

Ерш 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)

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Кольцово – 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Научный руководитель: Полтавченко Александр Георгиевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммунохимической диагностики ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Официальные оппоненты: Беклемишев Анатолий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии ФГБУН «НИИ биохимии»

Синяков Александр Николаевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится 25 сентября 2015 года в 9-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской области, 630559; тел. (8-383) 336-74-28

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан 5 августа 2015 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор _____ В.А. Белявская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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 заболеваниям подвергается и взрослое население. Плановая и масштабная вакцинопрофилактика привела к существенному снижению показателей заболеваемости этими инфекциями, что позволило в отдельных регионах мира прогнозировать их ликвидацию. Но с 2011 года в странах Европейского региона и ряде регионов России эпидемиологическая ситуация 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., а затем и на 2020 г.

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. 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 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 становится экономически целесообразной только при массовых обследованиях, а результаты разных анализов трудно свести в единую систему для формирования персональных иммунологических профилей.

Таким образом, методы серомониторинга требуют улучшения. 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 эта проблема напрямую связана со здоровьем рождающихся детей и в перспективе определяет здоровье населения страны. Особую актуальность эта задача приобретает сегодня, в период реализации программы элиминации ДВВИ на всей территории России.

Цель работы: разработка диагностического набора, позволяющего осуществлять мультиплексное выявление антител в препаратах крови к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита.

Задачи исследования:

1. Подбор и оценка целевых свойств материалов для изготовления набора.
2. Отработка условий и технологических приёмов при изготовлении набора.
3. Отработка условий и методологии проведения мультиплексного анализа.
4. 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, выполняющую 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;
- разработана оригинальная конструкция аналитической ванны, получен Патент РФ № 2517035 «Ванна для выполнения мультиплексного дот-иммуноанализа» и отработаны условия её заполнения рабочими растворами с помощью автоматического устройства «Ранар»;
- определён 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.

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.

Апробация материалов диссертации.

Материалы исследований по теме диссертации были представлены на двенадцати конференциях различного уровня, на двух из которых выступила с личным докладом.

Реализация результатов исследования.

По материалам диссертации опубликовано пять научных работы (три из которых в журналах, входящих в перечень ВАК) и два патента РФ.

Структура и объем диссертации.

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

Вклад автора в диссертационную работу.

Основные результаты, представленные в диссертационной работе получены лично автором. 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.

Работа выполнена в течение 2012–2015 гг. 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).

Материалы и методы исследования

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

Рабочая панель из донорских сывороток предоставлена ЗАО «ИмДи» (Новосибирск), калибровочные образцы взяты из наборов «ВекторКорь-IgG» и «ВекторРубелла-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Антиген вируса краснухи представлен композицией рекомбинантных белков E1, E2 и С (фирма «Капель», Москва). Антиген вируса кори получен в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» из штамма НовО/96 вируса кори, а антиген вируса паротита – из штамма Драгун вируса эпидемического паротита, культивированием на монослое клеток Vero с последующей очисткой и концентрированием в градиенте плотности сахарозы.

В качестве конъюгата использовали иммунозоль *Au-a/Hum MAT* – золь (20 нм) золота, адсорбционно связанный с моноклональными антителами против IgG человека. Для проявления конъюгата использовали физический проявитель (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).

Дот-иммуноанализ на белковых матрицах выполняли в аналитических ваннах при комнатной температуре в объеме 300 мкл. Анализ включал экспозиции с образцом (в разведении 1/20) и конъюгатом по 25 мин, 2-кратные отмытки между операциями по 1 мин и проявление (8 мин). Учет результатов проводили по наличию или отсутствию темных пятен в местах нанесения антигенов.

В качестве тестов сравнения использовали коммерческие наборы для ИФА фирм: ЗАО «Вектор-Бест», ЗАО «МБС», и ООО «ИмДи-спектр» (Новосибирск).

Основное содержание работы

Исследование целевых свойств материалов для изготовления подложки

С целью поиска альтернативы синтетической бумаге Polyolith GC-3, снятой с производства, проведена оценка доступных сортов белой, матовой синтетической бумаги потенциально пригодной для изготовления подложек белковых матриц. Перечень материалов и источники их приобретения приведены в таблице 1.

Таблица 1 - 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» www.komus.ru | н/о | н/о | ++ |
| ПВХ | Zenofol-print | ООО «Зенон» www. zenonline.ru | ++++ | - | - |
| ПВХ | Пластик для струйной печати | ЗАО «Корпорация знак» www. znak-korp.ru | н/о | н/о | ++++ |
| Полипропилен (синтетическая бумага Polyolith) | GC-3 (0,25 мм) | ООО «Берег» www.bereg.net | +++++ | - | - |
| | 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» www.forda.ru | 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

В первую очередь оценивали совместимость чистой поверхности материала с проявителем, используемым в тесте. Проявитель представляет собой раствор нитрата серебра и восстановителя в кислой среде, стабильный в течение 15–20 мин. Дестабилизировать проявитель с диффузным выпадением серебра на доступные поверхности способны ряд веществ, которые потенциально могут присутствовать в материалах подложек. Для оценки фонового проявления отмытые материалы нарезали полосками 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 1.

