

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗ

В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный
центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

**МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗ
В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Монография

Монография напечатана при поддержке ООО «ИМБИАН ЛАБ»

Чебоксары
Издательский дом «Среда»
2022

УДК 616.9
ББК 51.9
М90

Рецензенты:

д-р биол. наук, профессор НИИ биохимии Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины

А. Б. Беклемишев;

д-р мед. наук, профессор ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»

Г. М. Игнатъев

М90 Мультиплексный дот-иммуноанализ в диагностике инфекционных заболеваний : монография / А. Г. Полтавченко, А. В. Ерш, П. В. Филатов, Н. Д. Ушкаленко; Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»; отв. ред. А. Г. Полтавченко. – Чебоксары: Среда, 2022. – 224 с.

ISBN 978-5-907561-57-1

Монография подготовлена специалистами лаборатории иммунохимической диагностики Федерального бюджетного учреждения «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» и посвящена вопросам создания мультиплексных тестов для диагностики инфекционных заболеваний. В работе приведены теоретические основы и истоки мультиплексного иммунохимического тестирования, а также обобщены литературные данные и собственный опыт авторов по созданию автономных мультиплексных тестов, сочетающих в себе преимущества мультиплексирования с простотой изготовления и применения диагностических наборов. Эти наборы основаны на применении плоских белковых матриц с низкой плотностью нанесения иммунореагентов захвата и дот-иммуноанализа с использованием конъюгатов на основе коллоидного золота и усилением оптического сигнала физическим проявлением.

Монография содержит подробные описания каждой стадии работы по созданию мультиплексных тестов от подбора иммунореагентов и материала подложек до выбора и реализации системы детекции иммунологического связывания и учета результатов анализа, а также справочные материалы, полезные при решении различных рабочих ситуаций. Приведен перечень основных проблем, возникающих при разработке мультиплексных наборов и их внедрению на диагностический рынок.

Монография рассчитана на широкий круг специалистов, занимающихся лабораторной диагностикой, а также разработкой и производством диагностических систем. Работа может быть полезна для аспирантов и студентов, специализирующихся в области биотехнологии.

Работа проводилась при выполнении Государственного задания по тематике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

© Полтавченко А. Г., Ерш А. В., Филатов П. В.,
Ушкаленко Н. Д., 2022

DOI 10.31483/a-104421

ISBN 978-5-907561-57-1

© ИД «Среда», оформление, 2022

Содержание

Введение	5
Теоретическая часть	10
Предпосылки появления мультиплексных тестов	10
Типы и форматы мультиплексных тестов	13
Типы образцов для иммунохимического анализа	19
Реагенты, используемые в иммуноанализе	21
Подложки	31
Способы распределения реагентов захвата на подложке	34
Контактная печать	35
Бесконтактная печать	39
Условия иммобилизации реагентов захвата на подложке	45
Системы детекции	54
Применение простых быстрых тестов	61
Проблемы создания мультиплексных тестов	66
Собственные разработки	69
Выбор концепции набора для автономного мультиплексного анализа	69
Изготовление белковых матриц	70
Выбор материала подложки	71
Предварительная подготовка материала подложек	79
Выкройка заготовок матриц	80
Отмывка поверхности заготовок	89
Сушка и хранение подготовленных подложек	90
Распределение реагентов захвата на подложке	90
Подбор иммунореагентов захвата и условий их иммобилизации на подложке	97
Блокирование и стабилизация матриц	102
Изготовление аналитических ванн	104
Отработка конструкции аналитической ванны	104

Устройство для автоматического заполнения ванн	109
Герметизация аналитических ванн	112
Выбор и реализация системы детекции иммунологического связывания.....	113
Приготовление коллоидного золота и конъюгатов на его основе ..	117
Получение коллоидного золота	118
Приготовление комплексов золя с белком.....	121
Проявление золотых конъюгатов	126
Материальные затраты	129
Оптимизация условий применения набора.....	132
Растворы	133
Экспозиции	135
Регистрация результатов	138
Испытания мультиплексных тестов.....	140
Набор для комплексного выявления антител к возбудителям TORCH-инфекций и инфекций мочеполовой сферы	142
Набор для комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям	148
Набор для комплексного выявления антител к возбудителям гемотрансмиссивных инфекций (ГТИ)	155
Набор для комплексного выявления директивных маркеров возбудителей гемотрансмиссивных инфекций	171
Мультиплексный анализ возбудителей инфекционных заболеваний.....	173
Мультипараметрический тест для комплексного выявления антител к отдельным антигенам вируса гепатита С (HCV).....	176
Набор для мультипараметрического выявления маркеров лихорадки денге на всех стадиях заболевания.....	178
Набор для ускоренного выявления ортопоксвирусов	180
Заключение	187
Список литературы.....	193
Обозначения и сокращения	222

Введение

В природе существует огромное разнообразие микроорганизмов – вирусов, бактерий и грибов, вызывающих заболевания человека, растений и животных. По оценкам экспертов, нам известно не более долей процента существующих вирусов, несколько процентов микробов (*Шевченко, 2002*). Мир возбудителей инфекционных заболеваний сложен, динамичен и постоянно эволюционирует. Природа постоянно создает новые патогены – так называемые «возникающие инфекции», – и этот потенциал неисчерпаем. Человечество со времени своего возникновения находится в состоянии биологической войны с микроорганизмами (*Сандахчиев и др., 2002*). В мире ежегодно регистрируются сотни миллионов случаев инфекционных заболеваний, которые поражают детей и взрослых не только в слаборазвитых или развивающихся странах, но и в странах с высоким уровнем жизни.

Около 70% всех регистрируемых болезней человека имеют инфекционную этиологию (*Воробьев, 2002*). По данным ВОЗ за 2019 г. на инфекционные заболевания пришлось 26% от всех случаев смерти, зарегистрированных в мире (*ВОЗ. 10 ведущих причин смерти в мире*).

В 2020 году в Российской Федерации зарегистрировано 37 млн 507 тыс. 161 случай инфекционных и паразитарных заболеваний. По ориентировочным расчетам, экономический ущерб только от 35 впервые выявленных в 2020 году случаев инфекционных заболеваний составил почти 695 млрд рублей, экономический ущерб с учетом прямых потерь от ранее диагностированных хронических инфекций, имеющих важное социальное значение, составил 828,6 млрд руб., а с учетом прямых и косвенных экономических затрат – более 996,3 млрд руб. (*Государственный доклад, 2021 г.*).

Особенность инфекционных болезней заключается в том, что они могут передаваться от больного к здоровому человеку, имеют скрытый период заболевания, в течение которого носитель инфекции может заразить широкий круг контактных лиц, оказаться в другом городе или другом государстве, где и будет обнаружена вспышка заболевания. Контроль потенциальных пандемий становится все более и более трудным при сегодняшних глобальных моделях миграции. За последние годы неожиданные вспышки относительно новых или ранее редких заболеваний заставляли врасплох

жителей каждого из континентов планеты (Шевченко, 2002; Щербаков Г.Я.). В последние годы большой потенциальной угрозой национальной безопасности любой страны считается возможность преднамеренного использования террористами природных или искусственно созданных биологических агентов для поражения людей, животных, растений и других объектов (Воробьев, 2002; Park, 2002; Conroy J., 2006; Wallin et al., 2007). Непредсказуемость биотеррористических атак по времени, объекту, мотивам, используемому поражающему агенту и масштабам последствий обуславливают особую сложность этой проблемы (Шевченко, 2002; Park, 2003; Ler et al., 2006; Wallin et al., 2007). Существующие национальные системы эпидемиологического надзора и борьбы с инфекционными болезнями должны быть способны локализовать и ликвидировать вспышку инфекционного заболевания, независимо от того, является ли она следствием естественного проявления или результатом преднамеренного использования микроорганизмов (Сандахчиев и др., 2002), а эффективная изоляция и ликвидация болезни требует быстрого распознавания инфекционного начала.

Одним из наиболее быстрых и надежных способов диагностики инфекционных заболеваний являются иммунохимический анализ, клинических образцов на содержание маркеров (антигенов или антител) характерных для отдельных инфекций (Hu and Hirshfield, 2005; Park, 2006). Иммунохимический анализ – это применение реакции антигена с антителом для определения наличия или концентрации одного из этих иммунореагентов в растворе. Диагноз инфекционного заболевания может быть поставлен на основании выявления в клиническом материале инфекционных агентов или их антигенов с использованием в качестве зонда специфических антител. Другим диагностическим подходом является выявление реакции организма на патоген – определение наличия специфических антител в сыворотке крови с использованием известных антигенов.

Популярность иммунохимических тестов объясняется возможностью проведения анализа непосредственно клинического образца без его дополнительной длительной подготовки или обогащения; быстротой получения ответа; относительной простотой, малой трудоемкостью и стоимостью, по сравнению с методами выделения и идентификации возбудителя в чувствительной биологи-

ческой системе или диагностики с помощью сложных аппаратурных процедур (*Kricka, 1993; Park, 2006; Reta et al, 2020*). К настоящему времени арсенал иммунохимических тестов представлен большим разнообразием методик и их вариантов от простейшей реакции агглютинации в пробирке до сложных процедур, основанных на электрофоретическом разделении исследуемой пробы или использовании дорогих маркеров и сложного оборудования. Они ранжируются от простых (*point-of-care*) тестов для использования в полевых условиях или врачебном кабинете до сложных клинических анализов, выполняющихся с использованием высокопроизводительных устройств и робототехники в специализированных лабораториях крупных клиник и банков крови (*Herzog, 2006; Stewart et al., 2006*). С бумом научной технологии и глобального мониторинга заболеваний, разработка иммунологических тестов стала быстро развивающейся областью (*Butler, 2000; Park., 2006*). Однако не все академические разработки пока находят применение для диагностических целей. Практические диагностические службы могут опираться на такие методы, которые обладают высокими показателями чувствительности и специфичности, не требуют уникального оборудования, регулярно воспроизводимы, позволяют оперативно исследовать большое число проб, обеспечены качественными реагентами и доступны по цене (*Park, 2006; Stewart et al., 2006*).

В настоящее время серологическое обследование обычно проводится с помощью моноспецифичных (предназначенных для выявления 1–2 маркеров одной инфекции) тест-систем для иммуноферментного анализа (ИФА). Однако, при обследовании пациента нередко возникает необходимость выявления маркеров нескольких заболеваний. Такая потребность возникает при смешанных инфекциях, когда организм поражается сразу несколькими возбудителями, а также при дифференциации заболеваний, имеющих сходную клиническую картину. Кроме того, ряд программ борьбы с отдельными группами инфекционных заболеваний (гемотрансмиссивные, вакциноуправляемые, перинатальные, передаваемые половым путем и др.) включают в себя обследование широких контингентов населения на наличие определенных наборов маркеров инфекций. В таких случаях комплексное обследование с применением моноспецифичных систем предполагает выполнение не-

скольких иммунологических тестов и представляет собой длительную и дорогостоящую процедуру. Кроме того не все медицинские учреждения располагают условиями для реализации ИФА, поэтому такие анализы выполняются в основном в диагностических лабораториях при крупных медицинских учреждениях, а оперативная доставка образцов в такие лаборатории из отдалённых населённых пунктов часто является трудной задачей. Существует проблема диагностики инфекций на местах, в частности, при оказании экстренной хирургической и акушерской помощи, когда врачу необходимо выявить инфекционную угрозу персоналу и окружению, но на лабораторный анализ нет времени. Для таких случаев могут быть особо востребованы недорогие и простые в исполнении мультиплексные тест-системы, позволяющие оперативно проводить комплексное серологическое обследование пациентов, в том числе и в условиях слабо оснащенных медицинских пунктов. Такой подход позволит сделать обследование более доступным, массовым, своевременным и эффективным.

Мультиплексная иммунодиагностика – молодое направление, предполагающее использование так называемых «белковых матриц» (protein arrays) или «иммуночипов», позволяющих одновременно определять в исследуемом образце множество различных аналитов (*Haab et al., 2001*). Первые упоминания в литературе мультиплексного иммуноанализа относятся к началу 90-х годов прошлого века (*Ekins et al., 1991*), а повышение интереса к белковым матрицам на рубеже третьего тысячелетия обусловлено сочетанием последних достижений в областях протеомики, робототехники, микроэлектроники и биоинформатики (*Cahill, 2001*). Началу исследований в области белковых микроматриц способствовали успехи в создании матриц на основе ДНК, обеспечившие платформы и инструменты для работ в этом направлении (*Alexandre et al., 2001; Wilson et al., 2003*). Технология белковых матриц намного сложнее, чем технология ДНК-биочипов из-за огромного биохимического, структурного и конформационного разнообразия белков, а также широкого диапазона концентраций белков в реальных образцах (*Zhu et al., 2003; Espina et al., 2004; Cretich et al., 2006; Walton and Jayaraman, 2009; Sinclair, 2013; Ruwona et al., 2014*). Решение существующих проблем и применение такой технологии мо-

жет заменить целые иммунологические лаборатории, дать возможность во много раз увеличить производительность большинства диагностических методов и резко снизить себестоимость анализов (*Bastarache et al., 2011, Tighe et al., 2015*).

Мультиплексные анализы требуют меньше времени, реагентов и объема образца, они более информативны и экономически эффективны, по сравнению с моноспецифичными тестами. За последние 20 лет опубликовано большое число работ, посвященных разным вопросам изготовления и применения белковых матриц, в том числе ряд обзоров по этой тематике (*Templin et al., 2002; Wilson et al., 2003; Zhu et al., 2003; Espina et al., 2004; Lueking et al., 2005; Tomizaki et al., 2005; Cretich et al., 2006; Kingsmore, 2006; Andresen and Bier, 2009; Aslam et al., 2017; Hadd et al., 2013; Sinclair, 2013; Duarte and Blackburn, 2017; Van Gool et al., 2020*). Однако, несмотря на очевидные преимущества, иммуночипы не смогли пока радикально изменить диагностику, поскольку технические и эксплуатационные проблемы, препятствуют их реализации в клинических условиях (*Tighe et al., 2015*).

В настоящей работе приведены литературные данные и обобщен опыт создания автономных наборов для мультиплексной диагностики, сочетающих в себе преимущества мультиплексирования с простотой изготовления и применения тестов. Эти наборы основаны на дот-иммуноанализе с применением конъюгатов на основе коллоидного золота, но использованные в них принципы и методические приемы во многом применимы и к другим системам меченых детекторных иммунореагентов (с учетом особенностей меток). В работе описаны принципы и подходы к конструированию наборов для выявления инфекций, однако подобные наборы могут быть созданы также для диагностики паразитарных инвазий, аллергических, гормональных и других заболеваний.

Теоретическая часть

Предпосылки появления мультиплексных тестов

Разнообразие свойств белков служит молекулярной основой их перекрестной реактивности и вызывает необходимость тщательного подбора компонентов тест-системы и условий проведения анализа в каждом конкретном случае (*Ellington et al., 2010; Gaster et al., 2011*). Требованиями индивидуального подхода к определению отдельных маркеров, в основном, объясняется превалирование на диагностическом рынке моноспецифичных (позволяющих выявлять одиночные маркеры) тест-систем. Успехи молекулярной биологии сделали возможной масштабную наработку высокоспецифичных синтетических и рекомбинантных, в том числе гибридных (химерных) антигенов, а также моноклональных антител, которые способны в значительном мере снизить перекрестную реактивность и с каждым годом все шире внедряются в практику иммуноанализа (*ВОЗ. Доклад № 784, 1991; Sola et al. 2013*). Разработка эффективных способов получения, выделения и очистки таких иммунореагентов позволяют в значительной степени унифицировать условия их применения и сделать возможным совместное использование в мультиплексном анализе.

Фундаментальные принципы создания миниатюрных и параллельных микроспот-лиганд-связывающих анализов были описаны на рубеже веков R. Ekins с коллегами в «Теории окружающего анализа» (*Ekins, 1998; Ekins and Chu, 2001*). Эта теория объясняет, почему микроспот (микродот) анализы могут быть более чувствительными, чем любые другие тесты, связывающие лиганд. На рисунке 1 приведена иллюстрация принципа миниатюрных связывающих анализов.

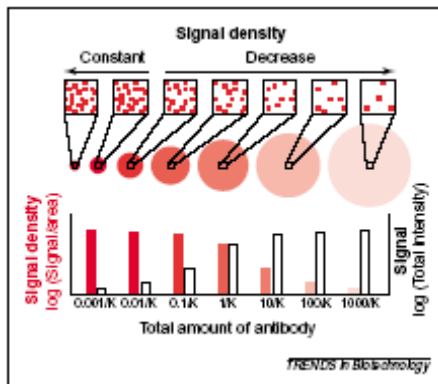


Рис. 1. Сигнал и плотность сигнала в микропятнах. Молекулы захвата иммобилизованы с одинаковой поверхностной плотностью на всех пятнах. Общий сигнал увеличивается с увеличением количества молекул захвата при возрастающем размере пятна. Когда из раствора связывается большинство анализов, сигнал достигает максимума. Контрастность и плотность сигнала (signal/area) увеличиваются с уменьшением общего количества молекул захвата (уменьшение размера пятна), достигая постоянного уровня, когда концентрация молекул захвата $< 0.1/K$ (K – константа ассоциации). В этих условиях, концентрация аналита в растворе минимально изменяется от количества фиксируемого аналита на микропятне (*приведено из Ekins, 1991*).

Молекулы захвата иммобилизованы на твердой фазе только в очень малой области – микропятне. В течение анализа, целевые молекулы (аналиты) фиксируются на пятне и, хотя количество молекул аналита в пробе небольшое, в зоне пятна может быть получена их высокая плотность. При этом процесс захвата не изменяет значительно концентрацию целевых молекул в образце, даже для аналитов представленных в низкой концентрации и для высоко аффинных реакций связывания. Это позволяет проводить измерения, в которых количество аналита, захваченного из раствора, прямо отражает его концентрацию в образце. Интересно, что измерение концентрации аналита в таких условиях делает систему независимой от фактического объема используемого образца, и это может в результате совместить высокую чувствительность с низким потреблением образца.

Повышение чувствительности может быть следствием двух причин. Во-первых – реакция связывания все время проводится в условиях наиболее высокой для данного образца концентрации аналита. Во-вторых – комплексы «аналит – молекулы захвата» сосредоточены только в малой области микропятна, формируя высокий местный сигнал. На рисунке 1 молекулы захвата иммобилизованы при постоянной поверхностной концентрации на пятнах с возрастающими размерами. С увеличением размера пятна, общая сумма захваченных молекул, представленных в анализе, возрастает, что делает более высоким суммарный сигнал, полученный из пятна. Плотность сигнала, однако, начинает уменьшаться с увеличением размера пятна, потому что количество аналита становится фактором ограничения. Процесс захвата ведет к значительному сокращению концентрации аналита в растворе и, в то же время, комплексы распределяются по большей области. В результате интенсивность сигнала, который может быть получен на каждом пятне, уменьшается. Уменьшение размера пятна уменьшает общий сигнал на микропятне, но плотность сигнала увеличивается.

При определенном размере пятна плотность сигнала приближается к оптимальной и останется приблизительно постоянной при дальнейшем уменьшении размера пятна. В то же время, в крупных пятнах при уменьшении фракции реагентов захвата, связанных с аналитом, свободные реагенты могут связываться с другими (неспецифическими) белками, увеличивая уровень фона. Следовательно, самые высокие интенсивности сигнала и оптимальные отношения сигнал/шум могут быть достигнуты в маленьких пятнах, а система, которая использует малое количество молекул захвата и малое количество образца, может быть более чувствительна, чем система, которая использует в сотни раз большее количество материала. Так, исследователи из фирмы Boehringer Mannheim заявили, что им в своих экспериментах удавалось обнаруживать 0.01 меченой молекулы/мкм², подразумевая, что лимит обнаружения, достигнутый с использованием анализа на микроматрицах, составляет приблизительно 10^{-17} моль/л (то есть, 10^3 – 10^4 молекул/мл) (Templin, 2002). Понятно, что если область микропятна будет уменьшена до нуля, сигнала не будет (кроме инструментального «фона») и система будет полностью нечувствительна. На практике,

когда число индивидуальных событий (например, фотонов), выявляемое инструментом детекции, мало, вступают в действие другие статистические эффекты, препятствуя регистрации сенсорных антител ниже определенного предела. Дополнительным ограничением является число молекул аналита, захваченных антителами в пределах области микропятна, которое (если чрезвычайно мало) также может служить причиной статистических вариаций в измеряемом сигнале. Следовательно, чрезмерная миниатюризация системы может уменьшать чувствительность (*Ekins, 1991*).

Типы и форматы мультиплексных тестов

Основой мультиплексных тестов служат белковые матрицы – твердая фаза с иммобилизованными реагентами захвата. Если матрица содержит набор различных антител (матрица антител), она используется для выявления соответствующих антигенов. И наоборот, если матрица изготовлена с использованием различных антигенов (матрица антигенов), она используется для определения в образце спектра соответствующих антител. Белковые матрицы (часто их называют «белковыми чипами» или «иммуночипами») могут иметь различные функции, дизайн и методологию их создания.

По предназначению матрицы могут быть функциональными и аналитическими (*Zhu H. et al., 2003*). Функциональные белковые матрицы применяются, например, при определении функций белков в фундаментальных исследованиях. На таких матрицах иммобилизуют большой набор очищенных белков или пептидов. Затем матрица используется для параллельного скрининга диапазона биохимических взаимодействий (*Blackburn et al., 2005; Qin et al., 2010*). Функциональные белковые матрицы могут использоваться, например, для изучения действия ингибиторов на активность фермента (*Dietrich et al., 2004; Zhu et al., 2003*), взаимодействий белка с лекарствами и гормонами (*Kim et al., 2005; Lee et al., 2005*), или в исследованиях по картированию эпитопов (*Chiari et al., 2005; Shreffler et al., 2005*).

На подложке аналитических белковых матриц распределены и иммобилизованы специфические реагенты (антигены или антитела). Такие матрицы используются для определения присутствия белков в сложной смеси, например в сыворотке крови (*Combare et al., 2005; Hamelinck et al., 2005; Papp et al., 2008, 2012*). Аналитические матрицы могут использоваться для обнаружения антител

при диагностике инфекционных заболеваний (*Bischoff and Luidier, 2004; Xu et al., 2007; Lochhead et al., 2011; Stafford and Johnston, 2011; Talha et al., 2016; Engin, 2019*), аллергии (*Bacarese-Hamilton et al., 2005*), аутоиммунных заболеваний (*Hueber et al., 2005*) или контроля экспрессии разнообразных белков (*Kopf et al., 2005*). По существу, аналитические матрицы позволяют реализовать мультиплексный вариант сэндвич-иммуноанализа, где один специфический реагент (реагент захвата) иммобилизован на твердой фазе и позволяет выделить из сложной смеси анализируемое вещество, а второй специфический компонент, связанный с легко выявляемой меткой, используется для детекции выделенного анализа (*Nielsen et al., 2004*).

