека объемом не менее 40 мкл. Желательно использовать свежеприготовленные образцы сыворотки (плазмы) крови, допускается использование образцов, хранившихся при температуре 2 - 8 °C не более 7 суток, либо при минус 20 °C не более 3 месяцев.

Для исключения ложноположительных результатов исследуемые сыворотки необходимо готовить и хранить в стерильных условиях, исключающих возможность контаминации посторонней микрофлорой.

Не использовать сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериемией, не использовать термоинактивированные сыворотки. Избегать повторных циклов замораживания и оттаивания образцов. Для возможного повторного исследования образца сыворотки желательно образец разделить на аликвоты, которые хранить при температуре 2 – 8 °C не более 7 суток, либо при минус 20 °C не более 3 месяцев.

Не допускать тестирование пула, содержащего несколько образцов сывороток. Каждый образец сыворотки или раствора необходимо отбирать новым наконечником. Для отбора исследуемых проб и компонентов применять полуавтоматические пипетки.

## ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

- Набор позволяет одновременно использовать как весь комплект, так и его сегменты с несколькими белковыми матрицами и модулями аналитической ванны.
- Все стадии анализа выполняются при комнатной температуре 20 – 25 °С.
- При проведении анализа:
  - не используйте реагенты из наборов разных серий;
  - не прикасайтесь к рабочей зоне белковых матриц;
  - не снимайте фольгу, покрывающую аналитическую ванну. Следует прокалывать перфоратором только покрытие используемых ячеек и прокалывать его только в момент, определенный порядком проведения анализа.

### Подготовительные операции

Перед проведением анализа извлеките аналитическую ванну и белковую матрицу из упаковки и выдержите их при 20 - 25 °С в течение 20 - 30 мин.

При использовании не полного комплекта белковых матриц отделите по перфорации необходимое количество белковых матриц. Неиспользованную часть комплекта до следующего применения храните в герметично закрытой упаковке при температуре 2 - 8 °С.

Если при проведении анализа используются не все ячейки аналитической ванны, последовательно прокалывайте фольговое покрытие только используемых ячеек в порядке проведения анализа. Для дальнейшего хранения частично использованной ванны, заклейте проколотые ячейки клейкой лентой, чтобы предотвратить вытекание содержимого.

### 1. Введение образцов. Реакция антиген – антитело

1.1. **Перед проведением анализа, вскрыть перфоратором ячейки восьмого ряда (A8-E8) аналитической ванны, содержащие таблетки ФП-С, внести в них по 150 мкл бидистиллированной воды из флакона с бидистиллированной водой.**

1.2. Проколоть перфоратором фольгу над ячейками с первого по третий ряды (A1-E1, A2-E2, A3-E3) аналитической ванны.

1.3. Внести в ячейки первого ряда (A1-E1) по 15 мкл образцов исследуемых сывороток (или плазмы).

1.4. Держать комплект белковых матриц лицевой стороной к себе. Погрузить комплект в ячейки первого ряда (A1-E1) так, чтобы каждая матрица комплекта была погружена в свою ячейку – A1, B1, C1, D1, E1 соответственно.

**1.5. Перемешать содержимое ячеек аналитической ванны, вынимая комплект белковых матриц из ячейки и опуская обратно в ячейку 10 раз.**

1.6. Оставить матрицы комплекта в ячейках для инкубации на 25 минут при комнатной температуре.

1.7. Извлечь комплект белковых матриц и прикоснуться нижними концами матриц к чистой фильтровальной бумаге для удаления капель. Удаляя капли, держать комплект вертикально.

### 2. Отмывка 1

2.1. Погрузить белковые матрицы комплекта в ячейки второго ряда (A2-E2). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.

2.2. Выдержать матрицы комплекта в ячейках второго ряда 1 мин. Проколоть перфоратором фольгу над ячейками с четвертого по седьмой ряды (A4-E4, A5-E5, A6-E6, A7-E7) аналитической ванны.

2.3. Извлечь белковые матрицы комплекта, прикоснуться нижними концами матриц к чистой фильтровальной бумаге и погрузить комплект матриц в ячейки третьего ряда (A3-E3). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.

- 2.4. Выдержать матрицы комплекта в ячейках третьего ряда 1 мин.
- 2.5. Извлечь комплект матриц и прикоснуться нижними концами матриц к чистой фильтровальной бумаге для удаления капель. Удаляя капли, держать комплект матриц вертикально.