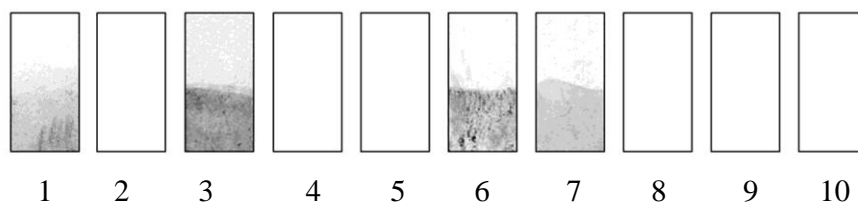


Рисунок 1 - Результаты оценки совместимости с проявителем материалов: 1 – Lux-Print; 2 – Zenofol-print; 3 – пластик (ПВХ) для струйной печати; 4, 5 и 6 – синтетическая бумага Polyolith марок GC-3, GH-1 и PA-1, соответственно; 7, 8, 9 и 10 – синтетическая бумага Pentaprint марок PR-E281/49-05/9200-542_4,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

Видно, что четыре образца бумаги провоцируют проявление и не годятся для применения в иммуноанализе.

Далее изучали микроскопическую структуру поверхности оставшихся 6 образцов. Параллельно проводили адсорбцию на них четырех различных антигенов. После выполнения дот-анализа 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. В результате исследования выявлена зависимость эффективности адсорбции белков от равномерности структуры поверхности бумаги, от органической составляющей и содержания в ней двуокиси титана, а также обработки материала коронным разрядом. Из исследованных доступных материалов наиболее пригодной для изготовления подложек белковых матриц признана 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. Этот материал в дальнейшем использовался при изготовлении матриц.

Отработка условий и технологических приёмов изготовления набора

Наиболее рациональным признан формат мультиплексного теста, позволяющий одновременно выполнять до 5 комплексных тестов. Блок белковых матриц в нём представлен гребнем с 5 зубцами, выполненным из синтетической бумаги. 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+), служащие для контроля работоспособности системы и уровня погружения матрицы в рабочие растворы. Нижний правый сегмент рабочей зоны оставляют свободным (K-) для контроля фоновых явлений. Чертёж с размерами блока матриц и схема нанесения антигенов на рабочую область иммуночипа приведены на рисунке 2.

Выкройка подложек матриц сложной конфигурации из прочной синтетической бумаги толщиной 0,5 мм оказалась непростой задачей. Для ее решения опробованы вырезка при помощи режущего плоттера, фрезерного станка и лазера, а также вырубка при помощи типографского пресса. В ходе испытаний с участием специалистов профильных организаций определено, что с точки зрения технологичности, чистоты материала и цены наиболее пригодным способом изготовления подложек белковых матриц является механическая вырубка при помощи типографского пресса.

Поверхности заготовок (подложек) матриц необходимо очистить от банальных загрязнений, способных влиять на уровни специфических и неспецифических сигналов, а также на воспроизводимость результатов анализа. Установлено, что эффективная

очистка синтетической бумаги может быть достигнута путем механической обработки в тёплом 0,2%-м растворе детергента 7X с последующим ополаскиванием или отмывкой в 3 сменах дистиллированной воды (по 10 мин) в ультразвуковой ванне.