В зависимости от вида иммобилизованного на твердой фазе компонента, аналитические матрицы могут быть матрицами антител (antibody array) и матрицами антигенов (antigen array) (*Cahill, 2001*). Первые используются для выявления спектра антигенов, а вторые, соответственно, для выявления спектра антител.

Известно три основных формата аналитических матриц: суспензионные (bead protein array), объемные (three-dimensional protein arrays (3D)) и плоские (two-dimensional protein arrays (2D)) (*Cretich et al., 2006*).

Суспензионные матрицы изготавливают путём иммобилизации агентов захвата на наборе шариков, содержащих флуоресцентную метку. Каждому агенту захвата, иммобилизованному на шарике, соответствует определённая флуоресцентная метка. Для выполнения мультиплексного анализа смешивают различные наборы шариков. Смесь шариков инкубируют с образцом, а затем с коктейлем флуоресцентно меченых антител. В результате аналит связывается как с шариками, так и с мечеными антителами и приобретает определенный спектр эмиссии, который регистрируется специальным прибором. Учет производят по количеству шариков, содержащих одновременно внутреннюю флуоресцентную метку шариков и флуоресцентную метку связанных за счет иммунного взаимодействия антител. Существуют поставщики полностью разработанных тестов подобного рода (например, Luminex, Bender Med Systems, Biorad, Biosource, Linco, Miraibio, Qiagen, Upstate и BD Biosciences и др.). Кроме того, доступны реагенты и наборы шариков, свобод-

ные от агентов захвата, пригодные для самостоятельного изготовления необходимого теста (например, Luminox, Miraibio и Qiagen) (Witte and Nock, 2004).

Пользователь имеет возможность смешивать шарики в произвольном сочетании, поэтому анализ обладает высоким уровнем гибкости в числе и виде специфичностей. Окончательный уровень мультиплексирования ограничен числом доступных наборов шариков. Хотя изготовители заявляют, что возможен анализ с 50–100 специфичностями, большинство публикаций описывают тесты, ограниченные 10–15 аналитами (Pla-Roca et al., 2012). Исследования с использованием суспензионных матриц, могут выполняться в 96-ячеечных планшетах с одним мультиплексным тестом на ячейку, таким образом, их производительность способна превышать производительность плоских белковых микроматриц (Witte and Nock, 2004, Tighe et al., 2015). Более высокая производительность суспензионных матриц, способствует использованию их в качестве технологии скрининга (Biagini et al., 2003; Opalka, 2003). Основными достоинствами суспензионных матриц являются упомянутые гибкость формата и высокая производительность анализа, а недостатками – высокая стоимость компонентов (шариков и флуоресцентных маркеров) и особенно аппаратуры, позволяющей фиксировать и дифференцировать спектры флуоресцентных маркеров в их сложной смеси.

Объемные (3D) ДНК и белковые матрицы разрабатываются в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда (Москва) (Мирзабеков, 2003). 3D-матрица представляет собой подложку с распределенными объемными каплями геля типа полиакриламида (Arenkov et al., 2000) или агарозы (Afanassiev et al., 2000). Гелевая структура в каждой из капель пропитана определенным реагентом захвата (Tabatabai et al., 2005; Sola et al., 2013). Объемная структура обычно увеличивает емкость и сохраняет функциональные свойства белка, а водная окружающая среда геля снижает денатурацию белка (Мирзабеков, 2003; Nielsen, 2004). Выявление аналитов после инкубации с образцом производится с помощью флуоресцентно меченных иммунореагентов детекции и специального микроскопа для учета результатов. Достоинствами объемных матриц является однородная и большая по площади реакционная поверхность, позволяющая эффективно связывать аналиты из образца, а недостат-

ками – длительное (несколько часов) время реакции из-за медленной диффузии образца в геле, а также необходимость бережного обращения и хранения таких матриц в строго контролируемых условиях, исключающих высыхание и механическое повреждение гелевых подушечек. Чувствительность одновременного выявления на объемных матрицах ряда биологических токсинов составляет 0,7–10 нг/мл, что приблизительно совпадает с чувствительностью иммуноферментного анализа (ИФА) (Дюкова, 2006).

В случае двумерных (плоских) матриц, реагенты захвата или образцы пространственно распределены на плоской подложке. После блокировки свободных участков подложки, матрицу инкубируют с исследуемым образцом и проявляют с использованием меченных специфических антител или других специфически связывающихся с аналитом компонентов (Witte *et al.*, 2004).

Плоские матрицы позволяют реализовать разнообразные варианты иммуноанализа. Анализ на матрицах с прямым захватом (direct capture assays) заключается в иммобилизации на подложке образцов тканей (Speer *et al.*, 2005; Page *et al.* 2017), клеточных лизатов (Geho *et al.*, 2005), сывороток (Janzi *et al.*, 2005) и обнаружении в них интересующего белка с использованием меченых антител одного вида (Liotta, 2000, 2001, 2003). Каждое пятно на подложке состоит из сложной смеси белков, а каждая матрица анализируется с отдельным зондом. Анализ на матрицах с прямым захватом по существу является мультиплексным вариантом прямого дот-иммуноанализа. Такие матрицы могут включать сотни различных проб от пациентов, делая возможным выявление отдельного аналита во многих образцах (Espina *et al.*, 2004).

На двумерных матрицах возможно выполнение сэндвич-иммуноанализа (рис. 2), где на твердой фазе иммобилизованы реагенты захвата, которые позволяют выделять аналиты из образца, а второй комплект специфических компонентов, связанный с легко выявляемой меткой, используется для детекции выделенных аналитов (Delehanty and Ligler, 2002; Nielsen and Geierstanger, 2004, Talha *et al.*, 2016).

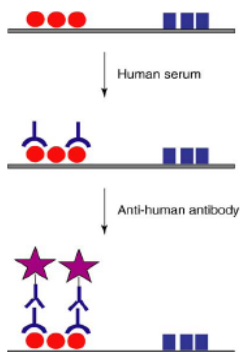


Рис. 2. Матрица антигенов для сэндвич-анализа антител. Матрицу изготавливают нанесением разных антигенов (сферы и, прямоугольники) на плоскую подложку и инкубируют с образцом сыворотки, связывая из нее специфические антитела. Затем проводят выявление выделенных антител меченными (звезда) антивидовыми антителами (*приведено из Witte et al., 2004*).

По дизайну плоские матрицы можно разделить на матрицы с высокой и низкой плотностью нанесения антигенов (*Lopez and Pluskal, 2003*). Сама идея мультиплексного анализа вытекает из желания получить максимум информации из исследуемого образца при минимальных объемах пробы и оправданном расходе реагентов и трудозатрат (*Ekins, 1998*). Это объясняет стремление максимально миниатюризировать матрицу и разместить на ней большое число агентов захвата.

Иллюстрацией крайней миниатюризации мультиплексного анализа может служить белковый чип, включающий до 50 различных белков, иммобилизованных на дне ячейки иммунологического планшета (*Nielsen U. et al., 2004*). Известны белковые матрицы, содержащие 83 вида различных антител для профилирования белков, экспрессируемых клетками нормальной и раковой печени (*Miller et al., 2003*), и 184 вида антител для профилирования сыворотки раковых пациентов (*Tannapfel et al., 2003*). Размещение большого числа специфических белков на небольшой подложке приводит к их высокой плотности на малых по площади зонах фиксации (*Ekins 1998; Espina et al., 2004; Peluso, 2003*). Производство таких матриц, как и учет результатов, возможны только при использовании высоко-

точной, сложной, дорогой роботизированной техники, дорогостоящих материалов и оборудования, поэтому до сих пор они используются лишь в научных экспериментах.

Один из основоположников мультиплексного анализа R.P. Ekins (1998) считает, что в области иммунодиагностики вряд ли будут востребованы слишком большие аналитические «меню». Действительно, в клинической практике перечень дифференцируемых заболеваний обычно укладывается в 5–10 наименований. Кроме того, при обследовании больных большое значение имеют скорость, простота и приемлемая стоимость выполнения анализа. Такими свойствами обладают мультиплексные тесты на основе белковых матриц с низкой плотностью нанесения агентов захвата (*Nielsen and Geierstanger, 2004*). Не случайно большинство публикаций о разработках, имеющих клиническую направленность, связано именно с разработкой тестов на матрицах с низкой плотностью. Такие тесты проще обеспечить необходимым набором реагентов захвата, проще распределить эти агенты на подложке с помощью доступных и относительно недорогих устройств, проще учесть результаты визуально или с помощью обычного сканера или цифровой фотокамеры (*Pla-Roca et al., 2012*). В то же время, мультиплексный формат даже с низкой плотностью нанесения антигенов может дать существенные преимущества по оперативности и стоимости обследования и потеснить существующие популярные методы диагностики (*Ekins, 1998*).

Таким образом, дот-анализ на плоских белковых чипах с низкой плотностью нанесения реагентов захвата представляется наиболее просто реализуемым вариантом мультиплексного анализа. Однако воплощение такого метода требует осмысленного подхода к реализации различных аспектов изготовления и применения мультиплексных диагностических тест-систем.

Типы образцов для иммунохимического анализа

Связывание антигена с антителом происходит в жидкой фазе. Даже если исследованию подлежат плотные ткани или поверхности твердых тел, анализируемое вещество (аналит) должно быть переведено в жидкую фазу путем суспендирования, экстракции или смыва (Бангхем, 1991). При обследовании пациента на наличие инфекционных заболеваний, прежде всего, необходимо определить наиболее информативный источник аналита в жидкостях или тканях организма. В зависимости от наличия аналита, были разработаны системы тестирования с использованием плазмы, сыворотки, цельной крови, цереброспинальной жидкости, мокроты, слюны, мочи, или экстрактов твердых тканей (Bosqui et al. 2020; Sauer et al., 2012).

Вид выбранного матрикса зависит, как от клинической чувствительности и специфичности теста, так и от природы болезни. Аналиты могут присутствовать в одном или большем количестве матриксов, но в значительно различающихся концентрациях (Stewart et al., 2006; Morris, 2006). Известны тесты, использующие различные клинические матриксы: сыворотку, плазму или цельную кровь, мочу, слюну, мокроту из легких, цереброспинальную жидкость, вагинальное содержимое, эксудаты и трансудаты, смывы со слизистых и поверхностей и др.

Состав матрикса может оказывать влияние на чувствительность и специфичность теста. Так, например, гепарин, добавляемый в качестве антикоагулянта к образцам плазмы, может провоцировать неспецифические иммунологические сигналы при исследовании образцов, хранившихся в замороженном состоянии (Alcantara et al., 1999). На результаты анализа могут влиять повышенное содержание в образце липидов, С-реактивного белка и других мешающих примесей (Бангхем, 1991). Часто негативное влияние мешающих проведению анализа компонентов удается снизить путем предварительной подготовки пробы (Roszkopf et al., 2015), разведением образца в подходящем буфере, или добавлением в образец компонентов, связывающих вредный ингредиент. В более сложных случаях приходится проводить предварительную подготовку (очистку) пробы с использованием дополнительных приемов и устройств (Rosenbloom et al., 2006).

Наиболее часто объектом иммунологического исследования является сыворотка или плазма крови пациента. Вопрос о том, что лучше брать для анализа – плазму или сыворотку – не имеет однозначного ответа. Некоторые исследователи предпочитают сыворотку, так как плазма нередко образует эмульсию с органическими растворителями во время экстракции, а после замораживания и оттаивания в ней появляются хлопья фибрина, мешающие определению.

Забор крови проводится путем пункции вены. Для получения сыворотки в кровь, для ускорения свертывания, добавляют ионы кальция и, после образования сгустка из фибрина и форменных элементов, осторожно отсасывают пипеткой свободную плазму. При получении сыворотки крови возникает опасность того, что при отстаивании крови из эритроцитов интенсивно освобождаются протеолитические ферменты, которые могут разрушить определяемое вещество и повредить его меченый аналог во время инкубирования. Поэтому для определения содержания белковых соединений предпочтительно готовить плазму крови.

При получении плазмы, напротив, в кровь добавляют антикоагулянты (гепарин, цитрат натрия или ЭДТА) и осаждают форменные элементы центрифугированием. Гепарин может блокировать связывание антитела с антигеном, цитрат натрия существенно изменяет кислотность среды, к которой чрезвычайно чувствительны некоторые вещества. Поэтому предпочтительным методом получения сыворотки для иммунохимического анализа является способ с применением ЭДТА. Сразу после забора кровь перемешивают с ЭДТА в соотношении 100:1 (о/в) и центрифугируют. ЭДТА является слабым антикоагулянтом, блокатором протеолитических ферментов и составной частью многих буферных смесей (*Таранов, 2002*).

Понятно, что такие процедуры можно проводить в медицинском учреждении и силами специально обученного персонала, поскольку важно как квалифицированное обращение с пациентом, так и правильная подготовка пробы, исключающая контаминацию, гемолиз и передозировку компонентов (*Alcantara et al., 1999*). В последние годы появились вакуумированные пробирки с гелем, позволяющим отделять плазму от форменных элементов при центрифугировании, однако они дороги и тоже требуют квалифицированного обращения. Описанные процедуры получения образцов сыворотки или плазмы крови длительны (в ряде случаев они занимают

больше времени, чем выполнение иммунологического анализа), что, наряду с их другими упомянутыми недостатками, ограничивает оперативное внелабораторное использование иммунологических тестов (*Alter, 1996a*). В то же время для выполнения анализа обычно требуется не более 100 мкл образца. Такое количество можно легко получить при проколе пальца, однако вышеописанные подходы обработки крови нельзя применить к столь малым объемам. Для отделения форменных элементов из капиллярной крови предлагаются фильтрационные и другие системы (*Alter, 1996a, b*), однако они в отечественной клинической практике используются мало.

Особые сложности возникают при исследовании неклинических образцов (проб воды, почвы, смывов с поверхностей и других разновидностей проб). Эти сложности обусловлены непредсказуемым химическим и биологическим составом матрикса, способным провоцировать ложные положительные или отрицательные результаты иммунохимических реакций (*Snyder and Wolcott, 2007*).

Таким образом, выбор вида и способа подготовки матрикса или матриксов, лучше всего подходящих для выявления аналита - первый важный этап создания диагностического теста.

Реагенты, используемые в иммуноанализе

Выбор и производство иммунореагентов, обеспечивающих выделение из образца и иммобилизацию аналита на твердой фазе (реагенты захвата), а также его определение (реагенты детекции) - наиболее критичная проблема иммуноанализа (*Tomizaki et al., 2005, Stafford and Johnston, 2011*). В качестве реагентов в иммунохимическом анализе преимущественно используются антитела и антигены белковой природы, реже – небелковые молекулы, например, аллергенов (*Bacarese-Hamilton et al., 2005; Hiller et al., 2002*), медикаментозных препаратов (*Hu, 2003*) или нуклеиновых кислот (*Collett et al., 2005; Ge, 2000; Winssinger et al., 2004*). В качестве вспомогательных компонентов могут использоваться другие реагенты, способные к образованию специфических связей, такие как протеины А и G, а также авидин и стрептовидин.

Антитела являются базисом любого иммуноанализа, независимо от системы регистрации и усиления сигнала или от применяемых реагентов. Антитела – белки хозяина, выработанные в ответ на присутствие чужеродных молекул (антигенов) в организме. Они

связываются с антигенами, формируя иммунный комплекс, который служит сигналом для его деградации фагоцитарными клетками хозяина. Антитела первично синтезируются плазматическими клетками и окончательно дифференцируются клетками В-лимфоцитарного происхождения (*Антитела*, 1991). Антитела представляют собой гетерогенную группу γ -глобулинов (иммуноглобулинов) сыворотки крови. По физико-химическим свойствам и числу антигенсвязывающих участков они подразделяются на пять классов, некоторые свойства которых представлены в таблице 1. В каждом классе антител можно выделить подклассы и подподклассы, различающиеся помимо прочего размером тяжелых цепей (*Антитела*, 1991; *Бохински*, 1987).

Таблица 1

Некоторые характеристики иммуноглобулинов человека
(приведено из *Антитела*, 1991)

Класс	Уровень в крови в норме, г/л	Относительное содержание в сыворотке, %	Молярная масса, г/моль	Число центров, связывающих антиген
IgG	7,0–19,0	71	150 000	2
IgM	0,2–2,0	7	950 000	10
IgA	0,8–4,8	22	180 000	4
IgE	$2 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$	Очень мало	186 000	2
IgD	0,003–0,4	Очень мало	200 000	2

Выработка сывороточных антител в организме развивается в определенном порядке. При первичном введении антигена вначале появляются антитела класса IgM (3–6 день), затем класса IgG (5–14 день) и, наконец, класса IgA (15–21 день). При повторном введении антигена антитела IgM-класса образуются в малом количестве и быстро образуются антитела классов IgG и IgA. Иммуноглобулины класса IgM являются антителами первичного ответа, иммуноглобулины класса IgG – основными антителами со строго выраженной специфичностью, IgA играют роль в формировании местного иммунитета слизистых оболочек, IgE имеют большое значение в развитии аллергических реакций, а IgD обуславливают развитие аутоиммунных процессов (*Антитела*, 1991).

Каждая молекула антитела имеет участки (так называемые Fab-фрагменты), специфически связывающие антигенные детерминанты (эпитопы). В формировании антигенсвязывающего центра Fab-фрагмента принимают участие вариабельные домены легких и тяжелых цепей молекулы иммуноглобулина, при этом форма внутренней полости этого центра и распределение зарядов комплементарны таковым антигенным детерминантам. Именно участки связывания придают молекуле антитела ее специфичность. Подсчитано, что иммунная система способна продуцировать 10^6 – 10^7 различных специфических антител (*Антитела*, 1991). Молекулы антител имеют от 2 (IgG) до 10 (IgM) участков связывания антигена. В нативной молекуле антитела все Fab-фрагменты моноспецифичны. В последнее время с помощью гибридных технологий и методов генной инженерии получают биспецифические антитела и антитела с другими необычными свойствами (*Колкот и др.*, 1991; *Segala et al.*, 2001).

Участок антигена, который реагирует с антителом (эпитоп) определен только его взаимодействием со связывающим участком антитела. Поскольку антитела могут распознавать относительно небольшие области антигенов, они иногда могут находить подобные эпитопы на других молекулах. Это формирует молекулярную основу перекрестной реактивности. Связывание антитела с антигеном зависит полностью от нековалентных взаимодействий, а комплекс антитело-антиген находится в равновесии с компонентами в свободном состоянии (*Колкот и др.*, 1991).

В качестве реагентов в иммунохимических тестах используются преимущественно антитела класса IgG, специфичные к целевым антигенам, они могут быть или поликлональными или моноклональными. Как правило, поликлональные антитела нарабатываются в животных, таких как овцы или козы, где могут быть получены их большие количества. Поликлональные сыворотки содержат антитела, специфичные к множеству эпитопов, но могут иногда обеспечивать большую специфичность, чем моноклональные антитела, если нежелательная перекрестная реактивность удалена иммуноаффинной очисткой с использованием очищенных антигенов (*Phelan and Nock*, 2003). Однако поликлональная сыворотка может содержать около 10000 различных по специфичности видов молекул иммуноглобулинов, поэтому выделение чистой фракции моноспецифических антител часто связано со значительными трудностями (*Антитела*, 1991).

В 1975 г. осуществлено клонирование гибридных клеток, способных продуцировать определенный вид антител, так что стало возможным получать неограниченное количество таких антител, получивших название моноклональных (*Kohler and Milstein, 1975*). С тех пор проводятся интенсивные научные и инженерные работы, направленные на получение новых типов моноклональных антител, усовершенствование качества их очистки (*Колкот и др., 1991*). Моноклональные антитела обычно нарабатывают в мышах, но используют также других животных, таких как крысы и кролики (*Stewart et al., 2006*). Для использования в сэндвич-анализах моноклональные антитела могут быть получены, на различные эпитопы одной молекулы антигена. Они могут также быть получены с высоким аффинитетом и специфичностью. Все молекулы моноклональных антител идентичны (*Колкот и др., 1991*). Такие антитела успешно используются в «сэндвич»-анализе, поскольку известна специфичность их связывающих центров (*Cretich et al., 2006*). Следует отметить, что около 90% мышинных моноклональных антител относятся к иммуноглобулинам подкласса IgG₁ и при нейтральных значениях pH плохо связываются с белком A *Staphylococcus aureus*, часто используемым в качестве третичного иммунокомпонента сэндвич-анализа (*Колкот и др., 1991*). Кроме того, различные моноклональные антитела имеют разные изоэлектрические точки и различаются по конформационной устойчивости. Например, иммобилизация на подложке мышинных моноклональных антител подкласса IgG₃ представляет большую проблему (*Robinson, 2002*), что необходимо учитывать при их связывании с твердой фазой. Моноклональные антитела можно получать в больших количествах и с высокой степенью чистоты.

Источниками антигенов могут быть лизаты клеток, очищенные белки, а также рекомбинантные и синтетические белки (*Cretich et al., 2006*). Наибольшей информативностью обладает вся совокупность белков микроорганизма, но такая смесь содержит очень большое число эпитопов, в том числе и антигенных детерминант, способных проявлять перекрестную реактивность. В ряде случаев достаточная специфичность анализа может быть достигнута с использованием лизатов или частично очищенных белков. Однако свойства таких антигенов (иммунологические, сорбционные, электрохимические и другие) значительно варьируют в зависимости от

видовых и штаммовых различий источника антигена, способа и среды его культивирования, используемых методов инактивации, выделения, очистки и консервации антигена (*Winssinger et al., 2004*). Кроме того, прямое связывание белковых антигенов с гидрофобными поверхностями может приводить к частичной или полной денатурации связанного белка и потере конформационных эпитопов (*Bussow et al., 1998; Clausmeyer et al., 2014*). Разнообразие свойств антигенов вызывает необходимость тщательного подбора компонентов тест-системы и условий проведения анализа в каждом конкретном случае.