### **3. Инкубация с иммунозолом**

- 3.1. Погрузить белковые матрицы комплекта в ячейки четвертого ряда (A4-E4). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.
- 3.2. Выдержать комплект матриц в ячейках четвертого ряда 25 мин. Извлечь матрицу и прикоснуться её нижним концом к чистой фильтровальной бумаге для удаления капель.

### **4. Отмывка 2**

- 4.1. Погрузить белковые матрицы комплекта в ячейки пятого ряда (A5-E5). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.
- 4.2. Выдержать матрицы комплекта в ячейках пятого ряда 1 мин.
- 4.3. Извлечь комплект матриц, прикоснуться нижними концами матриц к чистой фильтровальной бумаге и погрузить комплект в ячейки шестого ряда (A6-E6). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.
- 4.4. Вскрыть покрытие ячеек девятого, (A9-E9), десятого (A10-E10) и одиннадцатого рядов (A11-E11) за 2-3 минуты до окончания проявления.
- 4.5. Выдержать матрицы комплекта в ячейках шестого ряда 1 мин.
- 4.6. Извлечь комплект матриц и прикоснуться нижними концами матриц к чистой фильтровальной бумаге для удаления капель и погрузить матрицы комплекта в ячейки седьмого ряда (A7-E7). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.
- 4.7. Выдержать матрицы комплекта в ячейках седьмого ряда 1 мин.
- 4.8. **Открыть флакон с жидким компонентом проявителя (ФП-Ж) и быстро внести пипеткой по 150 мкл этого раствора в ячейки восьмого ряда (A8-E8).**
- 4.9. Извлечь комплект матриц и прикоснуться нижними концами матриц к чистой фильтровальной бумаге для удаления капель.

### **5. Проявление**

- 5.1. Погрузить белковые матрицы в ячейки восьмого ряда (A8-E8). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.
- 5.2. Выдержать матрицы комплекта 8 мин в ячейках восьмого ряда (A8-E8).

### **6. Стабилизация визуального сигнала**

- 6.1. Извлечь комплект белковых матриц, прикоснуться нижними концами матриц к чистой фильтровальной бумаге и погрузить комплект в ячейки девятого ряда (A9-E9). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.
- 6.2. Извлечь комплект белковых матриц, прикоснуться нижними концами матриц к чистой фильтровальной бумаге и погрузить матрицы комплекта в ячейки десятого ряда (A10-E10).
- 6.3. Выдержать матрицы в ячейках 1 мин при комнатной температуре.
- 6.4. Извлечь матрицы из ячеек десятого ряда (A10-E10), прикоснуться их нижними концами к чистой фильтровальной бумаге.
- 6.5. Опустить матрицы комплекта в ячейки одиннадцатого ряда (A11-E11). Перемешать содержимое ячейки как указано в пункте 1.5.
- 6.6. Извлечь комплект белковых матриц и высушить на воздухе.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА**

### **Достоверность анализа**

Для соблюдения правильной работы набора и достоверности результатов необходимо соблюдение следующих условий:

1. На рабочей зоне белковой матрицы должна появиться сигнальная точка соответствующая зоне K+, при этом интенсивность ее окрашивания должна соответствовать номеру тона цветовой гаммы не ниже 5-го (от 5-го до 10-го).

2. Оценку фонового сигнала набора необходимо проверять по сигнальной точке соответствующей зоне K-, при этом интенсивность ее окрашивания должна соответствовать номеру тона цветовой гаммы не выше 4-го (от 1-го до 4-го).

Если хотя бы одно из вышеперечисленных условий не соблюдается, результаты анализа считаются недействительными, при этом образец должен исследоваться повторно.

### **Интерпретация результатов**

Результат анализа проявляется в виде окрашенных точек на рабочей зоне белковой матрицы комплекта. Уровень интенсивности сигнальных точек оценивается с помощью цветовой гаммы. Каждой сигнальной точке присваивается номер тона цветовой гаммы ( $N_{\text{тон}}$ ).

Возьмите цветовую гамму, найдите на ней тон, соответствующий зоне фонового сигнала (зона K-), и запишите его порядковый номер  $N_{\text{тон}}(K-)$ .