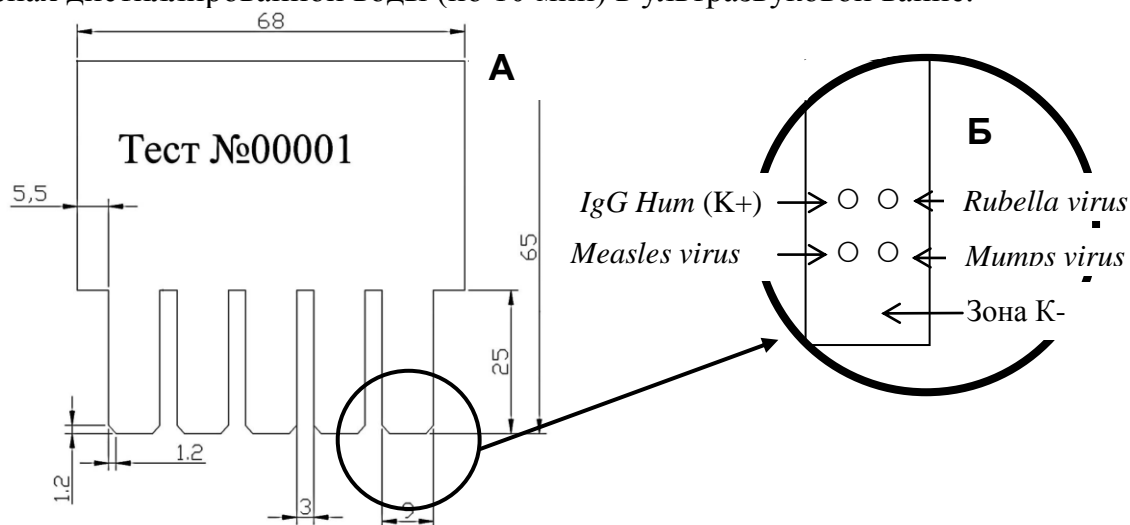


Рисунок 2 - Чертёж блока белковых матриц (А) и схема нанесения антигенов на рабочую область иммуночипа (Б)

При подборе условий иммобилизации антигенов вирусов краснухи, кори и паротита на подложках исследовали влияние концентрации антигенов в сорбционной смеси, состава и pH буферных растворов, а также условий инкубации сорбционной смеси на поверхности синтетической бумаги Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-482D8. Сравнивали 2 режима инкубации: сушка капель (объём 2,5 мкл) сорбционной смеси на воздухе при комнатной температуре и инкубация подложек с сорбционной смесью при 4 °С в течение 12 ч с последующей сушкой при 40 °С в течение 2 ч. Разведения антигенов выполняли на бидистиллированной воде и 0,01 М буферных растворах: На-карбонатно-бикарбонатном (КББ) и На-боратных (ББ). Эффективность иммобилизации оценивали по интенсивности окрашивания пятен антигенов после выполнения дот-иммуноанализа. Обобщённые результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Оценка условий иммобилизации антигенов на подложках из синтетической бумаги Pentaprint- M480/09-07/8101-482D8

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

Примечание: Числом крестов в ячейках таблицы обозначены относительные уровни оптических сигналов.

Оптимальные концентрации антигенов подбирали путём исследования серии 2-кратных разведений антигенов в различных буферных системах. За рабочее разведение принимали наибольшее разведение антигена, обеспечивающее максимальный визуальный сигнал с положительной сывороткой при отсутствии сигнала на отрицательном образце. Лучшие результаты получены при разведении антигенов на боратном буферном растворе, pH 6,0. Оптимальные диапазоны концентраций для антигена краснухи - 33,3-25,0 мкг/мл, для антигена паротита - 11,0–7,3 мкг/мл, для кори 32,0–21,0 мкг/мл.

Автоматическое нанесение иммунореагентов на подложки проводили с применением специально разработанного устройства «Диспенсер», обеспечивающего распечатку антигенов с производительностью 50 матриц в минуту. Учитывая значительные потери белка в этом устройстве, использовали концентрации антигенов, соответствующие максимальным значениям указанных выше диапазонов.

При подборе реагента, блокирующего свободные участки поверхности матрицы от неспецифического связывания компонентов из исследуемого образца и конъюгата непосредственно с материалом подложки, исследовали естественные и искусственные полимеры, наиболее часто (по данным литературы) употребляющиеся в этом качестве: бычий сывороточный альбумин (БСА), казеин, пептон, обезжиренное молоко, желатин и полиэтиленгликоли (ПЭГ) различной степени полимеризации. Матрицы инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч в 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 3.

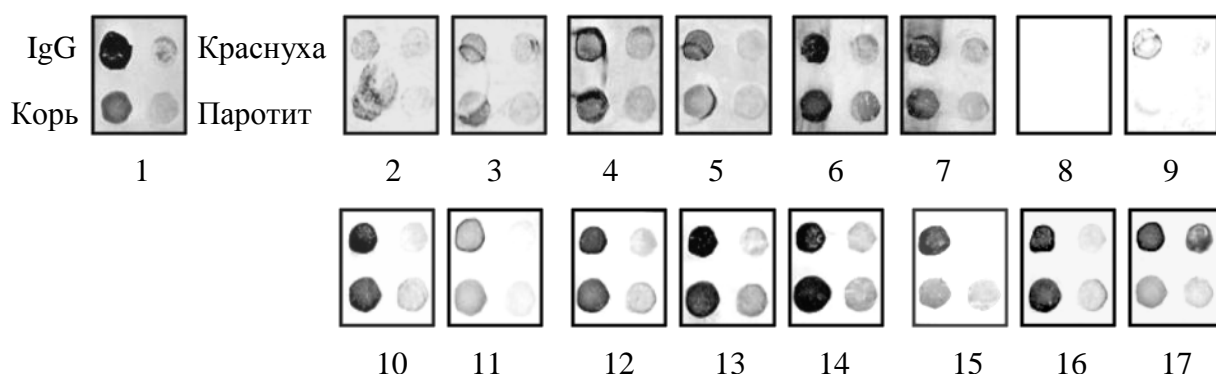


Рисунок 3 - Результаты экспериментов по блокированию матриц водными растворами, содержащими: (1) без блокирования; (2 и 3) 0,5 % и 0,25 % ПЭГ-6000; (4 и 5) 0,5 % и 0,25 % ПЭГ-20000; (6 и 7) 1 % и 0,5 % триптона (8 и 9) 2 % и 1 % БСА; (10 и 11) 2 % и 1 % желатина; (12, 13 и 14) 1 %, 0,5 % и 0,2 % обезжиренного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