Успехи молекулярной биологии последних лет сделали возможной масштабную наработку синтетических и рекомбинантных антигенов, которые с каждым годом все шире внедряются в практику иммуноанализа (*ВОЗ. Доклад № 784, 1991*). Химически синтезированные пептиды недороги и могут обладать высокой степенью чистоты, благодаря их синтетической природе и эффективным методам очистки с использованием жидкостной хроматографии высокого разрешения. Пептидные микрочипы намного надежнее и дешевле, и поэтому в последние годы приобрели большую популярность среди исследователей протеомов (*Sun et al., 2013*). Недостаток коротких пептидов состоит в том, что они обычно представлены линейными, а не конформационными эпитопами. Кроме того, и набор линейных эпитопов в таких антигенах весьма ограничен, что имеет следствием недостаточно высокий иммунологический сигнал при тестировании (*Sehr et al., 2001; Frank, 2002*). Такие пептиды имеют малую молекулярную массу и не имеют четкой объемной структуры, вследствие чего плохо адсорбируются и требуют особых способов привязки к твердой фазе с определенной ориентацией молекул (*Lesaicherre et al., 2002; Seong and Choi, 2003*). Кроме того, из-за уменьшенной константы скорости реакции близко к поверхности, связывание анализита с мелкими пептидными молекулами часто затруднено (*Cretich et al., 2006*). Перечисленные недостатки ограничивают применение синтетических пептидов для диагностики инфекционных заболеваний и низкомолекулярные микрочипы остаются узкоспециализированным инструментом, доступным только избранным группам химиков-синтетиков, которые проявляют большой интерес к исследованиям протеомики и открытию лекарств (*Sun et al., 2013*).

Напротив, антигены, полученные с помощью рекомбинантных технологий, становятся доминирующими на рынке иммунологических реагентов (*Kawasaki and Eisenbarth, 2000; Bostrom et al., 2005; Schmitt, 2003*). Рекомбинантные антигены представляют собой более длинные (по сравнению с синтетическими) пептиды и могут представлять конформационные эпитопы. Обычно такие белки нарабатываются в *E. coli* и бывают слиты с фрагментами ферментов микроорганизма-продуцента (например, β -галактозидазой или глутатион-S-трансферазой) (*Sehr, 2001*). Наличие таких фрагментов увеличивает массу антигенов и облегчает их иммобилизацию на твердой фазе. Эти фрагменты несут на себе дополнительные антигенные детерминанты, способные снизить специфичность рекомбинантного белка, однако, клонирование особенно сильных эпитопов часто приводит к ослаблению фона и увеличивает чувствительность (*Stewart et al., 2006*). Рекомбинантные антигены обычно обладают более высокой специфичностью, чем нативные белки, и обеспечивают высокие показатели качества иммунодиагностики (*Доклад ВОЗ №784, 1991*).

С другой стороны, рекомбинантные технологии позволяют стандартизовать антигены путем унификации способов их наработки и очистки, что в свою очередь может позволить унифицировать состав компонентов и условий анализа в тест-системах разной специфичности. Высокая специфичность, чистота и безопасность рекомбинантных белков обуславливают их все более возрастающую роль в диагностических исследованиях. Перекрестная реактивность и высокий уровень фона могут стать негативным фактором многих тестов по выявлению антител и, следовательно, усилия по созданию рекомбинантных белков обычно бывают оправданы (*Stewart et al., 2006*). Часто рекомбинантные белки нерастворимы и требуют очистки в денатурирующих условиях и ренатурации, когда должны быть проанализированы антитела к конформационным эпитопам (*Sehr et al., 2001; Lechtzier et al., 2002*). Спектры антител в разных периодах инфекционного заболевания могут значительно различаться, и использование отдельных рекомбинантных антигенов может быть недостаточным для обеспечения диагностики на всех стадиях инфекции (*Дмитриев и Брагина, 1996; Гражданцева и др., 1998; Полтавченко и др., 2007d*). В таких случаях (например, при выявлении антител к возбудителям краснухи, сифилиса, СПИДа, гепатита С и другим) применяют различные сочетания двух или более антигенов.

Часто в качестве вторичного (при выявлении антител) или третичного (при выявлении антигенов) компонента в иммуноанализе используются протеин А – белок с молекулярной массой 42 кДа, выделенный из клеточной оболочки золотистого стафилококка (*Staphylococcal protein A* (SpA)) и протеин G (м.м. около 40–65 кДа), экспрессирующийся в стрептококках групп С и G (*Streptococcal protein G* (SpG)). Эти белки обладают свойством прочно связываться с Fc-фрагментами иммуноглобулинов, не препятствуя специфическому иммунному взаимодействию Fab-фрагментов с антигеном. При этом связи в комплексе SpG-Fc преимущественно полярные (в комплексе SpA-Fc, напротив, преобладают гидрофобные контакты). Они оказались очень удобными для введения метки в иммобилизованный на твердом носителе комплекс антиген-антитело, поскольку наличие только одного меченого компонента (белка А или G) позволяло контролировать множество реакций антител с разнообразными антигенами (*Bensing et al., 1984*). Иммобилизованные на макроносителях эти белки позволяли производить высокоэффективную очистку иммуноглобулинов и даже фракционировать IgG на подклассы (*McKinney and Parkinson, 1987; Bloom et al., 1989*), поскольку связывающая способность этих белков к разным видам иммуноглобулинов различна (см. табл. 2). На современном рынке доступны эти белки и их рекомбинантные аналоги, как в чистом виде, так и связанные с разнообразными метками и макроносителями. Эти реагенты дешевле, чем антивидовые антитела, и широко используются в различных форматах иммуноанализа. Ограничения применения SpA и SpG в сэндвич-анализе связаны с тем, что эти реагенты могут быть способны связываться не только с вторичными, но и с первичными антителами, провоцируя ложноположительные сигналы.

Таблица 2

Эффективность связывания белков А и G
с различными видами иммуноглобулинов

Хозяин	Класс Ig	SpA	SpG	Хозяин	Класс Ig	SpA	SpG
Человек	Общий IgG	++++	++++	Лошадь	Общий IgG	++	++++
	IgG ₁	++++	++++		IgG _(ab)	+	-
	IgG ₂	++++	++++		IgG _(c)	+	-
	IgG ₃	+	++++		IgG _(T)	-	+++
	IgG ₄	++++	++++	Корова	Общий IgG	++	++++
	IgM	++/+	-		IgG ₁	++	++++
	IgD	+/-	-		IgG ₂	+++	++++
	IgE	+/-	-	Коза	Общий IgG	+	++
	IgA	++/+	-		IgG ₁	+	+++
	IgA ₁	+/-			IgG ₂	+++	+++
	IgA ₂	+/-		Овца	Общий IgG	+/-	+++
	Fab	+/-			IgG ₁	+/-	+++
	ScFv	+/-			IgG ₂	+	+++
Мышь	Общий IgG	++++	++++	Кошка	Общий IgG	++++	-
	IgG ₁	++	++++	Курица	Общий IgY	+/-	+
	IgG _{2a}	++++	++++	Собака	Общий IgG	+++	+
	IgG _{2b}	+++	+++	Осел	Общий IgG	++	+++
	IgG ₃	++	+++	Морская свинка	Общий IgG	+++	+
	IgM	+/-	-				

Окончание таблицы 2

Хозяин	Класс Ig	SpA	SpG	Хозяин	Класс Ig	SpA	SpG
Крыса	Общий IgG	+	+++	Свинья	Общий IgG	+++	++
	IgG ₁	+	+++	Кролик	Общий IgG	++++	+++
	IgG _{2a}	-	++++	Хомяк	Общий IgG	++	++
	IgG _{2b}	-	+	Макака	Общий IgG	++++	++++
	IgG _{2c}	+++	+++				

Из других реагентов, часто использующихся в иммунологическом анализе, необходимо отметить биотин, авидин и стрептавидин. Гликопротеин яичного белка – авидин и позднее выделенный из бактерий *Streptomyces avidinii* стрептавидин обладают способностью к избирательному и исключительно прочному ($K_D = 10^{-15}$ М) связыванию биотина (Кохен и др., 1991). Карбоксильную группу остатка валериановой кислоты в биотине можно модифицировать и таким образом получать активные биотинилированные производные (Oberbichler et al., 2020). Связывание биотина с биомолекулами (антителами, антигенами, ферментами) легко осуществляется в мягких условиях и, поскольку молекула биотина имеет небольшую молекулярную массу, практически не сказывается на специфической активности, стерических и диффузионных характеристиках белкового комплекса (Bayer and Wilchek, 1980).

Молекула авидина включает в себя четыре идентичные субъединицы и с ней одновременно могут быть связаны две различные биотинилированные молекулы белка, например, антитела и фермента (Guesdon et al., 1979; Bates, 1987). Однако применение авидин-биотиновой системы ограничивается высокой основностью авидина (изоэлектрическая точка pI 10,5) и наличием в его молекуле углеводных остатков, что обуславливает высокий уровень неспецифического связывания (Кохен и др., 1991). Хотя неспецифические взаимодействия авидина можно свести к минимуму с помощью химических или других методов, наилучшим решением этой проблемы является применение стрептавидина и его конъюгатов (Geho et al., 2005).

Подобно авидину, стрептавидин также является тетрамером и содержит четыре биотинсвязывающих центра. Некоторые свойства авидина и стрептавидина приведены в таблице 3.

Таблица 3

Некоторые характеристики авидина и стрептавидина
(приведено из Кохен и др., 1991)

Характеристики	Авидин	Стрептавидин
Молекулярная масса	67 000	60 000
Число биотинсвязывающих субъединиц	4	4
Молекулярная масса субъединицы	15 600	14 600
K _d (комплекса с биотином)	–10 ⁻¹⁵	–10 ⁻¹⁵
E ₂₈₂ (1 мг/мл)	1,54	3,4
Связывание биотина на субъединицу	1	1
Олигосахариды на субъединицу	1	0
Манноза на субъединицу	4–5	0
N-ацетилглюкозамин на субъединицу	3	0
Изoeлектрическая точка, pI	>10	<7
Остатки аминокислот на субъединицу:		
Триптофаны	4	8
Тирозины	1	6
Лизины	9	4
Аргинины	8	4
Аспарагин + аспарагиновая кислота	15	12
Глутамин + глутаминовая кислота	10	9
Амиды	16	–

Стрептавидин и его разнообразные конъюгаты коммерчески доступны, хотя и стоят несколько дороже, чем их авидиновые аналоги. Поскольку стрептавидин не гликозилирован и имеет нейтральную изоэлектрическую точку (pI 6,5), то для него нехарактерны неспецифические взаимодействия, свойственные авидину (Кохен и др., 1991). Свойства авидин (стрептавидин) – биотинового комплекса широко используются для решения различных задач, в частности для повышения эффективности иммобилизации реагентов захвата на твердой фазе, а также для каскадных систем усиления иммунологического сигнала (Wilchek and Bayer, 1984). Таким образом, свойства и качество первичных (реагенты захвата) и вто-

ричных (реагенты детекции) иммунореагентов, используемых в диагностической тест-системе, в решающей степени определяют ее чувствительность и специфичность. Взаимодействие этих реагентов с аналитом составляет суть иммунологического анализа, тогда как другие компоненты системы имеют вторичную, вспомогательную роль. Вспомогательные компоненты могут иметь большое значение при выявлении состоявшегося события иммунологического связывания, но бесполезны в тех случаях, когда это событие не состоялось или произошло неудачно.

Подложки

В твердофазных иммунохимических исследованиях в качестве носителя (подложки), позволяющего разделять связавшиеся и не связавшиеся компоненты реакции, используют разнообразные материалы (*Ekins, 1998; Ofir et al., 2005; Полтавченко и др., 2006b; Kingsmore, 2006; Walton and Jayaraman, 2009; Cretich et al., 2010; Sinclair, 2013; Gonzalez-Gonzalez et al., 2014*). Ключевые требования к поверхности твердой фазы, на которой проводится иммунологический тест:

- обеспечение оптимальной связывающей способности и емкости в отношении реагента захвата (*Nielsen and Geierstanger, 2004; Полтавченко и др., 2006b; Cretich et al., 2006*);

- сохранение биологической активности реагента захвата (белки имеют тенденцию к денатурации при иммобилизации на подложке из-за возможности формирования гидрофобных связей внутренних цепей белка с поверхностью твердой фазы (*Nielsen and Geierstanger, 2004; Fici et al., 2010; Gonzalez-Gonzalez et al., 2014*);

- доступность реагента захвата для партнера взаимодействия (связь белка с подложкой снижает доступность цели и кинетику реакции, ведя к возможности получения ложно-отрицательных результатов), этот вывод особенно важен для реагентов захвата с малой молекулярной массой (*Cretich et al., 2006*);

- низкая степень неспецифических взаимодействий (достижение низкой степени неспецифического связывания чрезвычайно трудно, когда образец представлен сложной смесью тысяч разнообразных молекул (*Kusnezow et al., 2003*);

– совместимость поверхности твердой фазы с используемым методом детекции (материал твердой фазы не должен провоцировать появление фоновых сигналов, затрудняющих учет результатов анализа), это положение имеет особое значение при применении флуоресцентных, хемилюминесцентных и хромогенных методов детекции (*Nielsen and Geierstanger, 2004; Полтавченко и др., 2016a*).

Для изготовления плоских матриц наиболее удобны листовые материалы. Принципиально материал подложки должен отвечать приведенным выше ключевым требованиям, однако стремление к миниатюризации мультиплексного анализа ведет к использованию малых зон иммобилизации реагентов захвата. При малой площади эти зоны фиксации должны быть максимально насыщены реагентами захвата для того, чтобы получить регистрируемый сигнал. Таким образом, поверхность материала подложки матрицы должна отвечать более жестким требованиям однородности и связывающей способности, чем, например поверхность ячеек планшета, где может быть получен суммарный сигнал с гораздо большей площади (*Espina et al., 2004; Stafford and Johnston, 2011*). Поверхность подложки, предпочтительно, была гидрофобной. Нанесенный на гидрофобную поверхность раствор иммунореагента не растекается, а образует капли со строго ограниченными границами зоны, площадь которой зависит от объема капли и реологических свойств раствора. Таким образом, подобрав необходимые концентрации реагентов и объемы капель, можно просто формировать матрицу путем нанесения капель на соответствующие зоны подложки. Другими требованиями к материалу подложки являются механическая прочность и возможность простой обработки для создания необходимого дизайна. Кроме того, для обеспечения возможности надежного визуального учета результатов материал должен быть непрозрачным и иметь светлый (предпочтительно белый) цвет.

Существующие коммерческие подложки для белковых микрочипов предполагают компромисс между прочностью иммобилизации белков захвата, связыванием достаточного количества белка в отдельных аналитических пятнах и поддержанием структуры и функции иммобилизованных белков (*Fici et al., 2010*).

Наиболее часто в публикациях, посвященных мультиплексному иммунохимическому тестированию, авторы описывают изготовление белковых матриц на стеклянных слайдах с разнообразно модифицированной поверхностью (Zhu H. et al., 2000, 2001, 2003; Angenendt et al., 2002; Lesaichere и др., 2002; Chen et al., 2003; Nielsen U. et al., 2004; Kim et al., 2005; Fici et al., 2010; Sinclair, 2013; Gonzalez-Gonzalez et al., 2014). Однако стекло мало подходит в качестве подложки по следующим причинам: 1) стеклянная поверхность слабо удерживает адсорбированные белки; 2) эффективная иммобилизация антигенов достигается только при ковалентном связывании amino- или карбоксильных групп белка с химически активированной поверхностью стекла, а ковалентное связывание является технически сложным, длительным и относительно дорогим методом иммобилизации; 3) стекло – хрупкий материал, неудобный при изготовлении и применении иммуночипов; 4) стекло – прозрачный материал, что затрудняет визуальный учет результатов.

Пористые мембраны (фильтры) на основе органических полимеров (нитроцеллюлоза, поливинилхлорид, нейлон и др.) широко применяются в дот- и блот-методиках иммуноанализа (Lyashchenko et al., 2000; Sehr et al., 2001; Espina et al., 2004; Liang et al., 2004; Cretich et al., 2006; Sinclair, 2013). Адсорбирующие пористые мембраны, благодаря развитой поверхности, обладают высокой емкостью. Существующий рынок позволяет выбрать мембраны, характеризующиеся различными размерами пор, сорбционной емкостью и прочностью связывания белков.

Непористые листовые материалы на основе органических полимеров весьма разнообразны. В качестве твердой фазы в иммунологических методах чаще используются планшеты, изготовленные из полистирола и поливинилхлорида (ПВХ). Известны случаи применения подложек из лавсана, полиэтилена и др. пластиков (Новые методы иммуноанализа, 1991; Ekins, 1998; Espina et al., 2004; Nielsen U. et al., 2004). Полистирол, ПВХ и лавсан имеют на своей поверхности радикалы, способные связывать amino- или карбоксильные группы белков. Количество таких групп, а, следовательно, и способность пластика связывать и удерживать на себе белки, зависит от химического состава, наличия добавок и примесей, а также технологии приготовления и штамповки (прокатки) пластмассы.

Способы распределения реагентов захвата на подложке

Иммунореагенты захвата должны быть нанесены на подложку матрицы в виде отдельных пятен определенного размера. Оптимальный размер пятен должен позволять измерения, в которых количество аналита, захваченного из раствора, прямо отражает его концентрацию в системе анализа и обеспечивает сочетание высокой чувствительности с низким потреблением образца (*Ekins, 1998; Cretich et al., 2006*). Самые высокие интенсивности сигнала и оптимальные отношения сигнал – шум могут быть достигнуты в маленьких пятнах (см. разд. Предпосылки), однако их излишняя миниатюризация не позволяет выполнять количественные измерения аналита в образце (*Templin et al., 2004*). Наш опыт серологических исследований на плоских матрицах свидетельствует о том, что достаточно четкая корреляция оптического сигнала в пятне с концентрацией специфических антител в образце достигается при диаметре пятен 1-3 мм, максимально насыщенных реагентами захвата (*Полтавченко и др., 2007a*).

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. Характеристики успешных технологий должны включать в себя: способность работать с широким спектром растворителей и растворенных веществ, дозирование реагентов в диапазоне от пиколитров до микролитров, а также высокую производительность (*Tisone, 1998; Voskuhl et al., 2014*).

Методы печати могут быть в целом классифицированы на методы контактной и бесконтактной печати. Во время контактной печати печатное устройство вступает в физический контакт с подложкой при осаждении биологических образцов. Напротив, бесконтактная печать не предполагает физического контакта между устройством и подложкой (например, струйная печать, капля по требованию и др.). Нанесение образцов при контактной печати может быть последовательным и параллельным. При последовательном нанесении печатающий элемент серийно перемещается между источником образца и подложкой, каждый раз помещая на подложку одну порцию образца. При этом повторяющиеся движения ограничивают производительность изготовления. Следовательно,

методы параллельного нанесения являются лучшим выбором для крупномасштабного производства, однако большинство параллельных методов для нанесения биомолекул являются более новыми и, следовательно, менее отработанными, чем серийные методы (*Barbulovic-Nad et al., 2006*).

Контактная печать

Методы контактной печати используются для формирования массивов посредством прямого контакта между печатным устройством и подложкой. Для передачи реагентов с микропланшета на подложку технологии контактной печати используют твердые штифты, рапидографы, штампы и др. устройства различной конструкции. Простейшим методом печати белковых матриц является контактная печать штифтами. В этом методе штифт окунается в резервуар для загрузки образца, затем переносится к подложке и прикасается к ее поверхности для нанесения образца. Как правило, каждый штифт выдает только одну каплю на каждом цикле передачи, но переносы многих реагентов можно сделать параллельно, увеличивая тем самым скорость процесса. Несмотря на то, что печать одиночными штифтами является относительно простым методом, конструкция штифтов не является тривиальной. На рисунке 3 представлены наиболее типичные конструкции штифтов. Они обычно изготавливаются из металлов, таких как нержавеющая сталь, вольфрам и титан.

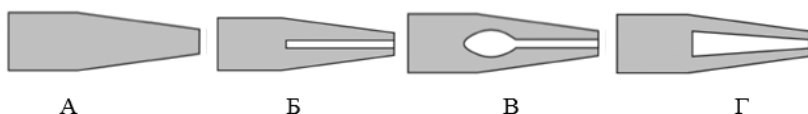


Рис. 3. Схемы цельного (А) и расщепленных (Б, В и Г) штифтов (*приведено из Barbulovic-Nad et al., 2006*).

Для печати нескольких точек расщепленным (распределительным) штифтом обычно достаточно одной загрузки образца. Если требуется больше, чем несколько пятен, штифт должен многократно перемещаться между массивом и источником образца до тех пор, пока на поверхности подложки не будет напечатано нужное количество пятен. Такие переносы значительно замедляют процесс. Для достижения необходимой производительности, штифты, как правило, собраны в массивы, сопоставимые с типовыми 96- и

384-луночными планшетами. Методы штифтовой печати имеют много преимуществ, в том числе воспроизводимость напечатанных пятен и легкое обслуживание. Воспроизводимость объема и размеров капли может быть хорошей, но сильно зависит от физической химии распределяемых реагентов. Объем капель может достигать пиколитрового диапазона. Размер пятен увеличивается по мере усиления гидрофильности подложки и пропорционален логарифму вязкости печатного раствора.

Однородность пятна при штифтовой печати определяется, прежде всего, вязкостью образца, конструкцией, площадью контакта и свойствами поверхности штифта, свойствами поверхности подложки и ровностью основания. Дополнительные факторы включают скорость штифта, точность роботизированных элементов управления, а также контроль влажности и температуры окружающей среды. Если штифт используется для печати нескольких растворов, его необходимо мыть и чистить, чтобы избежать перекрестного загрязнения. Малая производительность изготовления матриц и потенциальный ущерб для поверхности подложки, также являются проблемами, которые необходимо принимать во внимание (*Templin et al., 2002*).

Штампы являются альтернативой штифтовых систем. С использованием микроштампов множество пятен могут быть напечатано параллельно, что позволяет повысить производительность изготовления иммуночипов. Процесс микроштамповки, изображенный на рисунке 4, является простым, недорогим и может быть легко проведен в лаборатории. Образец сначала загружается на рельефную поверхность штампа, а затем переносится на подложку посредством физического контакта.

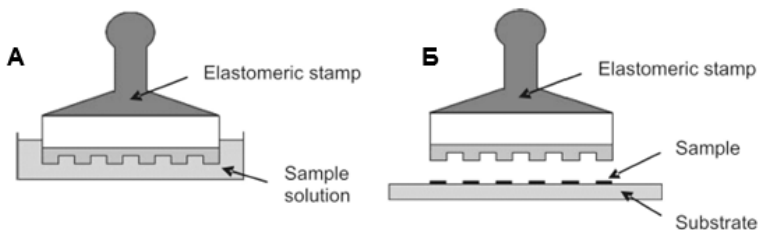


Рис. 4. Процесс микроштамповки. (А) загрузка реагента на штамп. (Б) Перенос и нанесение реагента на подложку путем физического контакта между эластомерным штампом и подложкой (*приведено из Barbulovic-Nad et al., 2006*).