Для интерпретации результатов анализа для каждого конкретного антигена необходимо найти на цветовой гамме тон, соответствующий точке сигнала на рабочей зоне белковой матрицы, Запишите его порядковый номер  $N_{\text{тон}}(AG)$ .

- Если  $N_{\text{тон}}(AG) > N_{\text{тон}}(K-) + 2 \text{ тон}$ , то исследуемый образец содержит протективный уровень антител класса G к соответствующему антигену.

- Если  $N_{\text{тон}}(AG) < N_{\text{тон}}(K-) + 2 \text{ тон}$ , то исследуемый образец не содержит протективный уровень антител класса G к соответствующему антигену.

### **УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2 - 8 °С. Замораживание не допускается.

Срок годности набора реагентов 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит

Транспортирование производить при температуре 2 - 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

## СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

**Внести 150 мкл бидистиллированной воды в ячейки восьмого ряда**

### **Введение образцов**

Проколоть перфоратором фольгу над ячейками с первого по четвертый ряды.  
Внести в ячейки первого ряда по 15 мкл образцов.  
Перемешать содержимое ячеек, инкубировать матрицы 25 мин

### **Отмывка 1**

Перемешать содержимое ячеек второго ряда и выдержать в них комплект матриц 1 мин  
Перемешать содержимое ячеек третьего ряда и выдержать в них комплект матриц 1 мин

### **Инкубация с конъюгатом**

Перемешать содержимое ячеек четвертого ряда, инкубировать комплект матриц 25 мин.  
Проколоть перфоратором фольгу над ячейками с пятого по восьмой ряды

### **Отмывка 2**

Перемешать содержимое ячеек пятого ряда и выдержать в них комплект матриц 1 мин  
Перемешать содержимое ячеек шестого ряда и выдержать в них комплект матриц 1 мин  
Перемешать содержимое ячеек седьмого ряда и выдержать в них комплект матриц 1 мин  
**Внести 150 мкл ФП-Ж в ячейки восьмого ряда**

### **Проявление**

Перемешать содержимое ячеек восьмого ряда, инкубировать комплект матриц 8 мин.  
Проколоть перфоратором фольгу над ячейками с десятого по одиннадцатый ряды

### **Стабилизация визуального сигнала**

Инкубировать комплект матриц в ячейках десятого ряда 1 мин  
Ополоснуть комплект матриц в ячейках одиннадцатого ряда  
Высушить комплект матриц на воздухе

**По вопросам, касающимся качества набора «ДВВИ-спектр-IgG-антитела»,  
следует обращаться в ООО «ИмДи-Тест» по адресу:**

630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-он, р.п. Кольцово, ул. Технопарковая, 1;  
тел/факс (383) 336-76-23.

Федеральная служба  
по надзору в сфере  
защиты прав потребителей  
и благополучия человека

**Федеральное бюджетное  
учреждение здравоохранения**

Центр гигиены и эпидемиологии в  
Республике Хакасия

655017, Республика Хакасия,  
г. Абакан, ул. Ленина, 66  
ИНН 1901066506  
e-mail: [ses@abkannet.ru](mailto:ses@abkannet.ru)  
Тел. (факс) 22-65-00

ООО  
«ИмДи-спектр»

« 08 » июля 2013 г.

№ \_\_\_\_\_

#### Отзыв

об апробации иммуночипов по выявлению антител класса G к  
TORCH инфекциям и ДВИ

В рамках сотрудничества, вирусологическая лаборатория с ПЦР ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия» г. Абакан, получила наборы реагентов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа антител класса G к TORCH инфекциям и ДВИ.

Отработаны оба набора.

В анализ одномоментно бралось по пять образцов сыворотки крови.

Четко прошел анализ по выявлению антител к ДВИ.

В области К- проявлений цвета, ярче фона матрицы, не было.

Интенсивность К+ во всех пробах выше 5 тона цветовой гаммы.

Сигнальные точки на белковой матрице по всем инфекциям хорошо визуализируются, разная интенсивность окраски, т.е. результат хорошо читается.

Сигналы на белковой матрице на TORCH-спектр получились немного размытыми и К+ визуально прошел не выше 4-го тона.

Инструкция к наборам хорошо прописана, никаких вопросов не возникло при проведении анализа. Единственное, на наш взгляд, в инструкции при проведении анализа пункт 4.4 можно сместить ближе к разделу 6.