Лучшие результаты получены с 0,2%-ми растворами обезжиренного молока и казеина, обеспечивающими чистый фон подложки и не вызывающими ослабление полезного сигнала (см. рисунок 3, примеры 14 и 17). Однако испытания матриц, обработанных 0,2%-м молоком, на большой панели сывороток показали, что в ряде случаев молоко, снижает оптический сигнал на антигене краснухи, приводя к ложноотрицательным результатам анализа. В связи с этим было решено в качестве блокирующего агента применять 0,2%-й раствор казеина.

Дот-иммуноанализ рационально выполнять в аналитических ваннах с ячейками, заполненными готовыми растворами. Нами разработано несколько конструкций таких ванн. На один из последних вариантов ванны, чертеж которой представлен на рисунке 4,

получен Патент РФ № 2517035. Этот вариант, в отличие от предыдущих версий, имеет ячейки, выполненные в виде вытянутого асимметричного шестиугольника, продольные углы которого служат направляющими при введении в ячейку иммуночипа и препятствуют контакту их поверхностей; а также сварной буртик, окантовывающий каждую ячейку и повышающий надёжность герметизации.

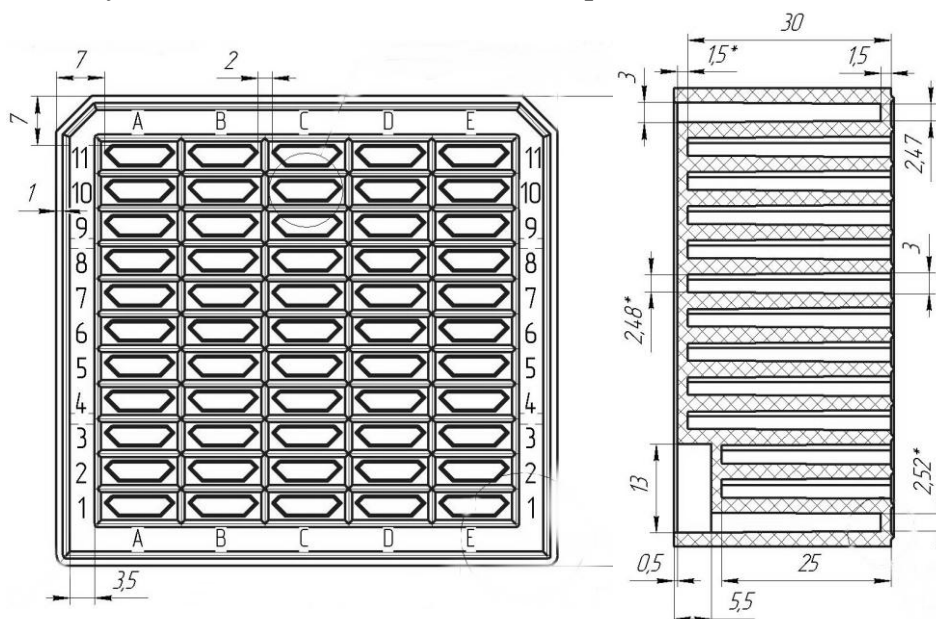


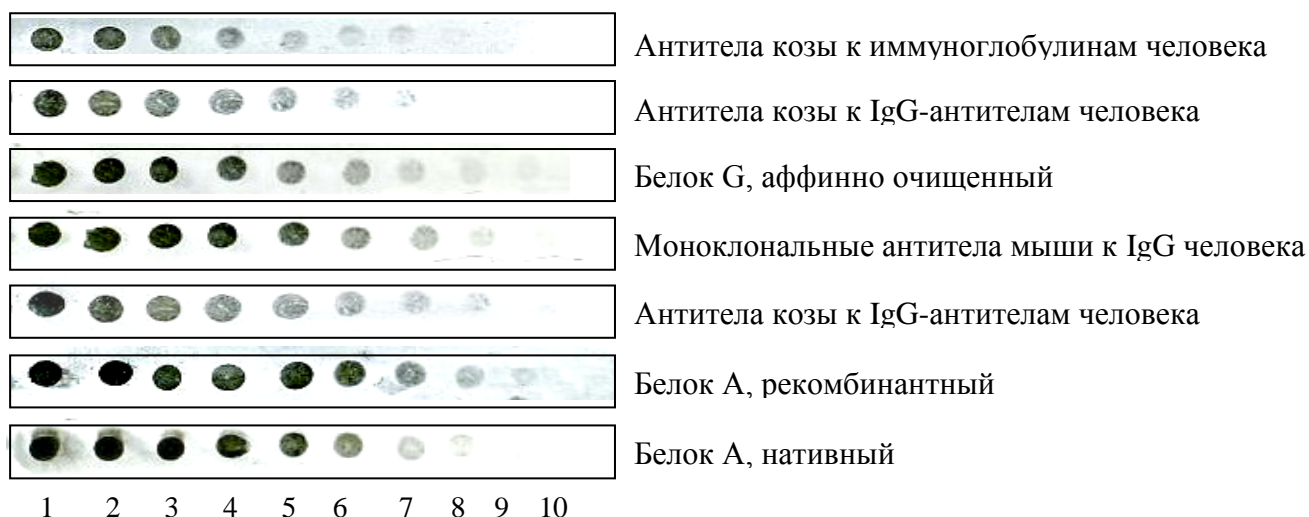
Рисунок 4 - Чертёж аналитической ванны

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 заполнения ячеек аналитической ванны. Устройство обеспечивает точность дозирования с погрешностью не более 10 % и производительность 1 ванна в минуту.

По окончании розлива аналитическая ванна должна быть запаяна герметизирующей плёнкой исключающей перетекание растворов между ячейками. При сравнительной оценке доступных герметизирующих материалов предпочтение отдано комбинированной упаковочной плёнке «Coflex», изготовленной на основе алюминиевой фольги и предназначенной для укупоривания полимерной тары, содержащей продукты с агрессивными свойствами. Герметизацию ванн этим материалом выполняли с помощью ручного термопресса при температуре пластичного накаливающегося элемента 170–220 °С и времени воздействия 5-6 с.