Для получения хорошего контакта микроштампы обычно изготавливают методами литографии из эластичных материалов, таких как полидиметилсилоксаны (PDMS), которые могут воспроизводить неровности поверхности подложки при приложении нагрузки (*Xia et al., 1998*). Методы литографии позволяют обеспечить производство недорогих одноразовых микроштампов, использование которых сводит к минимуму проблемы переноса образца, перекрестной контаминации и трудоемких процессов очистки, характерных для печати штифтами (*Zhao et al., 1997*). Рапидографы могут быть использованы для нанесения реагентов захвата на подложку. Как показано на рисунке 5, эта конструкция имеет встроенную камеру, которая может содержать более значительные количества раствора по сравнению с другими типами контактной печати. Тонкая металлическая проволока проходит от наконечника к клапану в камере. Когда на проволоку производится нажим, клапан приподнимается так, что жидкость может течь к наконечнику.

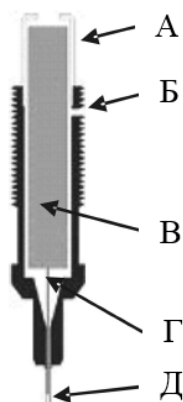


Рис. 5. Схема конструкции рапидографа (приведено из *Barbulovic-Nad et al., 2006*). А – крепежный колпачок, Б – вентиляционное отверстие, В – камера с реагентом захвата, Г – клапан, Д – наконечник.

Это устройство является простым в реализации и относительно недорогим. Кроме того, рабочий раствор может храниться в рапидографе и использоваться многократно (*Sheehan et al., 2003*). При правильном подборе режимов печати на модифицированном перьевом плоттере МР 4200 фирмы «Graphitex» (Япония), оснащенном рапидографом с толщиной наконечника 0,6 мм удастся наносить примерно 1 мкл белковой смеси на пятно диаметром около 2 мм, что позволяет изготавливать белковые матрицы с низкой плотностью нанесения реагентов захвата. Кроме нанесения реагентов плоттер позволяет производить необходимую разметку и маркировку матриц с помощью фломастеров с водостойкими чернилами. С использованием такого подхода удастся стандартно распечатывать до 2500 точек в час (*Полтавченко и др., 2007а*), что может удовлетворить потребности научной лаборатории, но явно недостаточно для производства. Для использования рапидографов характерны недостатки, присущие штифтовой печати – зависимость эффективности и воспроизводимости печати от физико-химических характеристик раствора реагента, свойств подложки, показателей окружающей среды. Их применение часто сопровождается засорами наконечника и приводит к повреждению поверхности подложки (*Barbulovic-Nad et al., 2006*).

Бесконтактная печать

Традиционные методы бесконтактного нанесения реагентов включают в себя аэрозольные системы, струйную печать и системы для реализации принципа «капля по требованию».

Аэрозольные системы широко используются для дозирования широкого спектра реагентов на впитывающие поверхности, такие как мембраны (*Peluso et al., 2003*). Однако, поскольку воздушный поток, связанный с системами аэрозоля, легко перераспределяет реагенты, находящиеся на поверхности подложки, такие системы, как правило, непригодны для дозирования реагента на неабсорбирующие материалы. Аэрозольные системы обычно обладают динамическим диапазоном (максимальная скорость распределения/ минимальная скорость распределения) больше 1000, и поэтому могут быть запрограммированы для дозирования широкого спектра объемов. При распределении на мембранах в формате линии, аэрозольные системы могут достигать минимальных объемов до 0,1 мкл/см, а при нанесении точек реагента, минимальный объем 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 свойств распыляемого реагента (*Tisone, 1998*).

Струйная печать по своей сути является бесконтактной технологией и может быть приспособлена к требованиям дозирования реагентов. Привлекательность этой технологии заключается наличием на рынке струйных принтеров, обеспечивающих раздельную подачу растворов на несколько групп сопел и позволяющих предположить возможность параллельного нанесения на подложку соответствующего числа пятен реагентов захвата. Для преодоления ограничений коммерческих струйных принтеров, используются их модификации, например насадочные головки с большим количеством резервуаров с верхней загрузкой реагентов, каждый из которых подается на отдельное сопло. Используя эту конфигурацию, множество капель различных растворов могут выдаваться одновременно (*Takagi et al., 2004; Gutmann et al., 2004; Gutmann et al., 2005*). 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, IL*), Domino

Amjet, Inc (Gurnee, IL), и другие (Tisone, 1998). Этот тип струйных принтеров создает 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 подается высокое напряжение. Изменяя напряжение на отклоняющем электроде, можно заставить капельки поменять траекторию полета. 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 (Соболенко, 2014). Принципиальная схема системы непрерывной струйной печати приведена на рисунке 6.

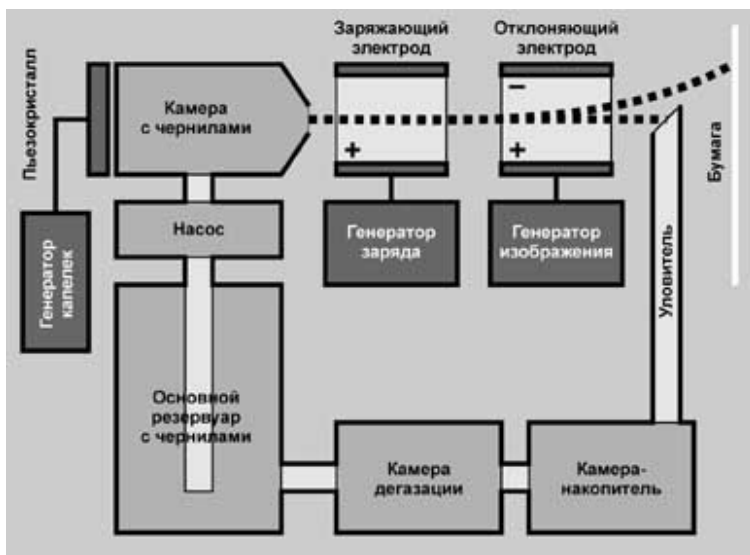


Рис. 6. Принципиальная схема системы непрерывной струйной печати (приведено из Соболенко, 2014).

Известны примеры успешного модифицирования непрерывных струйных принтеров для реагентов дозирования, оказавшихся полезными для некоторых применений (Tisone, 1998; Авсеев и др., 2001; Kim et al., 2005). Однако такие системы могут работать только с применением электропроводных растворов, способных получить заряд, и имеющих ограниченный физико-химический

профиль. Производительность сопел печатающей головки высока – из них в секунду вылетает от 50 до 150 тысяч капелек. Однако сам процесс печати нельзя назвать очень быстрым. Система рециркуляции может приводить к загрязнению раствора, и весьма сложна, что сказывается на общей стоимости принтеров этого типа.

Системы импульсной струйной печати могут быть пузырькового и пьезоэлектрического типа. Схемы работы принтеров импульсного типа приведены на рисунке 7.

Струйные принтеры пузырькового типа, производимые, например, фирмами Hewlett-Packard и Canon (см. рис. 7Б) очевидно не годятся для дозирования биокomпонентов, поскольку в процессе печати производят нагрев рабочего раствора практически до мгновенного испарения (Tisone, 1998). Белки при таких воздействиях денатурируют и в значительной степени утрачивают свои специфические свойства.

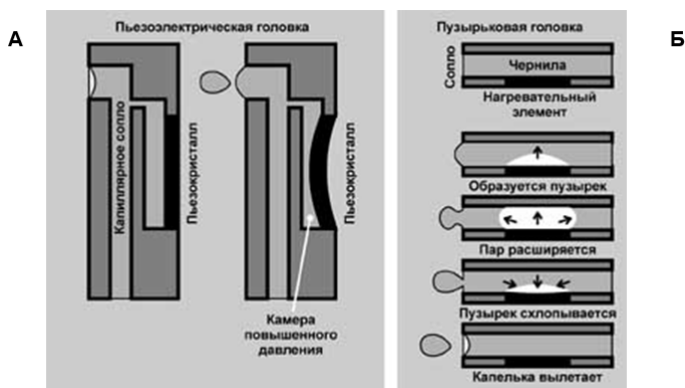


Рис. 7. Принципиальные схемы систем импульсной струйной печати: А – пьезоэлектрического типа, Б – пузырькового типа (приведено из Соболенко, 2014).

Напротив, ультразвуковое воздействие на растворы в принтерах с пьезоэлектрическими головками (например, принтеры фирмы Epson) может оказаться полезным, так как такое воздействие разрушает белковые агрегаты и повышает дисперсность наносимых антигенов (Новые методы иммуноанализа, 2001). Для образования в камере избыточного давления применяется диск из материала с пьезоэлектрическими свойствами (см. рис. 7А). Когда к нему подводится напряжение, он деформируется (изгибается). Выгнувшись,

диск, который служит одной из стенок камеры с чернилами, резко уменьшает ее объем, оказавшиеся лишними чернила вылетают при этом 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 (*Соболенко, 2014*).

Наши попытки приспособить пьезоэлектрический принтер фирмы Epson показали, что такой подход принципиально пригоден для изготовления иммуночипов. Однако удельный объем наносимых иммунореагентов недостаточен для получения сливных капель на гидрофобных подложках, вследствие чего не удается достигнуть однородности и насыщенности напечатанных пятен (*Полтавченко и др., 2007a*). Кроме того, при печати на коммерческих струйных принтерах не может быть исключена вероятность попадания капель реагента из конкретного сопла на другие тестовые зоны иммуночипа, приводящего к уменьшению специфичности анализа в таких зонах (*Tseng et al., 2002*).

Еще одним недостатком струйных принтеров является сложность полной промывки печатного сопла для загрузки раствора нового реагента захвата, особенно в пьезоэлектрических принтерах, в которых сопло отделено от резервуара с раствором реагента, и все соединительные каналы также должны быть тщательно очищены (*Allain et al., 2004*). Таким образом, существующие коммерческие системы струйной печати не могут обеспечить надежное и воспроизводимое нанесение реагентов захвата на подложку. Доработка же печатающих головок, особенно с учетом вариабельности состава рабочих растворов, сложна и стоимость ее может оказаться непомерно высокой.

Наиболее успешные попытки приспособить технику бесконтактной печати для изготовления белковых матриц были достигнуты с использованием технологии «капли по требованию». В таких системах пользователь 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 с размерами в диапазоне, соответственно, нано- и пиколитров. 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 (*Lemto et al., 1997*). Однако до сих пор никто не сумел создать коммерчески доступной системы «падения по требованию», используя только электромагнитный клапан (*Tisone, 1998*).

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 (*Jonczyk et al., 2016*). Основной проблемой всех систем струйной печати является то, что они чрезвычайно чувствительны к физико-химическим свойствам наносимых реагентов, таких, как поверхностное натяжение, вязкость и растворенный 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 определенной системой клапанов. Но для успешного использования в дозировании реагентов, система должна быть способна надежно работать с жидкостями, которые имеют широкий спектр свойств, и часто подвергаться калибровке, чтобы гарантировать нанесение необходимого объема (*Tisone, 1998*).

Одним из перспективных решений для количественного бесконтактного дозирования представляет собой система, в которой объемный насос или избыточное давление используются для подачи реагента в бесконтактный диспенсер. Подходящие бесконтактные диспергирующие элементы могут включать пьезоэлектрические головки, электромагнитные клапаны с открытием по времени или аэрозольные сопла (см. рис. 8). Такая система сочетает в себе количественные характеристики объемных насосов с характеристиками бесконтактного выброса выбранного элемента диспергирования.

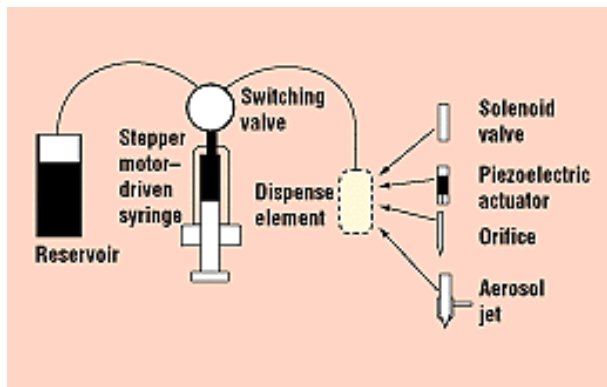


Рис. 8. Принципиальная схема бесконтактного диспенсера, сочетающего объемный насос и элементы диспергирования (приведено из *Tisone, 1998*).

Например, в системе BioJet (Bio-Dot, Irvine, США) применен шприцевой насос, который доставляет реагенты к элементу диспергирования – открывающемуся по времени электромагнитному клапану. Эта система количественна (распределяемые объемы могут быть запрограммированы); имеет минимальную чувствительность к физической химии реагентов, которые она распределяет; не требует или почти не требует контакта с целевой подложкой и подходит для небольших объемов доставки в диапазоне от 4,16 до 10000 нл (*Tisone, 1998*).

Таким образом, наиболее предпочтительными выглядят способы бесконтактной печати, которые могут обеспечить высокую производительность изготовления белковых матриц. Однако, существует ряд проблем в их применении, включающих интерференцию рядом расположенных пятен, денатурирование биомолекул в процессе печати, а также технические сложности эксплуатации. Поэтому исследователи продолжают прикладывать значительные усилия по разработке новых надежных и эффективных систем, которые будут более полно удовлетворять потребности производства диагностических наборов (*Barbulovic-Nad et al., 2006*).

Условия иммобилизации реагентов захвата на подложке

В идеальном случае реагент захвата должен быть в насыщающей концентрации гомогенно иммобилизован на определенном участке подложки. Он должен иметь ориентацию, предпочтительную для связывания и хорошей доступности для аналитов; естественную конформацию, обеспечивающую специфическую биоактивность, и минимальный уровень связывания с неспецифическими белками. (*Espina et al., 2004; Kozarova et al., 2006; Liu and Li, 2012*). Неправильное прикрепление белка может привести к частичной или полной утрате его функциональной активности из-за пространственных помех или изменений конформации. Иммобилизацию на твердой фазе иммунореагента захвата чаще осуществляют за счет физической адсорбции, реже используют химическое (ковалентное) связывание или опосредованную связь.

Ковалентное связывание обеспечивает наиболее прочное закрепление белков и пептидов на подложке. Механизмы ковалентного связывания требуют присутствия на подложке активированных групп (обычно электрофильные группы типа эпоксидных (*Zhu et al., 2001; Zhou and Zhou, 2006*), альдегидных (*Mac Beath and Schreiber, 2000*) или эфирных (*Benters et al., 2001*), способных реагировать с нуклеофильными (амино, тиольными или гидроксильными) группами на молекулах белка. Известные методики химического связывания белков проводятся с использованием дорогих и часто токсичных реактивов, сложны и не технологичны. Применение таких методик оправдано только на слабо адсорбирующих материалах подложки или в отношении слабо удерживающихся на поверхности носителя белков, например, низкомолекулярных антигенов (*Bora et al., 2002; Lesaichere et al., 2002; Prechl et al., 2010; González-González et al., 2014; Voskuhl et al., 2014*).

Использование геля, который заключает белок в структурированную среду – альтернативный путь для иммобилизации белков. Этот механизм не вовлекает перекрестные связи молекул захвата с поверхностью, а основан на физическом захвате белков в гелях типа полиакриламида (*Arenkov et al., 2000*) или агарозы (*Afanassiev et al., 2000*). Объемная структура этих подложек обычно увеличивает емкость и не нарушает потенциально-функциональные участки или регулярные домены белка; кроме того, водная окружающая среда геля снижает денатурацию белка. Однако структура

геля представляет барьер для диффузии, и события молекулярного распознавания могут потребовать длительной инкубации (Дюкова, 2006; Cretich et al., 2006).

При опосредованном связывании в качестве агента-посредника часто применяют глутаровый альдегид (Венгеров и др., 1987; Егоров и др., 1991; Falsey et al., 2001). При таком подходе поверхность материала подложки последовательно насыщается сначала агентом-посредником, а затем иммобилизуемым белком. Считается, что глутаровый альдегид прочно адсорбируется на твердой фазе, а его связь с белком происходит по NH_2 - группам. Оба этапа такого процесса многочасовые и проводятся в условиях влажной камеры. Распространено мнение, что при таком способе иммобилизации белки меньше десорбируются с поверхности носителя во время инкубаций и отмывок (Егоров и др., 1991).

Каким бы путем ни происходило связывание (адсорбционным, ковалентным или опосредованным), иммобилизация происходит в случайной или неспецифической ориентации, ограничивающей количество иммобилизованных белков и снижающей эффективность специфических взаимодействий (Rousserie et al., 2010). Однако если реагент захвата связать определенным образом с аффинной мишенью, то можно их иммобилизовать путем специфического не ковалентного взаимодействия между мишенью и предварительно иммобилизованными молекулами посредника (Camarero, 2007). Такое связывание обычно является результатом молекулярного распознавания типа взаимодействия биотин-авидин (Talha et al., 2016), взаимодействием между никелевым покрытием подложки и His-мишенью белка или глутатионом и GST-мишенью (Zhu and Snyder, 2003). Недостатком этого подхода является то, что белки должны иметь определенным образом «пришитую» мишень, что часто представляет сложную химическую задачу. В работах, посвященных приемам создания белковых и пептидных микроматриц, приводится множество новых методов химической модификации поверхности носителя и иммунокомпонентов для их эффективного сайт-ориентированного связывания в микропятнах (Wu et al. 2008; Stafford and Johnston, 2011; Clausmeyer et al. 2014; Voskuhl et al., 2014).

Физическая (пассивная) адсорбция представляется наиболее простым и технологичным способом иммобилизации белков и используется в ИФА и блот-методиках много лет (*Bussow et al., 1998; Haab et al., 2001*). Однако это сложный, многофакторный и не вполне изученный процесс, в котором участвуют вандервальсовы силы, гидрофобные, ионные и другие взаимодействия (*Скоунс, 1985; Киселев, 1986; Парфит и Рочестер, 1986; Esser, 1997*). Основой этого процесса являются электрополяризационные эффекты, в значительной степени определяющиеся характеристиками среды, в которой происходит связывание адсорбата с адсорбентом (*Парфит и Рочестер, 1986; Esser, 2014*). На рисунке 9 представлены основные типы связей между макромолекулами.

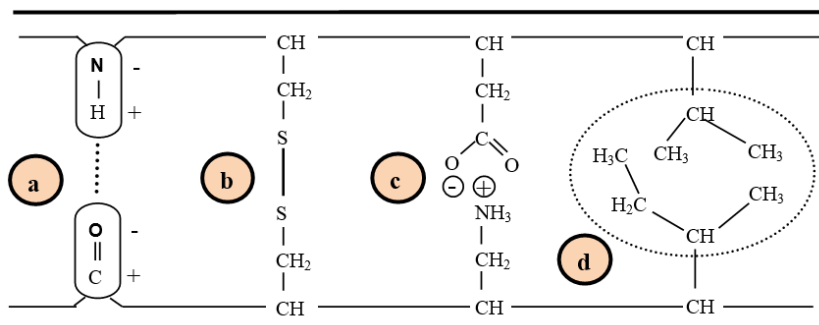


Рис. 9. Четыре главных типа возможных связей между макромолекулами «Истинные» химические связи представлены ковалентными дисульфидными связями **(b)** и ионными связями между карбоксильной и аминогруппой **(c)**. Связи Van der Waals представлены водородными связями между двумя диполями **(a)** и связями переменной полярности между остатками углеводорода, ответвляющимися от основной макромолекулы **(d)**, где обозначенная пунктиром область указывает безводную зону. (*Приведено из Парфит и Рочестер, 1986.*) Более подробные объяснения см. в тексте.

Межмолекулярные силы связывания основаны на электростатических эффектах двух типов: переменные полярности и постоянные полярности – диполи. Переменные полярности возникают, когда молекулы приближаются, создавая, таким образом, возмущения в электронных облаках друг друга. Это вызывает синхронно переменные полярности в молекулах, позволяющие установить связь между

ними. Связывание, опосредованное переменными полярностями – общее свойство вещества. Эта связь, очевидно, является тем более сильной, чем больше размер молекулы (*Парфит и Рочестер, 1986*). Кроме того, молекулы могут обладать постоянной полярностью, через которую они могут связаться друг с другом просто, укладывая диполь против диполя, как показано на рисунке 9а.

Сила связывания, опосредованного переменными полярностями, обратно пропорциональна седьмой степени расстояния, тогда как сила дипольного связывания обратно пропорциональна только второй степени расстояния (*Рамунссен, 1991*). Следовательно, силы переменных полярностей имеют намного более короткий диапазон, чем дипольные.

Связи Van der Waals приблизительно в 100 раз слабее, чем ионные, а водородная связь в 10 раз сильнее других дипольных взаимодействий (*Парфит и Рочестер, 1986*). Химические группы, которые могут принять участие в образовании водородной связи, например, $-\text{OH}$, $=\text{O}$, $-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $\equiv\text{N}$, называют гидрофильными, в противоположность связям, обусловленным переменными полярностями, которые называют гидрофобными (*Esser, 1997*). В водных растворах полипептидная цепь белков уложена так, что на поверхности молекулы расположено максимально возможное число гидрофильных групп, а гидрофобные группы находятся преимущественно внутри белковой глобулы. Однако даже в высокогидрофильных белках на поверхности молекулы всегда имеются гидрофобные домены (*Рамунссен, 1991*).

Поверхности гидрофильных материалов несут на себе большое количество полярных и ионизированных групп, благодаря которым белковые макромолекулы адсорбируются значительно легче. Белки на таких поверхностях способны конкурировать с молекулами воды за связывание путем водородных связей и могут быть захвачены на большом расстоянии электростатическими силами дальнего действия с последующим образованием водородных связей. В то же время макромолекулы могут быть удалены с гидрофильных поверхностей при отмывках растворами с высокой ионной силой или экстремальными значениями pH (*Kusnezow and Hoheisel, 2003*). Поверхность гидрофобных материалов имеет мало заряженных групп и соответственно низкий поверхностный потенциал. Электростатические силы дальнего действия здесь выражены

слабо, а для образования гидрофобных связей молекулы должны очень близко подойти к поверхности. Таким образом, для достижения эффективной адсорбции на гидрофобных поверхностях требуются более высокие концентрации белков, более длительная инкубация, в ряде случаев более высокая температура и агитация сорбционной смеси. В то же время, если связывание с такой поверхностью произошло, макромолекулы удерживаются на ней очень прочно. Поэтому в качестве твердой фазы предпочтительно используются поверхности с преобладанием гидрофобных свойств, хотя они, как правило, имеют и гидрофильные участки и адсорбция на них белков включает все описанные выше механизмы (*Рамунсен, 1991*).