Учитывая, что мы определяем напряженность иммунитета в ИФА и IgG выдаются в количественном варианте, хотелось бы такую же возможность видеть и у иммуночипов. Как вариант, прописать какой тон цветовой гаммы соответствует защитному титру или МЕ для вакциноуправляемых инфекций и токсоплазмоза.

Такой формат иммуночипов точно будет востребован даже в крупных лабораториях, так как это снимет проблему изучения напряженности иммунитета у лиц без данных о прививках.

Очень хотелось бы иметь ИФА диагностику на IgG к возбудителю дифтерии и соответственно включить их в иммуночип на ДВИ, местечко- то на матрице есть.

Да, на самом деле просто, быстро, доступно.

Спасибо за предоставленную возможность поработать на наборах!

С удовольствием продолжим сотрудничество, особенно если это будет касаться индикации антигенов в ООС (смывы, вода, клещи и т.д.)

С уважением и наилучшими пожеланиями,  
заведующая вирусологической лабораторией с ПЦР ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия»

врач высшей квалификационной категории  Хвостова НА  
Тел./факс 8(3902)34-35-27



## ОТЧЕТ

**о контроле в ОБТК набора реагентов «ДВИ-спектр-IgG-антитела»  
на рабочих панелях сывороток**

На контроль были представлены 4 набора реагентов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа видоспецифических антител класса IgG к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций «ДВИ-спектр-IgG-антитела», серии 03.

Постановка контроля проведена 15-22.01.2013г. на 3-х наборах с использованием контрольных панелей, содержащих и не содержащих IgG-антитела к вирусу краснухи, вирусу кори и вирусу паротита (по 5 положительных и по 5 отрицательных). Для оценки стабильности при хранении два набора выдерживались в термостате при температуре  $37 \pm 1$  °C в течение 7 суток и проводился контроль на контрольных панелях.

Для контроля наборов реагентов привлекались лаборанты ООО «ИмДи-спектр», по результатам контроля высказаны замечания, которые приведены в отчете.

**Результаты контроля:****Первичный контроль:**

- на всех белковых матрицах зона K+(IgG) выражена четко, зона K- чистая;
- контрольные панели на все три инфекции определены правильно.

**Контроль после термодеградаци:**

- на всех белковых матрицах зона K+(IgG) выражена четко, но яркость точек слабее, зона K- чистая;
- контрольная панель правильно определена только на IgG к вирусу кори;
- на панелях к вирусу краснухи и вирусу паротита оценить чувствительность невозможно в связи с резким снижением яркости точек, специфичность оценивается в 100 %.

**Выводы:**

- В представленных наборах зона K+(IgG) выражена ярко, как при первом контроле, так и при контроле после термодеградаци. Зона K- на некоторых гребенках имеет слабый фон;
- Панели IgG к вирусам краснухи, паротита и кори при первичном контроле определены правильно для положительных и отрицательных сывороток, чувствительность и специфичность 100 %;
- После термодеградаци оценить чувствительность по краснухе и паротиту не представляется возможным, в связи с падением сигнала;
- После термодеградаци чувствительность и специфичность по кори оценивается в 100%;

**Основной вывод:** Представленный Набор реагентов рабочие панели выявляет правильно. Необходимо выяснить причины снижения чувствительности после термодеградаци.

Заместитель директора  
ООО «ИмДи-спектр»



Н.А. Антонов

Начальник ОБТК



В.И. Вербовский

22.01.2013г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ НАБОРА-РЕАГЕНТОВ № 904