Отработка условий и методологии проведения мультиплексного анализа.

При выборе способа детекции иммунологического связывания в дот-иммуноанализе предпочтение отдано хромогенной системе с использованием коллоидного золота и усилением оптического сигнала физическим проявлением. Проведено сравнение иммунозоль золота, приготовленных с использованием разных вторичных иммунореагентов: антител против иммуноглобулинов человека, а также белков А и G *Staphylococcus aureus*. Основными критериями оценки служили лимит выявления антител в дот-анализе и срок пригодности рабочего разведения конъюгата. Результаты сравнительного анализа чувствительности дот-анализа с применением разных конъюгатов представлены на рисунке 5.



| № разведения | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------------------------|------|------|------|------|-----|-----|-----|----|----|----|
| Концентрация IgG, нг/мл | 4000 | 2000 | 1000 | 500 | 250 | 125 | 60 | 30 | 15 | 8 |
| Содержание IgG в пятне, пг | 8000 | 4000 | 2000 | 1000 | 500 | 250 | 125 | 60 | 30 | 15 |

Рисунок 5 - Результаты сравнительного определения чувствительности дот-иммуноанализа с использованием конъюгатов коллоидного золота (20 нм) со вторичными иммунореагентами. На стрипы из синтетической бумаги 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.

Из исследованных препаратов наиболее перспективными для использования в мультиплексном дот-иммуноанализе выглядят конъюгаты на основе стафилококковых протеинов А и G (лимит определения 30 пг IgG в пятне), а также моноклональных антител к иммуноглобулинам человека (лимит определения 60 пг IgG в пятне). 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.

Мультиплексный дот-анализ антител включает несколько стадий, его принципиальная схема приведена на рисунке 6.