Распространена гипотеза (*Carney et al., 2006; Robinson, 2002*) о том, что в механизме связывания белков с твердой фазой важную роль играют остатки отдельных аминокислот:

- лизин имеет высокий положительный заряд и электростатически взаимодействует с отрицательно заряженными группами подложки;

- аминокислоты с высокой гидрофобностью (например, тирозин и триптофан) связываются с поверхностями гидрофобными связями. Для белков с высоким содержанием таких аминокислот (например, иммуноглобулины), это важный компонент общего закрепления, который объясняет, почему длительная экспозиция сенсibilизированной твердой фазы в буферном растворе, содержащем детергенты, часто приводит к потере активности;

- цистеин создает донорские связи путем формирования сульфидных мостиков с поверхностью твердой фазы, при этом иммунореагент и материал подложки имеют общие электроны. Из всех взаимодействий, участвующих в адсорбции белков, это самое сильное, наиболее стабильное и прочное. По этой причине нужно избегать включения в сорбционный буфер компонентов, содержащих серу таких, как меркаптоэтанол или мертиолят натрия (*Carney et al., 2006*).

Успех процесса иммобилизации в значительной степени зависит от локализации остатков этих аминокислот в адсорбируемом белке. В некоторых случаях, неудачно локализованная аминокислота может связаться с подложкой таким образом, что твердая фаза фактически становится помехой для специфической связывающей

активности белка. Такой тип помех называется «стерическими помехами» и может встречаться, когда указанные аминокислоты локализуются в связывающей антиген (Fab) области антител, или в области рабочих активных эпитопов антигенов. Для достижения оптимальной чувствительности иммунологического анализа важно, следовательно, чтобы аминокислоты, вовлеченные в механизмы иммобилизации, были расположены соответственно. Для антител, они должны локализоваться в Fc области. Для антигенов, они должны быть физически изолированы от рабочих активных эпитопов (*Carney et al.*, 2006).

Пространственная структура белка поддерживается за счет физических и/или химических взаимодействий между боковыми группами полипептидной цепи. При связывании с твердой фазой часть этих взаимодействий нарушается, в результате чего белок может денатурировать (*Памунссен, 1991; Guire, 1999; Kusnezow and Hoheisel, 2003; Kusnezow et al., 2003; Kozarova et al., 2006; Liu and Li, 2012*). Поэтому, рассматривая связывающую емкость адсорбирующих носителей для биологических макромолекул, нужно различать общую сумму молекул, которые могут быть связаны с поверхностью, и количество иммобилизованных биологически активных молекул. Оба эти показателя зависят от природы молекул, характера поверхности и состава реакционной среды. Химический состав, ионная сила, pH и температура раствора влияют как на эффективность иммобилизации белка, так и на его специфические свойства (*Cantarero et al., 1980; Guire, 1999; Wilson and Nock, 2003; Sinclair, 2013*).

Считается, что физическая адсорбция тем эффективней, чем меньше ионная сила раствора (*Парфит и Рочестер, 1986; Raska, 1988*). Однако отсутствие или недостаток ионов в растворе могут вызывать катастрофические конформационные изменения (*Скоунс, 1985*), поэтому иммобилизацию белков обычно проводят из растворов с ионной силой в диапазоне 0,01–0,005 М, обеспечивающей устойчивость структуры макромолекул и необходимый уровень pH. Известно, что наиболее эффективное и прочное связывание белков с твердой фазой происходит в том диапазоне pH, где белок имеет нейтральный общий заряд – в так называемой изоэлектрической точке (pI) (*Raska, 1988*). Рекомбинантные антигены, по-

лученные в виде химер с фрагментами микробиологических ферментов, обычно имеют изоэлектрические точки в области рН 5,0–6,5, а иммуноглобулины – в области 7,5–9,0 и в этих диапазонах следует ожидать наиболее сильных взаимодействий. Однако слишком сильное взаимодействие белка с твердой фазой также может вызывать нарушения структуры белка и ослаблять или устранять их специфическую активность. Поэтому сорбцию специфических белков принято осуществлять в области рН, немного превышающей значение изоэлектрической точки, где и белок, и подложка имеют общий заряд одного знака (*Esser, 1997*). Буферные растворы составляют на основе солей, имеющих многовалентные ионы (фосфаты, карбонаты, бораты), которые вносят свой вклад в ионные взаимодействия (*Скоунс, 1985*).

Концентрация белка в сорбционной смеси также имеет существенное значение (*Esser, 1997*). Слишком высокие концентрации могут приводить к плотной упаковке макромолекул на поверхности адсорбента, к ограничению площади связывания, а, следовательно, к снижению прочности удерживания иммунореагента на твердой фазе (*Peluso et al., 2003*). Следствием низких концентраций антигенов могут быть недостаточное насыщение поверхности подложки и, возможно, изменение конформации молекул за счет образования множественных связей с поверхностью (*Cretich et al., 2006*).

Один из ведущих специалистов фирмы «Nunc Laboratories» Р. Esser (1997) в своих рекомендациях приводит теоретические расчеты максимальной удельной емкости поверхности носителя при различной упаковке монослоя иммобилизуемого белка. На примере молекулы IgG, принятой за линзообразный сфероид с диаметром 15 нм и толщиной 3 нм, показано, что максимальная емкость при вертикальной ориентации молекул составляет 650 нг IgG на 1 см² поверхности подложки, а при горизонтальной ориентации молекул эта емкость составляет 130 нг/см². Ориентация иммобилизованных антител в ряде случаев может иметь критическое значение при количественных определениях (*Bonroy et al., 2006*). Поскольку каждое IgG-антитело может максимально связать две молекулы антигена, уменьшение числа адсорбируемых антител на подложке может иметь, тем больший эффект, чем мельче молекулы связываемого ими антигена (см. рис. 10).

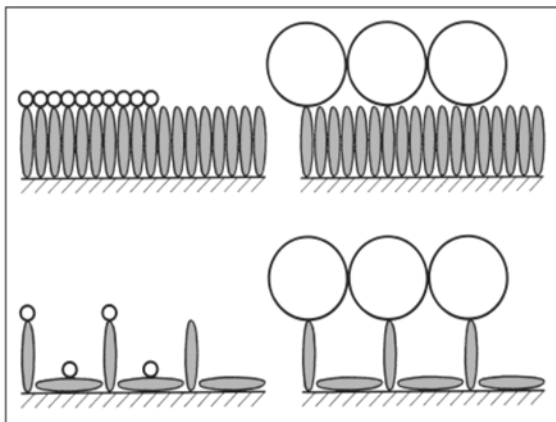


Рис. 10. Профили второго слоя (антиген), связанного с первичными антителами, различно ориентированными на поверхности подложки, иллюстрирующие, как различия в ориентации адсорбированных молекул IgG могут повлечь уменьшение количества связанных мелких молекул антигена (слева), но не больших молекул антигена (справа). (Приведено из P. Esser, 1997.)

Существенное влияние на эффективность сорбции имеют температура и время инкубации сорбционной смеси на подложке. При подготовке полистирольных планшетов для ИФА сорбцию проводят либо в течение 18 часов при 4°C , либо в течение 2 часов при 37°C . Такая инкубация необходима для осуществления диффузионных процессов, правильной ориентации молекул, образования гидрофобных и других взаимодействий между белком и материалом подложки (Скоупс, 1985).

Способ иммобилизации белков на плоской матрице имеет свои особенности. Обычно белки захвата наносятся на поверхность подложки в виде капель очень малого объема (от 10 нл до 1–2 мкл). Такие капли быстро высыхают и этого времени часто недостаточно для осуществления вышеописанных процессов адсорбционного или ковалентного связывания. Известны случаи иммобилизации белков на охлажденную подложку или из растворов глицерина (Ekins, 1998), замедляющих процесс высыхания, однако эффективность связывания при этом снижается. Наиболее эффективным приемом, улучшающим адсорбцию белков на подложку матрицы, является выполнение этой операции при низкой температуре в

условиях влажной камеры, хотя и простое помещение подложек с нанесенными белковыми растворами в холодильник при 4°С до высыхания капель дает удовлетворительные результаты. В любом случае после испарения капель растворов, подложки должны быть тщательно просушены при повышенной температуре для образования гидрофобных связей белков с поверхностью матрицы. Для подложек, изготовленных из синтетической бумаги на основе поливинилхлорида или полипропилена, сушка должна выполняться не менее 2–3 ч при 45–50°С.

Большое число публикаций по вопросам изыскания материалов для изготовления матрицы и способов фиксации на них белков свидетельствует об отсутствии универсальных подходов и неудовлетворенности исследователей таким положением. По мнению D. Carville (2007), выбор поверхности и способа для связывания антител, является наиболее значительно вариабельной областью в иммунодиагностических исследованиях прошлых лет. Следует добавить, что как разные материалы подложки, так и различные иммунореагенты имеют свои особенности, влияющие на эффективность сорбции (*Stafford and Johnston, 2011*). Общей теории, убедительно описывающей все аспекты сорбционного связывания белков с поверхностью твердой фазы, до сих пор не создано, хотя предложено несколько гипотез (*Norde and Luklema, 1979; Norde, 1979; Cantarero et al., 1980; Urbanek et al., 1985*). Очевидно, что в каждом отдельном случае теоретически определить условия эффективной сорбции можно лишь приблизительно, задавая довольно широкие диапазоны для отдельных факторов. Таким образом, для выбора условий иммобилизации нет никакого общего правила. Единственным надежным показателем могут служить экспериментальные результаты (*Stewart et al., 2006*).

Системы детекции

Важной составляющей, которая способствует чувствительности иммуноанализа, является система детекции, которая используется для обнаружения факта 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 сигнальные метки (репортеры). К свободным от метки относятся такие методы, как масс-спектрометрия, 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 лабораторий и клиник (*Cretich et al., 2006*).

Стратегии детекции с мечеными зондами предполагают применение иммунореагентов, связанными с фотоэмиссионными, радиоактивными или хромогенными метками (*Delehanty and Ligler, 2002*). Учет результатов основан на обнаружении метки, иммобилизованной за счет иммунохимического связывания, на определенных участках поверхности белковой матрицы.

Фотоэмиссионные методы используют флуоресцентные, люминесцентные, хемилюминесцентные метки (*Nielsen and Geierstanger, 2004*). Преимущество таких методов заключается в том, что для них не нужна процедура проявления, за счёт чего укорачивается время анализа. В большинстве существующих вариантов анализа на основе ДНК или белковых матриц используется флуоресцентная детекция (*Ekins, 1998; Espina et al., 2004; Nielsen and Geierstanger, 2004*). Флуоресцентные молекулы поглощают фотоны световой энергии из внешнего источника света, это приводит к возбуждению электронов в пределах молекулы репортера и эмиссии света с длиной волны, отличной от падающего света. Флуорофоры имеют разнообразные формулы и спектры эмиссии. Выбор флуорофора для использования на микроматрицах зависит от типа исследуемого образца, подложки, и числа анализов (*Espina et al., 2004*). Используются флуоресцеин, родамин, производные акридина, цианины и другие вещества и составы.

В последнее время получили популярность неорганические фотоэмиссионные метки – так называемые «квантовые точки» (КТ). КТ – наночастицы, обладающие уникальными настраиваемыми по составу и размеру оптическими свойствами. Они обладают широкой полосой поглощения и узким размерно-зависимым симметричным пиком излучения, высоким квантовым выходом флуоресценции, устойчивостью к фотообесцвечиванию, повышенной яркостью и более высоким отношением сигнал/шум по сравнению с традиционными органическими флуорофорами (*Alivisatos et al., 2005; Chan, 2007; Rousserie et al., 2010; Осипов и др., 2015*). Кроме того, КТ (например, с разным размером ядра) могут одновременно возбуждаться от одного источника, а производить эмиссию в других части спектра с узкими пиками излучения. Такие КТ могут объединяться в тесте на одной тестовой зоне (одном пятне) без спектрального перекрытия, что значительно упрощает реализацию мультиплексного анализа (*Sapsford et al., 2006*). Кроме того, использование КТ, генерирующие разные цвета на одной матрице, позволяют легче отличить результаты между различными аналитами (*Foubert et al., 2016*). Однако для обеспечения высокой чувствительности мультиплексного анализа с использованием КТ необходима аппаратура, позволяющая вычленять и регистрировать спектры эмиссии, что значительно сдерживает применение КТ в портативных и автономных наборах для иммуноанализа (*Singh et al., 2020*).

Хемилюминесценция – люминесценция, сгенерированная химической реакцией. Хемилюминесцентные методы используются для обнаружения комплекса первичных антиген-связанных антител с вторичными антителами, связанными со щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена. Ферментное окисление субстрата, типа люминола, производит длительную эмиссию света, который фиксируется рентгеновской пленкой, фосфорным визуализатором или с цифровой камерой. Хемилюминесцентные методы могут использоваться в любом из методов детекции с мечеными зондами. Преимуществами хемилюминесцентных методов являются высокая чувствительность и скорость, а недостатками – ограниченный диапазон изменения сигнала и необходимость в специальной аппаратуре и квалификации оператора (*Fukushima et al., 2003*).

Все фотоэмиссионные методы основаны на технологиях регистрации светового излучения. Электронная промышленность с ее успехами в разработке лазеров, волоконно-оптической техники,

светоизлучающих диодов и фоточувствительных элементов предоставляет огромные возможности для создания регистрирующей аппаратуры. Так Nanogen Inc. (San Diego, США) для создания регистрирующих приборов следующего поколения переключилась со сложных лазерных систем на высокоэффективную фотоаппаратуру (подобную аппаратуре, использующейся в космических телескопах). Такие системы существенно дешевле и в то же время позволяют при той же чувствительности в десятки раз сократить время регистрации сигнала. Однако и такие регистрирующие приборы имеют стоимость порядка 300.000 долларов, а стоимость анализа с их применением будет составлять 50–100 \$ (Lidgard, 2006). Таким образом, флуорофорные методы применимы для анализа на плоских матрицах, однако требуют сложной специальной аппаратуры. Это ограничивает их широкое применение в клинической диагностике.

Результаты радиоизотопного анализа могут быть учтены относительно простым способом радиографии, при котором иммобилизованные на матрице радиоизотопы, например ^{135}J , производят фотоотпечаток при контакте с фоточувствительными материалами. Однако работа с радиоактивными изотопами небезопасна для здоровья исследователей и требует создания специальных условий, а для учета результатов радиографией необходимо длительное время (от нескольких часов до суток). В связи с перечисленными причинами метод не находит широкого применения для анализа на плоских матрицах (Dai, 2006).

Хромогенная детекция на белковых матрицах генерирует стабильные сигналы, которые легко анализируются визуально. Для хромогенных реакций на матрицах наиболее часто используются зонды с ферментной меткой. Фермент действует, преобразуя бесцветный субстрат в окрашенный преципитат, контрастирующий место иммунной реакции. Обычно используемые ферменты для хромогенных реакций – пероксидаза хрена (ПХ) и щелочная фосфатаза (ЩФ) (Panac и др., 1991; Dietrich et al., 2004). Субстраты, наиболее часто используемые при проявлении этих маркеров, приведены в таблице 4.

Таблица 4

Субстраты, используемые при хромогенной детекции аналитов
(приведено из Папас и др., 1991)

Метка	Субстрат	Аббревиатура	Цвет
Перокси- даза хрена (ПХ)	Diaminobenzidine	DAB	Коричневый
	Diaminobenzidine с усилением NiCl ₂	DAB+ NiCl ₂	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
	Naphtol-AS-BI-phosphate/ fast red TR	NABP/FR	Красный
	Naphthol-AS-MX-phosphate/ fast blue BB	NAMP/ FB	Синий

При проявлении пероксидазных конъюгатов наиболее успешно используется диаминобензидин (DAB) (*Herzog and Fahimi, 1973*). Диаминобензидиновый преципитат стабилен и генерирует интенсивный сигнал с относительно низким фоном. Сигнал может быть усилен никелем, медью, серебром, золотом или кобальтом (*Hsu and Soban, 1982*). 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 (*Porstmann et al., 1981; Espina et al., 2004*).

Хромогенные субстраты для щелочной фосфатазы (ЩФ) включают галоидированные индолил-фосфаты, которые гидролизуются в присутствии ЩФ до образования красителей цвета индиго (*Branson et al., 1989*). В свою очередь, этот краситель восстанавливает соль тетразолия, до образования нерастворимого формазана, который, объединяясь с красителем цвета индиго, формирует цветной преципитат. Наиболее широко используемой хромоформной системой для определения локализации фосфатазной активности является nitroblue tetrazolium chloride (NBT) и 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (*Blake et al., 1984; Wiese et al., 2001; Lingwood and Ballantyne, 2006*). 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 выдает стабильный сигнал с низким фоном, но менее чувствителен, чем NAMP/FR (*Wiese et al., 2001*).

Для повышения чувствительности иммуноанализа предложены различные системы амплификации сигнала, обзор некоторых из них приведен в работе U.B. Nielsen с соавт. (2004) и проиллюстрирован на рисунке 11.

В частности, для усиления оптического сигнала пероксидазной метки применяется биотинилирамидная амплификация (см. рис 11E), получившая наименование «CARD» (catalyzed reporter deposition), снизившая предел обнаружения больше чем в 25 раз, по сравнению с обычным дот-ИФА (*Bobrow et al., 1991*). В этом методе иммобилизованная пероксидаза хрена производит радикалы биотинилированного тирамина, которые связываются со всеми остатками тирозина любого белка, находящегося поблизости от области распознавания. Последующая обработка матрицы конъюгатом метки с авидином или стрептавидином позволяет достигнуть очень высокой плотности метки в зоне распознавания.

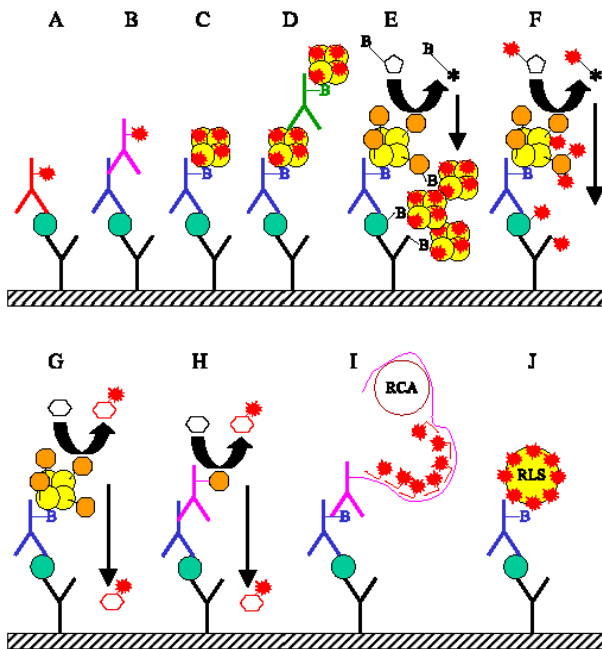


Рис. 11. Схемы генерирования сигнала, используемые при применении антительных матриц и флуорофорных меток: (A) флуорес-

центно меченые вторичные антитела обнаружения; (В) флуоресцентно меченные третичные видо-специфичные антитела; (С) связывание биотинилированных антител обнаружения с флуоресцентным стрептавидиновым конъюгатом; (D) стрептавидин-фикоэритриновое (SAPE) окрашивание, усиленное битинилированными анти-SAPE антителами и вторым слоем SAPE; (Е) стрептавидин, связанный с пероксидазой хрена увеличивает число молекул биотина на пятне антител для окрашивания флуоресцентными вариантами стрептавидина или (F) генерирует реактивные флюорофоры для связывания непосредственно с наличными остаткам тирозина; (G) стрептавидин, связанный с пероксидазой хрена или (H) щелочная фосфатаза, связанная с видо-специфичными третичными антителами активируют хемилюминесцентные субстраты или генерируют прецепитирующие флюорофоры вблизи от антител обнаружения; (I) круговая циклическая амплификация ДНК праймера, связанного с анти-биотиновыми антителами, в комбинации с гибридизацией тысяч флуоресцентно меченых олигонуклеотидов; (J) резонансное светорассеяние частицами коллоидного золота, покрытых антибиотиновыми антителами. (*Приведено из работы Nielsen et al., 2004.*)

Дальнейшее усовершенствование этого метода (модификация «Super-CARD») позволило за счет применения блокирующих белков, «обогащенных электронами» (см. рис 11F), повысить предел обнаружения в 10^5 раз (*Bhattacharya et al., 1999a, б*). Следует отметить, что такая высокая чувствительность была достигнута в модельных экспериментах с прямым обнаружением очищенных антител и антигенов. При исследовании же реальных клинических образцов результаты, полученные с применением даже наиболее изощренных схем амплификации, из-за фоновых помех не сильно отличаются от результатов обычного ИФА (*Nielsen and Geierstanger, 2004*), что подтверждает тезис о первичной и определяющей роли специфичности иммунологического связывания, а не чувствительности системы детекции. 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.

Помимо ферментных меток, для хромогенной детекции применяются неорганические металлосодержащие золи (*Fowler, 1994; Ekins, 1998; Chandler et al., 2000; Espina et al., 2004*). Коллоидное золото с серебряным проявлением использовалось в гистохимии (*Holgate et al., 1984; Moeremans et al. 1984*), в дот-анализе, а позднее на ДНК- и белковых микроматрицах (*Taton et al., 2000; Liang et al., 2004*). Для усиления сигнала при использовании коллоидного золота обычно используются так называемые «физические проявители», содержащие ионы серебра и слабые восстановители, такие как метол, гидрохинон, амидол, *p*-фенилендиамин и др. (*Lewinson and Twist, 1973; Джеймс, 1980*). 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 черно-серую окраску, хорошо различимую на светлом фоне подложки (*Oliver, 1994; Chu et al. 2005*). Скорость восстановления ионов Ag^+ пропорциональна площади реакционной поверхности золя, а масса серебра, образующегося на частицах, растет пропорционально кубу времени реакции (*James, 1939, 1941; Shuman and James, 1971; Джеймс, 1980*). С использованием 20 нм частиц золота, связанных с анти/IgG антителами, удастся выявлять до 1 пкг иммуноглобулинов класса G, иммобилизованных на чипе, с линейным диапазоном изменения сигнала – от 2 пг до 1 нг (*Liang et al., 2004*). Такая чувствительность обнаружения сопоставима с методом флуоресцентной детекции сигнала. Однако регистрацию результатов можно осуществлять визуально или с помощью недорогих устройств типа планшетного сканера или цифровой фотокамеры.

Применение простых быстрых тестов

Одной из наиболее заметных тенденций в диагностической медицине последних лет является уменьшение доли анализов, проводимых в специализированных клинических лабораториях. Все большая часть диагностических анализов выполняется во внелабораторных условиях (у постели больного, в кабинете врача или на дому). Эти изменения обусловлены техническими новациями, позволившими упростить и ускорить проведение анализов при одновременном увеличении надежности и легкости интерпретации полученных результатов, а также социальными и экономическими мотивами, допускающими решение части диагностических проблем без значительных временных и денежных затрат (*Одиторе-Харгивз и Харгивз, 1991, Evans, 2016*).