„ДВИ-станд-IGG-антитела“

Набор №1

Серия 03

Контр. № 1795

Годеи до Вибаво 2014

Дата 15.01.2013

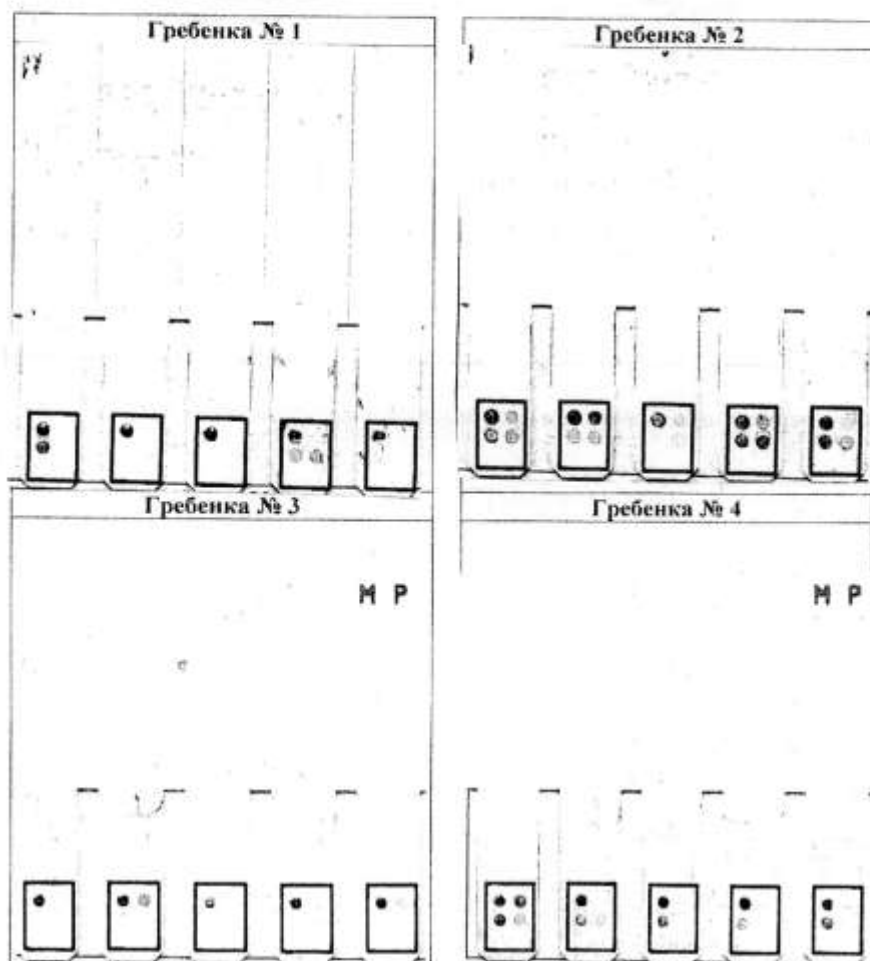
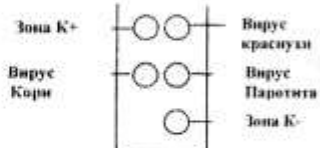


Схема размещения антигенов  
в рабочей зоне белковой матрицы



	Гребенка №1					Гребенка №2					Гребенка №3					Гребенка №4				
№ Белковой матрицы	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5
Внесенный образец	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10
СНИ	№ _____ Серия <u>01</u> <u>Краснуха IGG</u>					№ _____ Серия <u>01</u> <u>Краснуха IGG</u>					№ _____ Серия <u>01</u> <u>Корь IGG</u>					№ _____ Серия <u>01</u> <u>Корь IGG</u>				
Результаты анализа (№ <sub>титр</sub> )																				
Зона K+	8	8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	8	7	8	8	6	8	8	8	7
Вирус Краснухи	1	1	1	1	2	5	6	4	4	4										
Вирус Корь											1	2	1	2	2	5	5	5	5	5
Вирус Паротита																				
Зона K-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	3	3	2	1	1

### Основные показатели тест-систем

Параметры	Результаты	Компонент	Серия	Характеристика (разделение, цвет)	Соответствие
Специфичность вируса краснухи (100%)	100%	1. Комплект белковых матриц	03	Пластиковый гребень из пяти матриц	соответствует
Чувствительность вируса краснухи (100%)	100%	2. Аналитическая ванна с растворами:	04	Полипропиленовая ванна с 12 рядами ячеек	соответствует
Специфичность вируса кори (100%)	100%	3. Жидкий компонент физического проявителя	04	Светозащитный пластиковый флакон с прозрачной бесцветной жидкостью	соответствует
Чувствительность вируса кори (100%)	100%	4. Бидистиллированная вода	04	Пластиковый флакон с прозрачной бесцветной жидкостью	соответствует
Специфичность вируса паротита (100%)					
Чувствительность вируса паротита (100%)					
Зона $K^+ > 4$	$6 \div 8$				
Зона $K^- < 4$	$1 \div 3$				

Замечания:

**Набор реагентов соответствует требованиям Инструкции по применению.**

Исполнитель А.И. Мещеряков А.И. Мещеряков  
 «15» 01 2013 г. (подпись) (Ф.И.О.)