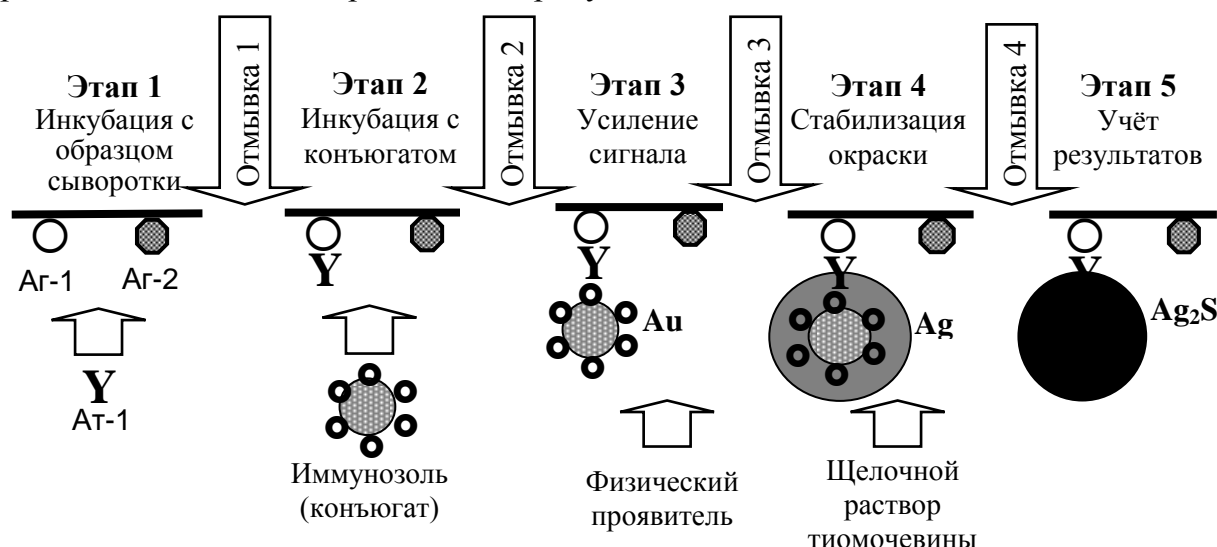


Рисунок 6 - Общая схема мультиплексного дот-иммуноанализа антител с применением иммунозоля золота, усилением сигнала физическим проявлением и стабилизацией окраски щелочным раствором тиомочевины

При оптимизации составов рабочих растворов 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.

Образцы сывороток могут содержать, способные спровоцировать ложноположительные результаты анализа. Для снижения возможности участия в иммунной реакции низкоаффинных антител применяли щелочной (pH 9,5–9,8) раствор для разведения сывороток (РБРС), в состав которого вводили 0,1 % детергента твин 20, а для предотвращения неспецифического связывания с блокирующим белком - 0,05 % (в/о) казеина. 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. В качестве консерванта растворов использовали азид натрия.

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.

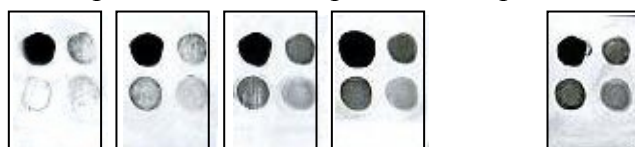
С целью создания оперативного и автономного теста нами были предприняты попытки сокращения времени инкубации с образцами и конъюгатом и оценки возможности выполнения анализа в условиях комнатной температуры (20 ± 3 °C).

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 7.

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.

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 составляет 8 мин.

Подбор экспозиции матрицы с сывороткой



10

15

20

25

25

Время инкубации, мин

(20 °C)

(37 °C)

Температура инкубации

Подбор экспозиции матрицы с иммунозолом



10

15

20

25

25

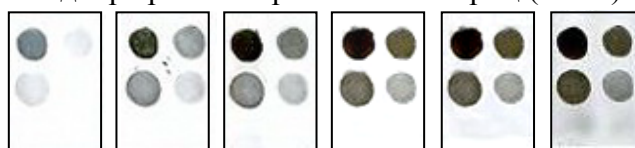
Время инкубации, мин

(20 °C)

(37 °C)

Температура инкубации

Подбор времени проявления матриц (20 °C)



4

5

6

7

8

10

Время проявления, мин

Рисунок 7 - Результаты экспериментов по подбору условий инкубации и проявления матриц при выполнении дот-иммуноанализа. Условия выполнения экспериментов описаны в тексте

Кратность и продолжительность отмывок должны быть подобраны так, чтобы максимально удалить не связавшиеся компоненты. 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.

Процедура мультиплексного анализа проста и выполняется в ячейках аналитической ванны. Сначала ряды ячеек ванны (по количеству анализов) вскрываются с помощью перфоратора. В ячейки первого ряда вносится анализируемый образец, а в ячейки 8 ряда – компоненты проявляющей системы. Затем иммуночипы последовательно инкубируют в ячейках модуля в соответствии с хронологической схемой анализа и после выемки из последней ячейки визуально учитывают результат по наличию или отсутствию темных пятен в местах нанесения на иммуночип иммунореагентов. 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). Разработана инструкция по применению набора.

В результате проведенных исследований разработан и запатентован (Патент РФ № 2495434) диагностический набор, позволяющий осуществлять мультиплексное выявление антител в препаратах крови к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита. Набор рассчитан на 20 мультиплексных анализов. Он включает: 4 блока белковых матриц, 4 аналитические ванны заполненные растворами и герметизированные фольгой, флакон с жидким компонентом проявляющей системы, перфоратор для вскрытия ячеек аналитической ванны, цветовую шкалу для количественной оценки результатов и инструкцию по применению набора. Его общий вид представлен на рисунке 8.



Рисунок 8 - Общий вид набора для мультиплексного выявления антител к возбудителям ДВВИ

Лабораторные испытания экспериментальных образцов набора.

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 мультиплексного дот-иммуноанализа проводили на донорских сыворотках, предоставленных ЗАО «ИмДи», а оценку лимита определения – на серии калибровочных образцов из соответствующих ИФА-тест-систем производства «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. Результаты сравнительного исследования в обобщённом виде представлены – в таблице 4.