Не во всех медицинских учреждениях существуют условия для выполнения ИФА и других сложных тестов, но имеющееся оснащение и квалификация сотрудников позволяют правильно отобрать и обработать клинический материал (например, получить сыворотку крови, горловые смывы или урогенитальные пробы), точно отдозировать исследуемый образец, грамотно выполнить несложную аналитическую методику и оценить полученные результаты. Поэтому появление методик средней сложности таких, как dot-иммуноанализ стало закономерным.

Большинство быстрых простых тестов представлены в виде комплекта и не требуют использования дополнительного оборудования или реагентов. Так как процедура очень проста, состоит из небольшого количества этапов и не требует высокой точности, существует меньшая вероятность ошибки и, поэтому, действия могут быть произведены человеком с минимальными навыками работы в лаборатории. Результаты анализа могут быть получены в течение около 1 часа и учитываются визуально. Их интерпретация обычно достаточно проста. Во многих быстрых простых тестах существует внутренний контроль, подтверждающий достоверность проведённого анализа. Некоторые быстрые простые тесты могут быть использованы в качестве подтверждающих и дать ответ за короткое время. Быстрые простые тесты допускают обследование небольших групп населения и отдельных лиц. Такие тесты обычно достаточно стабильны и пригодны для хранения в диапазоне температур от 2 до 30°C (*Быстрые и простые методы определения вирусных*

инфекций в лабораторной службе России, 2004). Точность быстрых серологических тестов ставилась под сомнение в конце 80-х (*Constantine et al., 1989; Healy and Dax, 1992*). После того как часть производителей усовершенствовала эти тесты, чувствительность большинства из них стала сопоставима с уровнем чувствительности ИФА (*Soroka, 2003; Van den Berk, 2003*).

Быстрые простые тесты можно использовать во многих ситуациях, например, в приёмной врача, кабинетах доверия и учреждениях здравоохранения, где подобные обследования не носят массового характера. Кроме того, такие тесты могут использоваться для наблюдения за эпидемиологической ситуацией, при обследовании доноров для небольших банков крови, а также в случаях отсутствия или нестабильности энергоснабжения (*Таранова и др., 2014*). Быстрые серологические тесты стали методом, подходящим для выявления источника инфекции при возникновении очагов внутрибольничной инфекции, при родовспоможении необследованных беременных, для обследования доноров органов, тканей, спермы и других биологических жидкостей, а также доноров крови на территориях, где нет возможности иметь предварительно обследованного её запаса (*Faulstich et al., 2007; Singh et al., 2020*).

Точность результатов анализа зависит не только от внутренних характеристик теста, но и от уровня профессионализма персонала, оснащения лаборатории и других внешних факторов. Описанные выше свойства простых быстрых тестов сводят к минимуму влияние многих внешних факторов. Благодаря этому быстрые простые тесты можно использовать при недостаточном техническом оснащении и получать более достоверные результаты, чем дали бы технически более сложные тесты такие, как ИФА (*Быстрые и простые методы определения вирусных инфекций в лабораторной службе России, 2004; Evans, 2016*).

Различия в спектре анализов, выполняемых в кабинете врача и на дому во многом связаны с возможностями получения проб. В кабинете врача могут быть использованы различные инвазивные методы для отбора образцов крови из вены, ректальных, урогенитальных и горловых смывов и мазков. Это позволяет проводить диагностику инфекционных, аллергических, онкогенных и сердечно-сосудистых заболеваний, а также осуществлять контроль эффективности лечения. В ряде случаев тестирования в кабинете врача

достаточно для установления диагноза и начала лечения, в других случаях результаты анализов могут служить основанием для назначения целевого углубленного обследования пациента в специализированной клинической лаборатории.

В случае самодиагноза возможности пациента обычно ограничены исследованием проб мочи, слюны и крови, полученной при проколе пальца. Это дает возможность самоконтроля некоторых биохимических показателей организма и периода овуляции, а также раннего обнаружения беременности (*Carney et al., 2006; LaBorde and O'Farrell and Bauer 2006a, б*). Помимо технических проблем возможность проведения анализов на дому породила различные этические и юридические вопросы, связанные с безопасностью применения наборов для самоконтроля. Лица, не имеющие специальной подготовки, могут безоглядно положиться на результаты выполненного ими самоанализа. При этом ложноотрицательный результат приведет к тому, что больной не получит вовремя необходимого лечения, а ложноположительный – может оказать влияние на психическое состояние пациента (*Одиторе-Харгивз и Харгивз, 1991*). Кроме того, например, выявление инфекционных заболеваний должно сопровождаться как назначением адекватного лечения, так и проведением, в ряде случаев, санитарно-эпидемиологических мероприятий (изоляция, выявление контактных лиц, дезинфекция), которые могут быть выполнены только квалифицированным медицинским персоналом. Пациенты же часто стараются скрыть свое заболевание и не прибегают к врачебной помощи, что способствует неблагоприятному развитию заболевания и распространению инфекции на окружающих. По этой причине продажа наборов для самодиагностики инфекционных заболеваний врачами признается нецелесообразной (*Мей, 1991*). Применение портативных аналитических систем для обнаружения наркотиков на рабочем месте и на дому уже нашло широкое распространение в некоторых странах, однако возможность проведения такого тестирования и его последствия должны быть приведены в соответствие с существующими юридическими нормами. Таким образом, номенклатура доступных наборов для самодиагностики должна определяться не только потребительским спросом, но и государственными медицинскими и правовыми контролирующими службами, а их продажа осуществляться только через аптечную сеть.

Прогресс в развитии средств диагностики играет ключевую роль в обеспечении быстрых и точных исследований проб окружающей среды и клинических образцов при защите против биологических угроз (*Constantine et al., 1978; Speer, 2005*). Под биологической угрозой понимают отрицательное воздействие биологических патогенов любого уровня и происхождения, создающих опасность в медико-социальной, технологической, сельскохозяйственной и коммунальной сферах (*Воробьев, 2002*). Основными источниками биологической угрозы служат (*Щербаков, 2002*):

1) природные очаги опасных и особо опасных возбудителей инфекционных заболеваний человека, сельскохозяйственных животных и растений;

2) аварии и диверсии на биологически опасных объектах;

3) трансграничный перенос патогенных микроорганизмов;

4) биологический терроризм;

5) применение биологического оружия в военных целях.

В системе мер биологической защиты решающее значение принадлежит биологическому контролю. Основными задачами биологического контроля, являются обнаружение факта применения биоагента, установление вида примененного возбудителя, границ заражения, а также сроков применения и снятия средств защиты (*Храмов, 2002*). Факт наличия биологической угрозы может быть установлен путем анализа потенциально опасных объектов окружающей среды на наличие патогенных биологических агентов. При этом от скорости получения результатов анализа зависит быстрота принятия решений о локализации и ликвидации опасного очага. Существенным преимуществом использования автономных тестов неквалифицированным персоналом является способность делать быструю оценку образцов на месте происшествия, которая позволяет принимать информированные решения без задержки, связанной с внешним лабораторным анализом. Таким образом, простые портативные иммунохимические тесты рассматриваются как наиболее перспективные для получения первичного ответа непосредственно в обследуемом очаге (*Храмов, 2002*).

Методы первичного ответа наряду с достоверностью, чувствительностью и скоростью анализа должны быть пригодными для применения во внелабораторных условиях - непосредственно в обследуемом очаге (*Мельниченко, 2000; Быков и др. 2002*). Многие

требования к идеальной системе для полевого использования в анти-биотеррористическом сценарии схожи с требованиями к идеальной системе диагностического контроля для обычного использования в клинике (*Petersen and McMillan, 2002*):

- высокие показатели чувствительности и специфичности;
- быстрое выполнение;
- простота использования;
- универсальность;
- применимость к диапазону типов образцов (смыв, мазок, кровь, моча);
- рациональные методики, доступные для операторов в диапазоне уровней квалификаций;
- низкий эксплуатационный расход реагентов и оборудования;
- физическая компактность и прочность.

Дополнительные требования тестов для биотеррористического сценария включают:

- способность исследовать как пробы окружающей среды, так и клинические образцы;
- повышенную чувствительность для обнаружения низких уровней патогенов в окружающей среде или инфекции на очень ранней стадии;
- способность быстро развертываться в критической локализации; применимость в полевых условиях и адаптируемость к развивающимся угрозам (то есть, тест должен быть способен быстро прибавлять новые возможности).
- тесты, которые оценивают возможный спектр устойчивости к антимикробным средствам или наличие генетических манипуляций у микроорганизмов;
- тесты, позволяющие высокопроизводительный скрининг образцов;
- тесты, пригодные для одновременной идентификации многих патогенов в одном образце;

Основные сложности при иммунохимическом анализе образцов окружающей среды связаны, с одной стороны с необходимостью выявлять крайне низкие концентрации патогенов, а с другой сто-

роны с возможным наличием в пробе примесей, мешающих выполнению теста: препятствующих реакции антиген-антитело, затрудняющих учет реакции или конкурирующих за сайты связывания на иммуносорбенте (*Егоров и др., 1991; Kallstrom et al., 2005*). В одностадийных двухсайтовых методах выявления влияние таких примесей может значительно исказить результаты. В многостадийных методиках эффекты вредного влияния примесей могут в значительной степени нивелироваться за счет многократных отмывок, удаляющих мешающие компоненты из реакционной среды (*Nielsen and Geierstanger, 2004*).

Хотя некоторые платформы до сих пор еще только разрабатываются, изданные статьи показывают их перспективность для обнаружения отдельных или множественных патогенов с высокой чувствительностью. Если текущие тенденции продолжатся, следующие несколько лет явятся свидетелями притока новых эффективных технологий и портативной аппаратуры для специфической индикации в полевых условиях (*Tabatabai, 2005*).

Проблемы создания мультиплексных тестов

В клинической лаборатории анализа белка обычно выполняются в виде отдельных тестов для известных белков. В мультиплексном тесте анализы объединены в определенную группу для экономии и удобства. Результаты одновременного анализа являются новым типом аналитических данных для клинической лаборатории. После выполнения простого мультиплексного анализа сообщается о некоторых отдельных или всех результатах микрочипового теста. Другой тип мультиплексного анализа не сообщает о результатах отдельных тестов, а сразу подвергает эти первичные данные обработке в алгоритме, который дает один результат теста. Общая концепция использования простых, а не сложных комбинаций анализа для получения результата теста, конечно, гораздо менее спорна.

Даже простые белковые чипы могут предложить ряд преимуществ, таких как высокопроизводительный скрининг, низкий расход проб, короткое время анализа, низкая стоимость и высокая

надежность по сравнению с обычным моноспецифическим иммуноферментным анализом (*Kodadek, 2001; Duarte and Blackburn, 2017*). Однако существует ряд технических проблем, теоретических ограничений и недостаточно отработанных практических вопросов, затрудняющих определение и количественное измерение белков в мультиплексном иммуноанализе (*Ellington et al., 2010*). Эти сложности включают:

- совместимость на одном аналитическом устройстве реагентов захвата, полученных из разных источников и различающихся, по аффинности, срокам изготовления, чистоте, размерам, химическому составу и условиям иммобилизации (*Ekins, 1998; Templin et al., 2002; Cretich et al., 2006; Sun et al. 2013*);

- перекрестную реактивность реагентов захвата (*Ekins, 1998; Templin et al., 2002; PLA-Roca et al., 2012; Bastarache et al., 2013*);

- Непредсказуемость функционального состояния иммобилизованных реагентов захвата вследствие вариативности свойств белков, а также химической и структурной неоднородности материала подложки (*Sola et al., 2013; Полтавченко и др., 2016a*);

- резкие отличия концентраций одновременно определяемых аналитов (*Cretich et al., 2006; Voskuhl et al., 2014*);

- различия в составе и свойствах анализируемого матрикса (фибриноген, активность комплемента, перекрестно реагирующие иммуноглобулины и аутоантитела, различные антикоагуляционные системы и др.) (*Papp et al. 2008; Papp et al. 2012; Sauer et al., 2012*);

- вариативность в размере пятен реагентов захвата или в их плотности (*Templin et al., 2002; Bastarache et al., 2011*);

- проблемы с контролем качества результатов (*Kricka and Master, 2008; Sun et al. 2013*);

- внутренние помехи (*Bastarache et al., 2011*).

Перечисленные факторы обуславливают проблемы с точностью и воспроизводимостью мультиплексного анализа (*Hultschig et al., 2006; Kingsmore, 2006; Urbanowska et al., 2006; Kricka and Master, 2008; Sun et al. 2013*). 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 далек от совершенства.

Несмотря на коммерциализацию продукции нескольких биотехнологических компаний (*Tighe et al., 2015*), белковые микрочипы остаются инструментом, используемым лишь изредка в академических лабораториях, прежде всего из-за стоимости и, что более важно, из-за неизвестного функционального состояния и активности большинства белков, иммобилизованных на чипе (*San et al., 2013*). Для внедрения мультиплексных тестов в клиническую практику необходимо решить проблемы: доступности стандартных, специфичных и стабильных иммунореагентов; разработки рациональной конструкции тестов; автоматизации изготовления и применения тестов; использования проверенных алгоритмов для преобразования необработанных данных в диагностические результаты; контроля качества тестов (калибровка и количественное определение) (*Taylor, 2006; Tighe et al., 2015*). Кроме того, необходима разработка новых подходов административного и юридического урегулирования применения мультиплексных тестов (*Joos and Berger, 2006*). Важными факторами, сдерживающим внедрение мультиплексных тестов (особенно на начальном этапе), являются консервативность медицинской системы и нежелание персонала менять привычное оборудование и схемы работы (*Taylor, 2006*).

Собственные разработки

Выбор концепции набора для автономного мультиплексного анализа

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 учет результатов невооруженным глазом или с помощью компьютерной техники.

Ниже описаны результаты собственных исследований по созданию технологии изготовления автономных наборов для мультиплексного анализа, сочетающих достоинства мультиплексного анализа с простотой изготовления и применения иммуночипов. Технология основана на применении плоских белковых матриц с низкой плотностью нанесения реагентов захвата, конъюгатов на основе коллоидного золота, системы усиления и стабилизации оптического сигнала, визуального или инструментального учета результатов.

Основными элементами набора являются белковые матрицы (иммуночипы) и многоячеечные аналитические ванны. Общий вид основных элементов для выполнения пяти анализов приведен на рисунке 12.

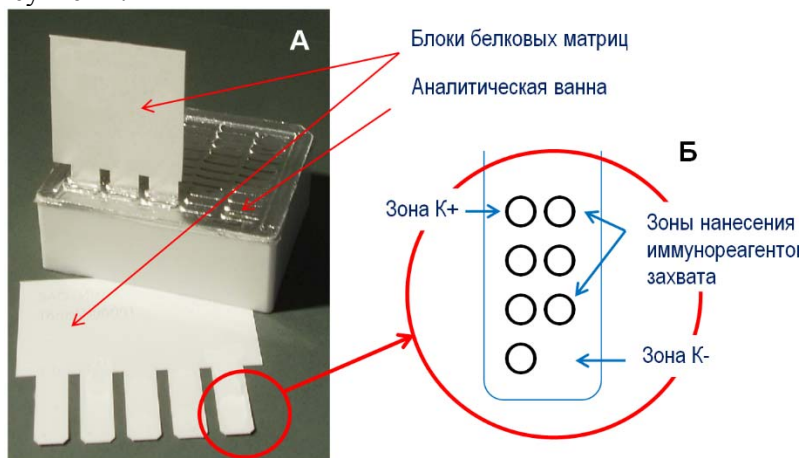


Рис. 12. Общий вид элементов набора для мультиплексной диагностики инфекционных заболеваний (А) и схема устройства рабочей части белковой матрицы (Б).

Аналитическая ванна предназначена для последовательных инкубаций белковых матриц в рабочих растворах. Ванна заполняется готовыми рабочими растворами и укупорируется, поэтому материал ванны и ее верхняя поверхность должны позволять надежную герметизацию (каждой ячейки). Размеры и уровень заполнения ячеек должны обеспечивать полное погружение рабочей части матриц в раствор.

Размеры блоков белковых матриц и аналитических ванн сопоставимы, что позволяет одновременно выполнять до 5 комплексных тестов или использовать необходимое число матриц, отрезанных от блока, и соответствующее число модулей аналитической ванны. Для выполнения индивидуальных анализов могут быть изготовлены одиночные матрицы и одномодульные ванны.

Описанный выше набор по внешним признакам сходен с моноспецифическими тест-системами «ImmunoComb» франко-израильской фирмы «Orgenics», но позволяет проводить одновременное комплексное обследование на наличие нескольких маркеров инфекционных заболеваний. Кроме того, набор значительно отличается от них по используемым материалам и техническому исполнению и содержит золото-серебряную систему детекции, позволяющую повысить чувствительность анализа и существенно снизить себестоимость теста.

Изготовление белковых матриц

Изготовление плоских белковых матриц по своей природе является процессом распределения и иммобилизации реагентов захвата на подложке (*Voskuhl et al., 2014*). Капли биологических растворов наносятся на поверхность подложки для получения адресно расположенных пятен реагентов. Пятна должны быть однородными, плотными и пространственно дискретными. Основные сложности этого процесса включают: выбор подложки, эффективно удерживающей на своей поверхности антигены и совместимой со способом детекции; подбор достаточно эффективных и совместимых иммунореагентов, а также реализация способа распределения и иммобилизации антигенов на подложке, обеспечивающего сохранность специфической биоактивности белков. Наиболее сложным и мало предсказуемым вопросом считают сохранение функциональной активности иммунореагентов захвата при иммобилизации на поверхности матрицы (*Ramachandran et al., 2005; Kozarova et al., 2006; Voskuhl et al., 2014*).

Выбор материала подложки

Выбор материала подложки является первым шагом на пути создания белковой матрицы. Как отмечено ранее, для изготовления подложек белковых матриц используются модифицированные стеклянные слайды, пористые мембраны и листовые непористые полимерные материалы.

По нашему мнению, стекло мало подходит в качестве подложки по следующим причинам: 1) стеклянная поверхность слабо удерживает адсорбированные белки; 2) эффективная иммобилизация антигенов достигается только при ковалентном связывании аминокислотных или карбоксильных групп белка с химически активированной поверхностью стекла, а ковалентное связывание является технически сложным, длительным и относительно дорогим методом иммобилизации; 3) стекло – хрупкий материал, неудобный при изготовлении и применении иммуночипов; 4) стекло – прозрачный материал, что затрудняет визуальный учет результатов.

Оценка мембран, изготовленных из смеси нитрата и ацетата целлюлозы производства фирм Millipore и Bio-Rad (США), а также отечественных мембран из поливинилхлорида, изготовленных АО Пластомер (С-Петербург), показала, что нитроцеллюлозные мембраны очень хорошо адсорбируют белки, однако изготовлены из очень хрупкого, ломкого материала, что значительно затрудняет их использование (*Полтавченко и др., 2006b*). Поливинилхлоридные мембраны эластичны и не ломаются, однако их сорбционная емкость невелика. Основным недостатком пористых мембран является сложность их отмывки от несвязавшихся компонентов реакции, особенно от золей золота, остатки же неотмытых компонентов провоцируют ложноположительные результаты. Еще одним существенным недостатком доступных пористых мембран является их высокая стоимость. Таким образом, наш опыт работы с адсорбирующими фильтрами позволяет сделать вывод об их малой перспективности для производства белковых чипов.

Листовых пластиков, специально предназначенных для использования в качестве подложки для иммунологических исследований, нам найти не удалось, а исследования представляющихся наиболее подходящими для этой цели образцов поливинилхлорида, лавсана и других подобных материалов показали их малую перспективность. Относительно неплохие результаты получены с

образцами непрозрачного листового полистирола толщиной до 0,5 мм, выпускающегося для производства разовой посуды и упаковки. Всего исследовано более 20 образцов обычного и ударопрочного полистирола. Все они показали приемлемую сорбционную способность, но требовали предварительной обработки (очистки) поверхности. Однако даже тщательно очищенная поверхность всех образцов полистирола имела участки слабо сорбирующие белки и участки, провоцирующие спонтанное проявление (*Полтавченко и др., 2006б*). По приблизительной оценке, такие дефектные участки составляли до 5% поверхности пластика. Ознакомление с технологией изготовления листового полистирола показало, что при его производстве обычно используются добавки вторичного сырья (б/у посуды и упаковки). Количество таких добавок варьирует от партии к партии и может достигать 60%. Возможно, выявляемые на пластике артефакты связаны именно с посторонними примесями, вносимыми с вторичным сырьем. Образцы чистого полистирола марок ПС и ПС-С, выпускаемого ООО «Лада-лист» (г. Тольятти), обладают гидрофильной поверхностью, затрудняющей формирование четких зон нанесения реагентов захвата и плохо удерживающей белки.

Перспективными для изготовления плоских матриц представляются доступные сорта синтетической бумаги – комбинированные пластики с матовой поверхностью, сочетающие органические и минеральные компоненты (*Полтавченко и др., 2016а*). Перечень таких материалов их свойства и источники приобретения приведены в таблице 5.

Все эти материалы изготавливаются путем добавления двуокиси титана в расплав поливинилхлорида (ПВХ) или полипропилена и прокатки полученной массы.

Таблица 5

Основные целевые свойства и источники получения материалов, потенциально пригодных для изготовления подложки белковых матриц

Материал	Марка	Поставщик	Эффективность адсорбции	Артефакты проявления	Фоновое проявление
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 «Polylith»)	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.

При исследовании материалов, в первую очередь, оценивали совместимость его чистой поверхности с применяемой в анализе системой проявления (усиления) оптического сигнала. В нашем анализе такая система представлена физическим проявителем, представляющим собой раствор нитрата серебра и восстановителя в кислой среде. Ионы серебра из раствора проявителя способны каталитически восстанавливаться на поверхности частиц золота, серебра, селена или графита с образованием металлического серебра, окрашивающего поверхность в черно-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. Оценку фонового проявления выполняли путем инкубации отмытых подложек в проявителе. Результаты такой оценки с использованием приведенных в табл. 5 материалов приведены на рисунке 13.

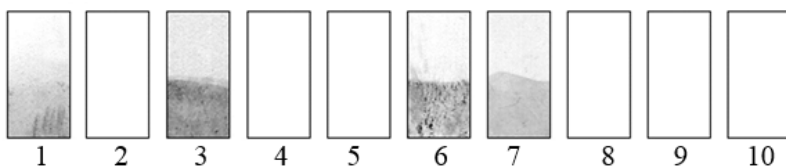


Рис. 13. Результаты оценки совместимости материалов для подложек с проявителем. Материалы: 1 – Lux-Print; 2 – Zenofol-print; 3 – пластик (ПВХ) для струйной печати; 4, 5 и 6 – синтетическая бумага «Polyolith» марок GC-3, GH-1 и PA-1, соответственно; 7, 8, 9 и 10 – синтетическая бумага «Pentaprint» марок 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. (Приведено из *Poltavchenko et al.*, 2016a.)