Начальник ОБТК В.В. Вербовский Вербовский В.В.  
 «15» сентября 2013 г. (подпись) (Ф.И.О.)



В.В. Вербовский

Нач. ОБТК В.В. Вербовский

ООО «ИмДи – спектр»

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ НАБОРА-РЕАГЕНТОВ № 905

«РВН-матр-Тсб-анализ»

набор №2

Серия 03

Контр. № 1785

Годеи до 31.03.2014

Дата 15.01.2013

Гребенка № 1

K+ R  
H P  
K-

1

2

3

4

5

Гребенка № 2

K+ R  
H P  
K-

6

7

8

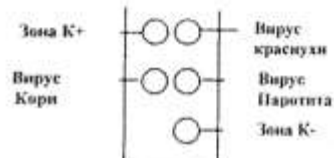
9

10

Гребенка № 3

Гребенка № 4

Схема размещения антигенов в рабочей зоне белковой матрицы



	Гребенка №1					Гребенка №2					Гребенка №3					Гребенка №4				
№ Белковой матрицы	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5
Внесенный образец	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	n9	n10										
СПИ	№ _____ Серия <u>01</u> <i>Набор №2</i>					№ _____ Серия <u>01</u> <i>Набор №2</i>					№ _____ Серия _____					№ _____ Серия _____				
Результаты анализа (N <sub>max</sub> )																				
Зона K+	5	8	7	7	7	8	8	8	8	8										
Вирус Краснухи																				
Вирус Кори																				
Вирус Паротита	1	2	1	1	1	6	5	4	4	6										
Зона K-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1										

### Основные показатели тест-систем

Параметры	Результаты	Компонент	Серия	Характеристика (разведение, цвет)	Соответствие
Специфичность вируса краснухи (100%)		1. Комплект белковых матриц	03	Пластиковый гребень из пяти матриц	соответствие
Чувствительность вируса краснухи (100%)		2. Аналитическая ванна с растворами:	04	Полипропиленовая ванна с 12 рядами ячеек	соответствие
Специфичность вируса кори (100%)		3. Жидкий компонент физического пропитателя	04	Светозащитный пластиковый флакон с прозрачной бесцветной жидкостью	соответствие
Чувствительность вируса кори (100%)		4. Биотидилированная вода	04	Пластиковый флакон с прозрачной бесцветной жидкостью	соответствие
Специфичность вируса паротита (100%)	100%				
Чувствительность вируса паротита (100%)	100%				
Зона K <sup>+</sup> > 4	6 ÷ 8				
Зона K <sup>-</sup> < 4	1				

Замечания:

**Набор реагентов соответствует требованиям Инструкции по применению.**

Исполнитель Алексеев Александр Николаевич

« 03 » 01 2013 г.

(подпись)

(Ф.И.О.)

Начальник ОБТК Вербовский В.И.

« 03 » 01 2013 г.

(подпись)

(Ф.И.О.)



*В.И. Вербовский*

Нач. ОБТК *В.И. Вербовский*

УТВЕРЖДАЮ  
Ген. директор ЗАО «ИмДи»  
Н.А. Кривенчук



Акт  
внедрения в практику результатов научных разработок

«15» февраля 2015 г.

п. Кольцово

Наименование внедряемых в практику материалов:

- Пусковой регламент № ПУР 66200338 – 03 – 12 (проект) на производство наборов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа видоспецифических антител класса IgG к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций - «ДВВИ-спектр-IgG-антитела»,

- Инструкция по применению набора реагентов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа антител класса G к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций - «ДВВИ-спектр-IgG-антитела»,

- Методика приготовления компонентов диагностического набора для мультиплексного выявления в препаратах крови антител к возбудителям инфекционных заболеваний.

Форма внедрения: Научно-техническая документация для регистрации и производства набора реагентов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа антител класса G к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций - «ДВВИ-спектр-IgG-антитела».

Краткое описание внедряемых в практику материалов: Разработанная А.В. Ерш с соавт. научно-техническая документация использована ЗАО «ИмДи» при выпуске и испытаниях опытной партии набора реагентов для одновременного выявления методом дот-иммуноанализа антител класса G к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций - «ДВВИ-спектр-IgG-антитела» и далее планируется к использованию при регистрации и промышленном выпуске указанных диагностических наборов.

Зам. ген. директора ЗАО «ИмДи»  
по производству

Н.А. Антонов