Таблица 4 - Обобщённые данные, полученные при определении антител класса G к вирусам кори, паротита и краснухи в образцах донорских 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

Использованные наборы по-разному классифицируют на положительные и отрицательные некоторые образцы сывороток. В основном это относится к образцам с низким содержанием определяемых антител. На иммуночипах оптические сигналы ниже 10 % не различаются 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 45 сыворотках, такими сигналами обладают 14, из которых 8 определяются положительными (см. таблицу 4). 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 величины оптических сигналов приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Коэффициенты корреляции данных, 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 оптических сигналов, полученных с применением иммуночипов, и ОП, 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, для кори – от 0,15 до 0,5 МЕ/мл. Вероятно, такая неоднозначность связана с различиями подходов 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 ниже в таблице 6, а вид иммуночипов после калибровки показан на рисунке 9. 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 6 жирным шрифтом.

Таблица 6 – Результаты калибровочных образцов с применением соответствующих тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» и иммуночипов.

| 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: 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.

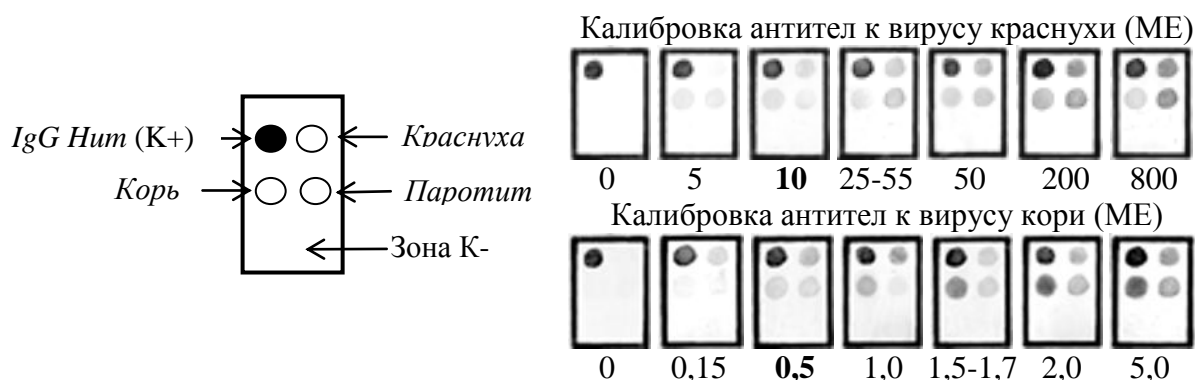


Рисунок 9 – Результаты анализа калибровочных образцов с разным содержанием антител к вирусам краснухи и кори. Слева приведена схема размещения антигенов на матрице

На иммуночипах оптические сигналы от сывороток с протективными уровнями антител, выглядят как отчётливо различимые невооружённым глазом тёмные пятна в местах нанесения соответствующих антигенов. 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.

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, 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. 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.

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 обладает следующими достоинствами:

- 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 контроли;
- позволяет визуальный учёт результатов;
- прост в использовании и не требует особой квалификации оператора;
- 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.

ВЫВОДЫ

Выполнены исследования по разработке диагностического набора для выявления антител к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита методом мультиплексного дот-анализа в результате чего:

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 вырубki 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные статьи:

1. Полтавченко А.Г., **Ерш А.В.**, Пьянков С.А., Никонов А.М., Волков Г.Н., Кривенчук Н.А. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Инструментальный учет результатов анализа // *Биотехнология*. – 2013. - № 4. – С. 74-82.
2. Бессмельцев В.П., Горяев Е. П., Ралдугин А.Н., Слугин В.А., Кривенчук Н.А., Полтавченко А.Г., **Ерш А.В.**, Филатов П.В., Снопков В.П. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Устройство для автоматического заполнения аналитических ванн // *Биотехнология*. - 2014. - №4. - С. 88-96.
3. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А., Буторин Д.В. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям // *Вопр. вирусол.* – 2015. - № 1. - С. 45-49.
4. **Ersh A.V.**, Poltavchenko A.G., Nikonov A.M. Multiplex malattie infettive immunodiagnostiche // *Italian Science Review*. – 2014. – 9(18). - P. 12-17. Available at URL: <http://www.ias-journal.org/archive/2014/september/Ersh.pdf>.
5. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г. Выбор формата и материала для изготовления подложки белковых чипов // *Международный Научный Институт Educatio*. – 2014. - № 3. – С. 16-19.

Патенты:

1. Полтавченко А.Г., Кривенчук Н.А., **Ерш А.В.**, Агафонов А.П., Сергеев А.Н. «Набор для многопрофильного иммунологического анализа антител в препаратах крови» // Патент РФ № 2495434, приоритет от 09.12.2011. Оpubл. 10.10.2013. Бюл. № 28.
2. Полтавченко А.Г., Кривенчук Н.А., **Ерш А.В.**, Снопков В.П., Филатов П.В., Буторин Д.В. «Ванна для выполнения мультиплексного дот-иммуноанализа» // Патент РФ № 2517035, приоритет от 13.02.2013. Оpubл. 27.05.2014. Бюл. № 15.