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, нанесенного на одну из сторон материала. Причина дестабилизирующего проявителя воздействия других материалов не столь очевидна и, вероятно, кроется в особенностях их химического состава. Такие материалы должны быть исключены из дальнейших исследований.

На следующем этапе изучали микроскопическую структуру поверхности с двух сторон образцов и параллельно выполняли на них пробную адсорбцию реагентов захвата. После выполнения дот-анализа контрольных сывороток оценивали эффективность адсорбции реагентов по интенсивности оптического сигнала в местах их нанесения; а также способность к неспецифическому связыванию компонентов, по наличию или отсутствию фоновому оптического сигнала на несенсибилизированных участках подложек. Примеры результатов такого исследования представлены на рисунках 14 и 15.

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 обозначены как «лицевые», а с более грубой – как «обратные» (на рисунке 14 и 15 они обозначены для каждого образца литерами F и R, соответственно).

Эталоном сравнения в этих исследованиях служила синтетическая бумага «Polyolith» марки GC-3, продолжительное время использовавшаяся нами для изготовления подложек. «Лицевая» сторона этой бумаги имеет достаточно однородную развитую поверхность с овальными структурами размером 1–2 мкм, прочно связывает белки и обеспечивает адекватные результаты анализа, совпадающие с результатами ИФА. Однако, этот материал в настоящее время на отечественном рынке недоступен.

Другой сорт этой бумаги (GH-1) с обеих сторон имеет гораздо более грубую структуру поверхности, чем GC-3. Несмотря на то, что качественно результаты дот-анализа на лицевых сторонах этих материалов совпадают, на бумаге GH-1 пятна выглядят размытыми и негомогенными, а на свободных от антигенов участках подложки видны

артефакты проявления. Все эти признаки свидетельствуют о структурной и, возможно, химической неоднородности поверхности.

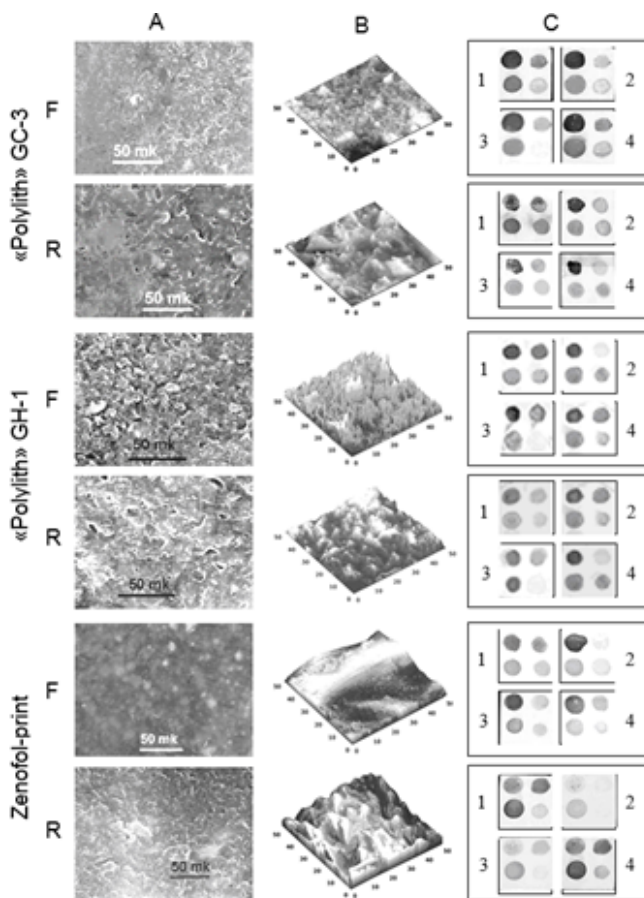


Рис. 14. Результаты оценки целевых свойств двух сторон разных сортов синтетической бумаги. Колонка А – сканирующая электронная микроскопия (масштаб указан на каждом снимке). Колонка В – атомно-силовая микроскопия (масштаб в мкм указан на шкале под образцами). Колонка С – результаты мультиплексного дот-иммуноанализа четырех контрольных сывороток, выполненного на тестируемой поверхности. F – «лицевая», R – «обратная»

сторона листа. Порядок нанесения антигенов на матрице слева направо: верхний ряд – IgG человека, лизат *T. gondii*; нижний ряд – рекомбинантный антиген цитометаловируса, рекомбинантный антиген *T. Pallidum* (приведено из Полтавченко и др., 2016а).

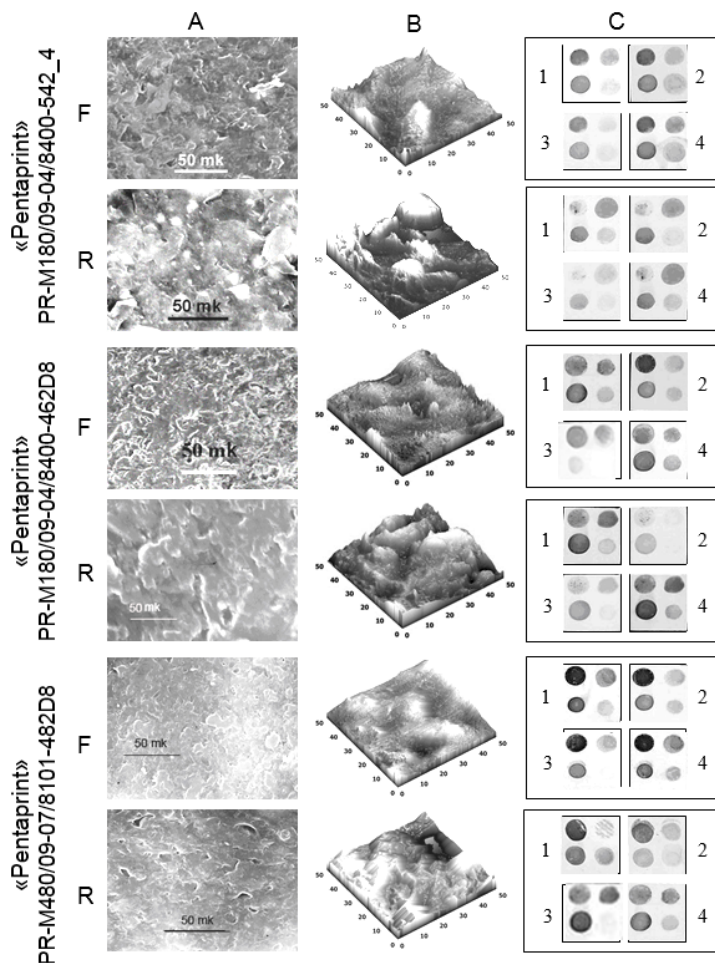


Рис. 15. Результаты оценки целевых свойств двух сторон разных сортов синтетической бумаги «Pentaprint». Колонка А – сканирующая электронная микроскопия (масштаб указан на каждом снимке). Колонка В – атомно-силовая микроскопия (масштаб в мкм указан

на шкале под образцами). Колонка С – результаты мультиплексного дот-иммуноанализа четырех контрольных сывороток, выполненного на тестируемой поверхности. F – «лицевая», R – «обратная» сторона листа. Порядок нанесения антигенов на матрице такой же, как на рис. 2 (*приведено из Полтавченко и др., 2016а*).

Согласно описанию, приведенному на сайте поставщика, бумага «Zenofol-print» имеет на одной (вероятно, «лицевой») стороне пленочное покрытие. Материал этого покрытия в описании не приводится, однако на рисунке 14 (фрагмент CF3) видно, что на его поверхности генерируется неспецифический оптический сигнал в месте нанесения антигена *T. pallidum* (сыворотка № 3 не содержит антител к возбудителю сифилиса), а другие пятна выглядят размытыми и неомогенными. «Обратная» сторона материала по всем признакам выглядит очень грубой и неравномерной.

Результаты исследования вариантов ПВХ бумаги «Pentaprint» представлены на рис. 15. 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 матриц. «Лицевые» стороны двух других марок ПВХ бумаги имеют заметно более выраженный рельеф, значительно хуже связывают белки и в ряде случаев генерируют фоновый сигнал (см. рис. 15, фрагменты PR-M180/09-04/8400-542_4 CF 2 и 4; PR-M180/09-04/8400-462D8 CF 1 и 2). «Обратные» стороны всех марок этих материалов имеют очень грубую структуру, слабо и неравномерно адсорбируют белки и 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 мкм) структурами (вероятно, кристаллами двуокиси 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 двуокиси титана, по сравнению с двумя другими образцами

«Pentaprint» (индекс 04), а известно, что двуокись титана служит хорошим адсорбентом и широко применяется в этом качестве при лабораторных работах (*Скоупс, 1985*). В-третьих – этот материал проходит финальную обработку коронным разрядом (на это указывает литера D в последнем пятизначном индексе обозначения марки), что, вероятно, повышает на поверхности ПВХ число активных радикалов, способных связываться с молекулами белков. Справедливость этого суждения можно подтвердить сравнением двух других марок бумаги «Pentaprint», имеющих одинаковое содержание двуокиси 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.

Таким образом, материалы значительно различаются по структуре поверхности, сорбционным свойствам и способности проводить фоновые сигналы. Фоновые оптические сигналы более заметно проявляются на поверхностях с грубой текстурой и, вероятно, связаны с механической задержкой наночастиц золота из конъюгата в неровностях рельефа. Из доступных исследованных материалов наиболее пригодным для изготовления подложек белковых чипов является синтетическая бумага «Pentaprint» марки PR-M480/09-07/8101-482D8, обладающая равномерной, тонкой фактурой поверхности, сравнительно высоким содержанием двуокиси титана и прошедшая финальную обработку коронным разрядом.

Предварительная подготовка материала подложек

Исследования выполнены с использованием синтетической бумаги «Pentaprint» марки PR-M480/09-07/8101-482D8, изготовленной на основе ПВХ и отобранной на предыдущем этапе как наиболее пригодный в настоящее время материал для изготовления подложек белковых матриц, а также бумаги «Polyolith» марки GH-1, как прототипа возможного перспективного варианта материала на основе полипропилена. Оптимальная толщина бумаги – 0,4-0,5 мм. Такая толщина позволяет относительно просто выкраивать подложки и обеспечивает достаточную жесткость матриц при выполнении анализа.

Подготовка подложки включает в себя ряд этапов:

- определение лицевой (рабочей) стороны;
- раскрой исходного листа;
- выкройка заготовок матриц;
- отмывка поверхности заготовок;
- сушка отмытых заготовок;
- хранение готовых заготовок матриц.

Листы той и другой синтетической бумаги имеют одинаковую ориентацию в упаковке, поэтому в пачке из 100 листов достаточно правильно определить лицевую сторону одного листа и промаркировать рабочую сторону на всем содержимом упаковки. Инструментальное определение лицевой стороны может быть осуществлено методом атомно-силовой микроскопии (лицевая сторона имеет менее грубую фактуру, более однородную поверхность и меньший размер включений на поверхности). На бумаге «Polyolith» допустимо проводить определение рабочей поверхности вручную (лицевая сторона на ощупь слегка более гладкая) или с помощью графитового карандаша (он оставляет на обратной, грубой стороне более жирный след).

Синтетическая бумага доступна в листах размером 700x1000 мм. Для работы используются листы меньшего формата (например, А3 – 297x420 мм). Раскрой всей пачки бумаги по необходимому формату может быть произведен на типографской гильотине, отдельные листы могут быть разрезаны на роликовом резаке любой марки, имеющем достаточные размеры.

Выкройка заготовок матриц

Блок матриц представляет из себя гребень с пятью зубцами, выполненный из синтетической бумаги. Чертеж с размерами блока матриц приведен на рисунке 16. Каждый зубец гребня является белковой матрицей и на него в определенном порядке наносят иммуореагенты захвата. Кроме специфических реагентов, служащих для выделения аналитов из образца, в верхней части рабочей зоны каждой матрицы наносят положительные контроли (K+), которые служат контролем работоспособности системы и уровня погружения матрицы в рабочие растворы. Нижний правый сегмент рабочей зоны оставляют свободным (K–) для контроля фоновых явлений.

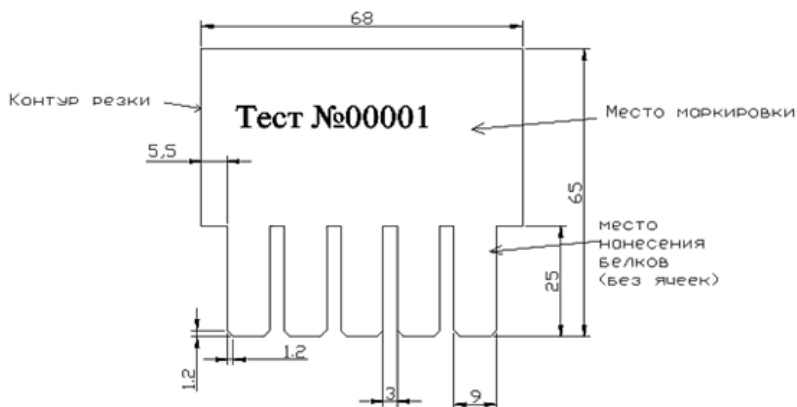


Рис. 16. Чертеж блока белковых матриц

Для повышения производительности нанесения иммунореагентов захвата с применением автоматических устройств целесообразно одновременно использовать раскроенный лист с множеством заготовок (подложек) матриц. С этой целью в программе CorelDraw подготовлен шаблон, представляющий собой лист формата А3, с прорисованными границами заготовок 100 матриц (5 рядов по 4 блока подложек в каждом). Схема шаблона для выкройки матриц приведена на рисунке 17.

В линиях контура блоков матриц и отдельных иммуночипов выполнены разрывы, оставляющие после вырезки тонкие соединительные участки пластика – линии перфорации. Это позволяет предотвратить выпадение заготовок из листа и в то же время легко разделить лист на полосы, гребёнки и отдельные иммуночипы в процессе дальнейших работ. Все элементы контуров и перфораций, ячеек выполнены различными цветами, что позволяет проводить индивидуальную настройку параметров резки либо отключить любой элемент при необходимости. На боковых сторонах листа с заготовками выполнены асимметричные отверстия, позволяющие безошибочно определять рабочую сторону листа и фиксировать его на рабочем столе устройства для автоматического нанесения реагентов захвата.

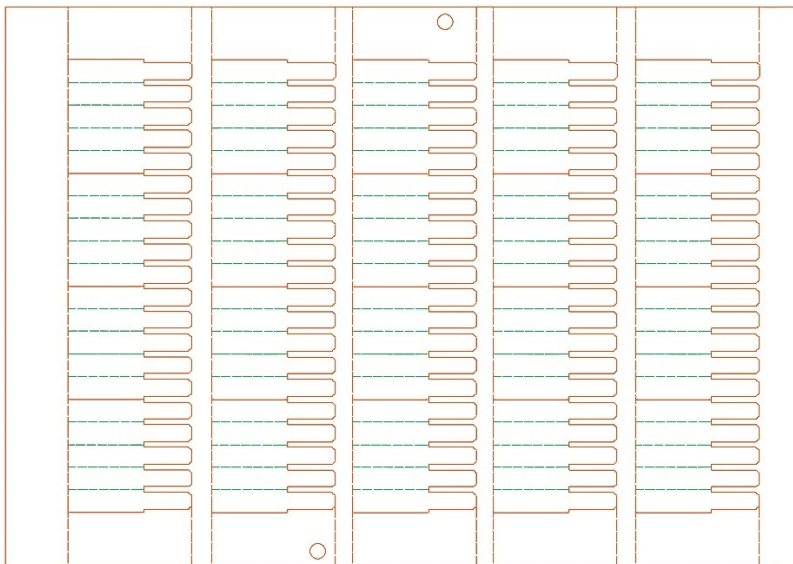


Рис. 17. Схема шаблона (формат А3) для выкройки заготовок матриц. Пояснения в тексте.

Основными требованиями к выкройке заготовок матриц являются: точность и чистота выреза, отсутствие деформаций и стойких загрязнения 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;
- выкройка при помощи лазерного гравера;
- механическая вырубка при помощи типографского пресса.

Вырезка при помощи режущего плоттера является точной выкройкой по заранее подготовленному в любой графической программе (CorelDraw, AutoCAD) векторному шаблону изделия из листового или рулонного пластика. Управляемый микропроцессором нож вырезает на поверхности материала текст, рисунок или контур любой сложности. При этом за счет правильно подобранного давления на нож, достигается необходимая глубина реза. Этот способ позволяет, в зависимости от плотности материала, прорезать пластики толщиной до 3 мм.

Тестовую вырезку по шаблону проводили силами специалистов ООО «Альфатех плюс» (г. Новосибирск) с использованием режущего плоттера Graphtec FC2250-60 с давлением на нож 600 гр. Эксперимент окончился неудачей, поскольку нож с таким давлением не позволил выполнить сквозную прорезку ни той, ни другой синтетической бумаги. Повторная попытка была предпринята на том же плоттере с использованием ножа 3OU/Force 60/60 (давление на нож 1000 г). В таком варианте устройство смогло прорезать материал по шаблону А-3 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 (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. С помощью фрезерного оборудования можно не только резать листовой пластик, но и сверлить его, делать технологические отверстия, пазы. Одно из главных преимуществ фрезерных станков нового поколения – это резка пластика на необходимую глубину, что позволяет нанести на поверхность различные маркировки. Тестовая вырезка специалистами фирмы «Штамп-плюс» (Новосибирск) на фрезерно-гравировальном станке с ЧПУ 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.

Изготовление заготовок матриц при помощи лазерного гравера. Лазерная вырезка обладает следующими преимуществами перед другими технологиями резки материалов:

- возможность выкройки по контуру любой сложности;
- высокая точность обработки;

- высокая скорость кроя;
- минимальная ширина реза;
- минимальное силовое (механическое) воздействие на материал;
- минимальная зона термического воздействия на материал;
- возможность программного управления процессом;

Лазерная гравировка основана на термическом воздействии на материал с его разрушением и является быстрым и выгодным, способом получить качественный раскрой с минимальным количеством отходов. Она подходит для работ с широким кругом материалов, но процессы разрушения полимеров разнообразны. Одни виды пластика склонны к обугливанию, другие плавятся и разбрызгиваются, третьи – испаряются без остатка. Гравировальное оборудование позволяет получить безупречный срез на материале при правильной настройке определенной скорости и мощности лазера. Такой срез не нужно дополнительно обрабатывать, поэтому полученные заготовки можно сразу использовать в производстве. Ключевыми параметрами настроек являются: мощность лазерного излучателя (Power) в процентах; скорость движения головки (Speed) в процентах и разрешающая способность в пикселях на дюйм (PPI).

Оценку эффективности лазерной выкройки заготовок выполняли с применением лазерного гравера VersaLaser 4.60 (США). Подбор оптимальных режимов настройки гравера проводили для синтетической бумаги на основе полипропилена «Polilyth» GH-1. Гравер при обработке листа формата А3 (пять рядов по четыре гребёнки) работал в «старт-стопном» режиме, а процесс прорезки занимал 8–12 минут. Лазерная выкройка обеспечивала высокую точность и чистоту реза без деформации материала, однако выявила существенный недостаток такого подхода – образованные при термическом разложении полипропилена в области реза продукты горения, откладывались на рабочей поверхности материала, не поддавались отмывке и провоцировали возникновение артефактов и высокого фона при выполнении дот-анализа. Для снижения эффекта загрязнения поверхность листа предварительно с обеих сторон изолировали смоченной водопроводной водой фильтровальной бумагой или наносили защитное покрытие (глицерин). Эти

меры позволяли снизить уровень загрязнений, но полностью устранить их не удалось. На рисунке 18 приведены типичные примеры загрязнения матриц при лазерной резке.

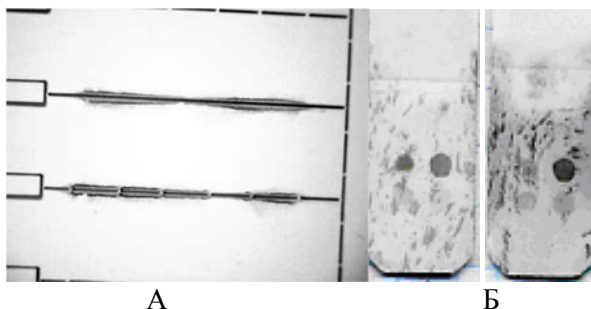


Рис. 18. Загрязнения матриц при лазерной резке. А – вид заготовок после лазерной резки, видны продукты горения полипропилена вдоль разреза материала. Б – вид матриц после выполнения дот-иммуноанализа, видны артефакты проявления в местах загрязнения.

Более удачным оказался другой прием борьбы с продуктами горения – изменение настроек лазера и шаблона выкройки. Снижая мощность лазера, увеличивая скорость и снижая РРІ изображения можно добиться неполной прорезки материала. В результате этого снижается общий выброс продуктов горения, а по всему контуру реза остается тонкий слой пластика, что позволяет гребенкам отлично держаться в листе и, в то же время, легко разделять лист на отдельные элементы при последующей работе. Кроме того, при прорезке раскраиваемого листа с «обратной» стороны, этот тонкий слой пластика препятствует загрязнению «лицевой» (рабочей) поверхности.

Такую выкройку производили по новому шаблону, в котором пунктирные линии заменены на сплошные, что позволило избежать «старт-стопного» режима резки и ускорить обработку листа. Эмпирически подобран режим работы гравера (мощность 35%, скорость 20%, разрешающая способность 150 ррі), позволяющий прорезать лист толщиной 0,45 мм на оптимальную глубину и сократить время выкройки 100 заготовок до 3–4 минут против 8–12 минут по старому шаблону.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов удалось изготовить шаблон и подобрать оптимальные режимы вырезки заготовок гребёнок из синтетической бумаги «Polilyth» марки GH-1 (0,45 мм), отвечающие требованиям по чистоте материала, скорости изготовления заготовок и стоимости.

К сожалению, метод лазерной резки оказался 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.

Механическая вырубка при помощи типографского пресса. Такой метод считается оптимальным по скорости изготовления большого количества однотипных деталей. Работы проводились на двух типах синтетической бумаги на основе полипропилена («Polilyth») и ПВХ (Pentaprint) толщиной 0,45 мм. Для вырубки заготовок гребёнок с помощью механического пресса высокого давления специалистами ООО «Лазер ТК» (г. Новосибирск) изготовлена штанцевальная форма по шаблону для лазерной вырезки (см. рис. 16). Схема устройства штанцформы приведена на рисунке 19.