Тезисы конференций:

1. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А. Мультиплексная оценка поствакцинального иммунитета к детским вирусным инфекциям. – В сб. мат. 2-ой междунар. конф. «Астана – БИОТЕХ 2011» (Астана, 10-11 октября 2011 г). – Астана: НЦБ РК. – 2011. - С. 35.
2. Полтавченко А.Г., **Ерш А.В.**, Кривенчук Н.А. Многопрофильная иммунодиагностика перинатального периода. – В сб. мат. 2-ой междунар. конф. «Астана – БИОТЕХ 2011» (Астана, 10-11 октября 2011 г). – Астана: НЦБ РК. – 2011. - С. 64.
3. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г., Никонов А.М., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А. Мультиплексная оценка поствакцинального иммунитета к детским вирусным инфекциям. – В сб. научн. тр. по мат. междунар. научн.-практич. конф. «Актуальные проблемы науки» (Тамбов, 27 сентября 2011 г), ч. 1. – Тамбов: ТРОО «Бизнес-Наука-Общество». – 2011. - С. 61-62.
4. Полтавченко А.Г., **Ерш А.В.**, Никонов А.М., Кривенчук Н.А. Многопрофильная иммунодиагностика инфекционных заболеваний. – В сб. научн. тр. по мат. междунар. научн.-практич. конф. «Актуальные проблемы науки» (Тамбов, 27 сентября 2011 г), ч. 1. – Тамбов: ТРОО «Бизнес-Наука-Общество». – 2011. - С. 104-106.
5. Полтавченко А.Г., **Ерш А.В.** Многопрофильная иммунохимическая индикация возбудителей инфекционных заболеваний. – В сб. тр. по мат. юбилейной всероссийской научной конференции «Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека» (С.-Петербург, 19-20 апреля 2012 г.).- СПб. – 2012, С. 119.

6. Полтавченко А.Г., **Ерш А.В.**, Пьянков С.А., Кривенчук Н.А., Буторин Д.В., Филатов П.В. Комплексная иммунодиагностика инфекционных заболеваний. – В сб. Материалов международного Форума «Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Высокотехнологичная медицина как элемент инновационной экономики» (Новосибирск, 22-23 марта 2013 г.) // под ред. М.А. Садового и Е.В. Мамоновой. – Новосибирск: ТД «Сибирский», 2013. – С. 241-247.

7. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г., Кривенчук Н.А. Новации в иммунодиагностике инфекционных заболеваний. - В сб. научн. тр. по мат. II междунар. научн. интернет-конф. «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 26 - 27 марта 2013 г.) / Сервис виртуальных конференций Raх Grid ; сост. Синяев Д. Н. - Казань : ИП Синяев Д. Н. , 2013.- 434 с.

8. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г., Пьянков С.А., Никонов А.М. Комплексная серологическая оценка поствакцинального иммунитета. - В сб. тр. по мат. научн.-практич. конф. «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, 26-28 сентября 2013 г.), – Новосибирск: Издательство «АРЕАЛ». – 2013. - С. 179-181.

9. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г., Кривенчук Н.А. Мультиплексная иммунодиагностика детских вакциноуправляемых вирусных инфекций - В сб. научн. тр. по мат. 4 междунар. научн. интернет- конф. «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 16 - 17 октября 2013 г.) / Сервис виртуальных конференций Raх Grid ; сост. Синяев Д. Н. - Казань : ИП Синяев Д. Н., 2013.- Т. 1. - С. 85-88

10. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г., Никонов А.М., Кривенчук Н.А. Комплексная иммунодиагностика инфекционных заболеваний. – В сб. тр. по мат. II междунар. научн.-практич. конф. «Модернизация аграрного образования: интеграция науки и практики» (Томск, 21-25 октября 2014 г.), - Новосибирск: изд-во НГАУ, 2014. – С. 88-90.

11. Филатов П.В., Полтавченко А.Г., Корнеев Д.В., **Ерш А.В.**, Сергеева Е.А., Никонов А.М. Выбор материала для изготовления подложки белковых чипов. – В сб. научн.-техн. тр. по мат. конф. «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (Кемерово, 15-16 декабря 2014 г.), - Кемерово. – 2014, С. 170-174.

12. **Ерш А.В.**, Полтавченко А.Г., Никонов А.М. Мультиплексная диагностика инфекционных патогенов. – В сб. тр. по мат. VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (Ставрополь, 22-24 октября 2014 г.). - Ставрополь. – 2014. - С. 119-120.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Аг – антиген
Ат – антитело
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ДВВИ – детские вакциноуправляемые вирусные инфекции
ИФА – иммуноферментный анализ
К+ – положительный контроль
К- – отрицательный контроль
КББ – карбонатно-бикарбонатный буферный раствор
Ккорр. – коэффициент корреляции
ОП – оптическая плотность
ОПкрит – 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
ЭП – эпидемический паротит