Плоская штанцевальная форма состоит из основания с укрепленными в нем ножами. Основание может быть изготовлено из различных материалов, наиболее распространенным из которых является фанера из твердых пород дерева. Вдоль контура ножей, проникающих при штанцевании вглубь обрабатываемого материала, на обращенную к обрабатываемому материалу поверхность основания приклеиваются выталкивающие (эжекторные) элементы. Они могут иметь различный профиль сечения, быть изготовлены из различных материалов (резина, пробка, специальные материалы), обладающих различной твердостью и временем релаксации. Применение конкретного эжекторного материала определяется характеристиками обрабатываемого материала, а также типом и производительностью штанцевального оборудования.

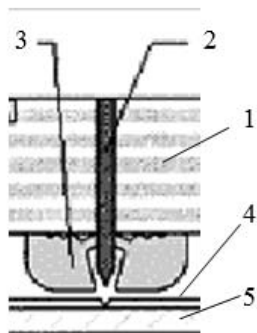


Рис. 19. Устройство штанцевальной формы для вырубки заготовок матриц при помощи типографского прессы. 1 – основание штанцформы, 2 – режущая линейка (нож), 3 – эжектор, 4 – раскраиваемый материал, 5 – рабочий стол.

После ряда экспериментов с участием специалистов ООО «Элит-Пак» (г. 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 серийно выполнять такую операцию найти не удалось.

В результате принято решение уменьшить размер штанцевальной формы до одной полоски с 4 гребёнками и отказаться от перфорации между отдельными матрицами. Такой подход в несколько раз сократил число и площадь ножей на штанцформе и, соответственно, увеличил удельное давление на каждый нож. После ряда успешных вырубок выяснилось, что при рубке возникает растяжение материала (около 0,1 мм на нож) на границах воздействия. Для компенсации деформаций были внесены корректировки в штанцевальную форму. Окончательный вариант шаблона для вырубки приведен на рисунке 20.

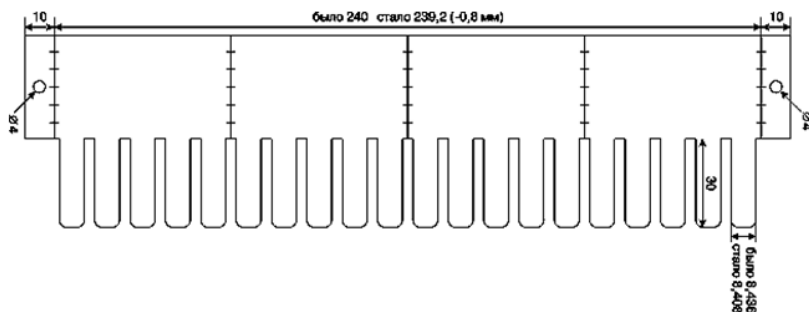


Рис. 20. Шаблон штанцформы для вырубki заготовок матриц типографским прессом. На рисунке приведены допуски, компенсирующие увеличение размеров при вырубке.

Серийная вырубка заготовок с использованием новой штанцформы выполнялась сотрудниками типографии ООО «Деал» (Новосибирск) на тигельном прессе KLUGE E-14 с давлением натиска 40 тонн при рабочей температуре 25°C. В качестве материала эжекторных элементов изначально использовалась мягкая резина. При этом на зубцах блока матриц образовывалась заметная деформация по плоскости, затрудняющая дальнейшую работу. Для устранения этого дефекта в качестве эжектора был использован изолон, толщиной 10 мм. Незначительные остаточные дефекты по плоскости, возникающие в результате вырубki, легко могут быть устранены прогревом заготовок в течение нескольких минут при температуре 50–60°C. Примерный ресурс описанной штанц-формы для вырубki заготовок из того и другого вида синтетической бумаги составляет 15 тысяч оттисков при стоимости штанц-формы около 15 тыс. руб.

Таким образом, отработанные приемы вырубki заготовок матриц пригодны для изготовления подложек как из бумаги на основе полипропилена, так и из ПВХ пластиков и отвечают требованиям технологичности, чистоты материала и цены.

Отмывка поверхности заготовок

Поверхность пластика обычно несет на себе остатки компонентов, используемых при его производстве (минеральная смазка, пластификаторы, порошки для предотвращения слипания листов), и банальные загрязнения (жир, белки). Кроме того, грязь на поверхность материала может попадать в процессе изготовления заготовок матриц их транспортировки и хранения. Эти загрязнения поверхности могут с одной стороны снижать эффективность иммобилизации антигенов, а с другой – вызывать неспецифическое связывание биокомпонентов 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 щелочи, а для удаления стойких жировых загрязнений – обработку растворителями. Влияние таких видов обработки на специфический и фоновый оптические сигналы на матрице были исследованы нами в течение предыдущего периода (*Полтавченко и др., 2006b*).

Для синтетической бумаги наиболее эффективным способом обработки оказались отмывки с применением додецилсульфата натрия (SDS) 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 SDS, которые могут удерживаться на поверхности бумаги и препятствовать связыванию с ней белков (*Lechtzier et al., 2002*). Однако такой способ подготовки пластика оказался недостаточно технологичным и экологичным при обработке больших объемов материала, поэтому изыскание более приемлемого способа очистки поверхности синтетической бумаги было продолжено. В результате были предложены два варианта обработки:

– механическая отмывка с применением губки в 0,2-процентном теплом (40°C) растворе детергента 7-X (Sigma, США) с последующим промыванием заготовок в двух сменах дистиллированной воды и сушкой на воздухе;

– отмывка в трех 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.

Первый вариант пригоден для отмывки цельных листов и полос с заготовками матриц, вырубленных типографским прессом; а второй – для листов формата А3, раскрытых лазером (отмывка таких листов с применением губки связано со значительными трудностями). Оба способа обеспечивают сходную эффективность сорбции белков на поверхности синтетической бумаги.

Сушка и хранение подготовленных подложек

Предварительная сушка листов осуществляется в вертикальном положении до момента стекания излишков воды с поверхности. Окончательная сушка осуществляется в термостате при температуре 56°C в течение 14–16 часов.

Высушенные листы с заготовками матриц одной партии хранят пачками, упакованными в чистые полиэтиленовые пакеты. На каждой упаковке наносят маркировку с датой подготовки, способом и режимами резки, режимами отмывки и сушки.

Распределение реагентов захвата на подложке

Важным этапом изготовления белковых матриц является точное дискретное дозирование реагентов захвата (от 3 до 12) на подложку матрицы в виде капель, имеющих определенный размер и расположение. Успешность диагностики во многом зависит от чистоты, гомогенности и стандартности нанесения белков. Ручное нанесение капель антигенов на подложку малопроизводительное, сопряжено с высокой вероятностью брака и не годится для масштабного производства. Основной задачей автоматического устройства для распечатывания антигенов является раздельное, строго локализованное нанесение на подложку матрицы различных белковых растворов в форме пятен размером 1,5–2 мм с четко ограниченными контурами.

В предыдущих главах были рассмотрены различные варианты автоматического и полуавтоматического нанесения растворов белков на подложку. Наиболее перспективным решением для количественного бесконтактного дозирования реагентов представляется

система, в которой объемный насос или избыточное давление используются для подачи реагента в бесконтактный диспенсер. Однако найти коммерческий вариант такого устройства, удовлетворяющий описанным выше требованиям точности позиционирования и объема капель, не удалось, в связи с чем возникла необходимость в конструировании нестандартного устройства, отвечающего следующим требованиям:

- регулируемое и автоматическое позиционирование печатающей головки в трёхкоординатной системе (оси X, Y, Z) над поверхностью рабочего стола с размером зоны обработки не менее 420 x 300 мм;
- обеспечение точности нанесения капель по осям X и Y 0,1 мм;
- регулируемое позиционирование уровня матрицы наконечников над уровнем подложки по оси Z;
- автоматическое позиционирование блока наконечников в режиме промывки по оси Z с погружением в промывочную ванну вне области печати.
- возможность одновременной работы дозаторов в количестве от 4 до 12 шт.;
- обеспечение объемов капли от 0,1 мкл до 3 мкл;
- обеспечение скорости формирования белковых матриц не менее 50 шт/мин;
- возможность промывки внутренних каналов устройства и клапанов в проточном и импульсном режимах;
- обеспечение избыточного давления инертного газа в емкостях с растворами;
- контроль технических и технологических параметров процесса розлива.

Кроме того, прибор не должен снижать активность и специфичность антигенов, повреждать и загрязнять матрицу в процессе печати, быть относительно простым в рутинном использовании, допускать частую влажную очистку рабочих поверхностей.

В основу разработки диспенсера положено одно из решений бесконтактного дозирования, представляющего собой систему, в которой реагенты для нанесения находятся под давлением, а клапан управляется электрически. При кратковременном открытии клапана, жидкость под давлением «выбрасывается» наружу и по-

падает на подготовленный материал, расположенный на координатном столе. Локализация зон нанесения может программироваться пользователем с учетом координат стола и расположения системы сопел, подающих жидкость из головки диспенсера. Клапаны соединены гибкими полимерными трубками с ёмкостями для жидких реактивов, в которые подается избыточное давление от системы подготовки сжатого нейтрального газа. Система клапанов с ёмкостями для реагентов захвата и блоком электронного управления составляют печатающую головку диспенсера. Головка перемещается относительно материала в двухкоординатной системе развертки. Система развертки представляет собой ортогонально расположенные и скрепленные между собой однокоординатные приводы на основе шарико-винтовых пар (ШВП) и моментные двигатели с датчиками координат. Оба привода также содержат концевые датчики, ограничивающие диапазон перемещения узла, укрепленного на ШВП. На верхнем приводе (координата X) укреплена головка диспенсера, на нижнем (координата Y) – операционный стол с двумя штифтами, предназначенными для точного позиционирования заготовок матриц. Слева от стола расположена съемная ультразвуковая ванночка для слива жидкостей из емкостей и осуществления промывки наконечников клапанов. В режиме промывки головка перемещается вне зоны рабочего стола с погружением в ультразвуковую ванну (ось Z).

Открытие клапанов производится при совпадении положения соответствующего клапана с заданной позицией относительно операционного стола. Создание избыточного давления в жидкости производится при помощи станции подготовки сжатого нейтрального газа. Сжатый газ из баллона через распределительную систему подаётся в ёмкости с растворами белка. Основные функциональные элементы и узлы устройства представлены на рисунке 21.

Управление диспенсером производится с персонального компьютера при помощи специальной программы. С помощью ее оператор задает необходимые параметры для работы диспенсера: параметры листа с заготовками матриц и координаты привязки листа к операционному столу; время открытия клапанов и рабочее давление воздуха, определяющие объемы капель иммунореагентов; время и режимы промывки клапанов перед началом работы, после

её окончания и т.п. Эти параметры изначально задаются разработчиком диспенсера, и могут изменяться лишь по необходимости. Допуск к изменению этих параметров защищен паролем. Общий вид диспенсера приведен на рисунке 22.

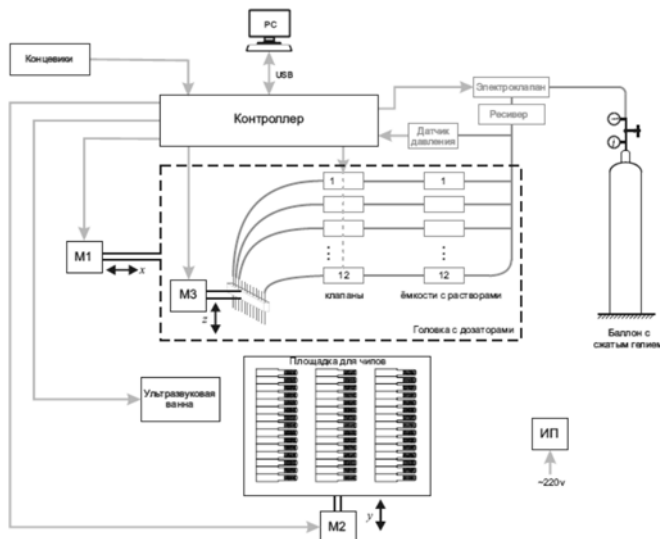


Рис. 21. Структурная схема диспенсера. M1, M2, M3 – шаговые двигатели PC – персональный компьютер с USB интерфейсом ИП – источник питания.

Технические характеристики диспенсера

Способ сканирования	векторный, растровый
Максимальный размер рабочего стола, мм×мм	420 x 300
Количество каналов одновременной капельной печати	11
Погрешность позиционирования печатающей головки, мм	0,025
Диапазон изменения размера капли, мкл	0,05–2
Скорость формирования матриц, не менее, шт/мин	100

Обрабатываемые материалы	бумага, пластиковые пленки
Габаритные размеры, мм	1000 × 1350 × 800
Вес, кг	
Время переналадки устройства для нового режима, мин	
Время съема и установки головки, не более, мин.	

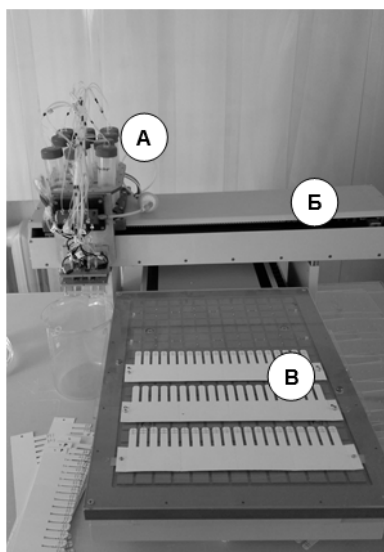


Рис. 22. Общий вид диспенсера. А – печатающая головка, Б – система позиционирования, В – рабочий стол.

В первом варианте устройства использовались прямоточные соленоидные клапаны фирмы «The Lee Company», США (см. рис. 23А), в которых входной порт находился сверху, а выходной снизу. При такой конструкции растворы иммунореагентов, проходя через клапан, подвергаются значительному воздействию электромагнитных полей, что существенно снижает специфическую активность

белков при последующем дот-анализе и требует увеличения концентрации специфических компонентов в сорбционных растворах. Кроме того, через полгода эксплуатации клапаны вышли из строя (ряд клапанов перестали пропускать жидкость, а другие – стали подтекать).

Во втором варианте печатающей головки использовали клапаны фирмы Takasago Fluidic Systems, Япония (см. рис. 23 Б), в которых входной и выходной порты расположены снизу, а поток жидкого реагента не имеет прямого контакта с соленоидом. В результате потери специфической активности белка были значительно уменьшены, но спустя несколько месяцев работы также пришли в негодность. И в том, и в другом случаях клапаны эксплуатировались в прерывистом режиме с тщательной промывкой после рабочих циклов и хранением в сухом виде или заполненными консервирующим раствором этанола. Осмотр клапанов того и другого типов показал наличие эластичных пленок в области выходных отверстий (см. рис. 23В). Попытки удаления пленок промывкой клапанов растворами кислот, щелочей, детергентов и органических растворителей не дали положительных результатов.

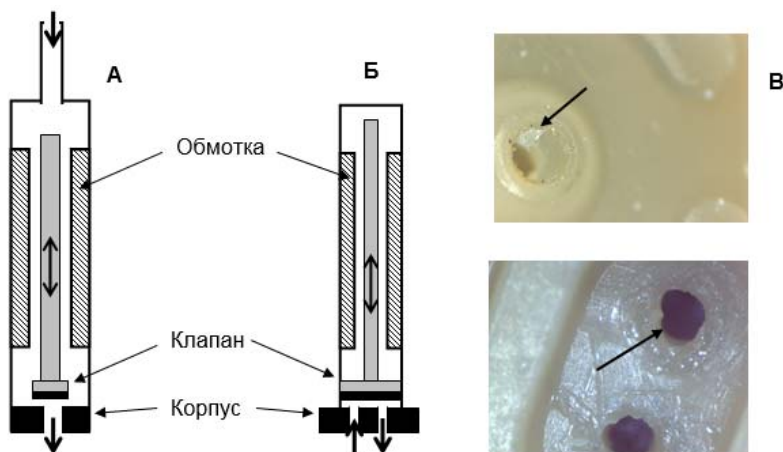


Рис. 23. Схемы строения клапанов The Lee Company (А) и Takasago Fluidic Systems (Б), снимки пленок в выходных отверстиях клапанов, вышедших из строя (В).

При анализе литературных данных выявлено, что аналогичные эффекты выхода клапанов из строя вследствие образования пленок в соплах капиллярных устройств были изучены и описаны японскими исследователями, которые установили, что формирование пленок происходит даже в особо чистой воде, предположительно, за счет синтеза органических веществ (каротиноиды, амиды, сложные эфиры и сахара) из неорганических веществ в растворенном воздухе под действием гидроксильных радикалов, генерируемых потоками через микроотверстия. В качестве мер, значительно увеличивающих срок службы клапанов, предложены: деаэрация используемых растворов с насыщением их инертным газом и заземление выходных отверстий клапанов (*Hasegawa et al., 2017*).

Учитывая предыдущий негативный опыт, в третьем варианте печатающей головки использованы клапаны пережимного типа (см. рис. 24) – двухходовые электромагнитные клапаны Sirai S10407 (12 VDC), разработанные компанией ASCO Numatics Sirai Srl (Италия).

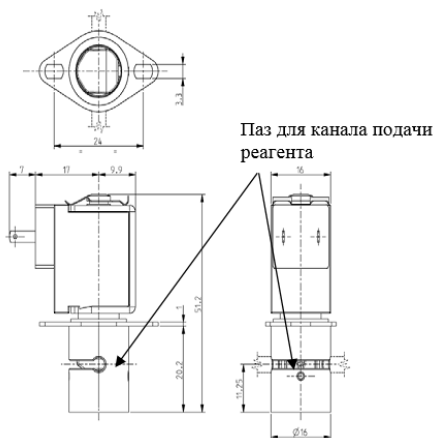


Рис. 24. Схема строения клапана Sirai S10407 (12 VDC), производства компании ASCO Numatics Sirai Srl (Италия).

Клапаны Sirai специально сконструированы для применения в системах, где раствор не должен вступать в контакт с дозирующим устройством, а именно в анализаторах крови, пищевых анализаторах, в биомедицинских анализаторах и в другом подобном лабораторном оборудовании. В такой системе с раствором контактирует

только с легкозаменяемой эластичной трубкой, которая пережимается клапаном. В качестве канала подачи использована трубка из мягкого силикона (твёрдостью 50 единиц по Shore A) с внутренним диаметром 0,5 мм и толщиной стенки 0,5 мм. Объем дозирования завит от времени открытия клапана, давления в системе и времени релаксации трубки. Такой подход позволяет избежать контаминации раствора и снижение потерь специфической активности реагентов при прохождении через систему дозирования, а также упростить замену канала при переходе на другие реагенты.

Сравнительная оценка качества матриц, полученных разными способами, показала, что матрицы, изготовленные вручную при помощи пипеточного дозатора и с использованием автоматического устройства с клапанами пережимного типа по объему и форме капли, были идентичны. Снижение интенсивности проявления на матрицах, полученных автоматическим способом, по сравнению с ручным нанесением реагентов захвата, не превышало 5%, что не сказывалось заметно на диагностических характеристиках набора. Таким образом, клапаны пережимного типа, по нашему мнению, являются лучшим вариантом для изготовления печатающей головки диспенсера.

Подбор иммунореагентов захвата и условий их иммобилизации на подложке

Белковый реагент захвата должен быть способен распознать свою цель среди десятков тысяч других видов белка в образце и затем удерживать ее в течение всего тестирования (*Phelan and Nock, 2003*). Следовательно, реагент захвата должен быть специфичен для анализируемого белка и иметь аффинитет, достаточный для того, чтобы захватить и удерживать нужные белки при их очень низкой концентрации. Другая важная характеристика реагента захвата – его стабильность. Эта проблема высоко критична, в смысле способности белка сохранять активность при иммобилизации на поверхности и выполнении этапов анализа, которые могут потребовать жестких условий для исключения неспецифических взаимодействий (*Cretich et al., 2006*). В зависимости от решаемых задач на подложку могут быть нанесены: набор специфических антител (для выявления соответствующих антигенов), набор антигенов нескольких возбудителей инфекций (для выявления специфических для них антител), или антитела и антигены в различных сочета-

ниях. Белковые матрицы могут быть использованы и для выявления нескольких маркеров одного инфекционного заболевания. Такие тесты, по сути, являются не мультиплексными, а мультипараметрическими. В одних случаях на подложку могут быть нанесены несколько диагностически значимых антигенов возбудителя инфекции или нескольких вариантов такого возбудителя. Такие тесты являются аналогами иммунного блоттинга и могут применяться для подтверждения результатов первичного скрининга на наличие ВИЧ-инфекции, гепатитов, сифилиса и др. заболеваний. Любой набор реагентов захвата должен быть подобран так, чтобы исключить перекрестные взаимодействия, и иммобилизован на матрице так, чтобы обеспечить прочное связывание реагентов с подложкой и сохранение их максимальной специфической активности.

Выше отмечено, что подходы к иммобилизации белков на поверхности носителя достаточно разнообразны. Однако большинство из них довольно сложно реализуемы, требуют высокого профессионализма исполнителя, сложного специального оборудования и их внедрение в широкую практику не всегда возможно. Если исследователь преследует цель практического внедрения разработки, актуальным остаётся поиск простых и широкодоступных методик. В этом плане, наиболее простым и технологичным способом фиксации антигенов представляется физическая адсорбция. Химический состав, ионная сила, pH и температура раствора влияют как на эффективность иммобилизации белка, так и на его специфические иммунологические свойства, поскольку изменения факторов среды могут разрушать конформационные эпитопы (*Sinclair, 2013*). Иммобилизацию белков обычно проводят из растворов с ионной силой в диапазоне 0,01–0,005 М, обеспечивающей устойчивость структуры макромолекул и необходимый уровень pH. Буферные растворы составляют на основе солей, имеющих многовалентные ионы (фосфаты, карбонаты, бораты), которые вносят свой вклад в ионные взаимодействия.

На практике подбор наиболее подходящего реагента захвата и условий его иммобилизации на подложке может быть осуществлен путем выполнения пробной сорбции исследуемых реагентов в нескольких буферных системах с последующим анализом положительного и отрицательного образцов (*Полтавченко, 2007a*). При этом выбирают иммунореагент, обеспечивающий в анализе наибольшее соотношение полезный сигнал/шум, и условия дости-

жения насыщающей концентрации реагента на поверхности подложки при сохранении функциональных свойств белка. Первичную оценку реагента захвата можно получить путем его пробной сорбции в планшетах для иммунологических реакций с последующей постановкой ИФА, а затем выполнить аналогичную процедуру на подложках из синтетической бумаги с постановкой дот-анализа. Пример подобного эксперимента по сравнению двух антигенов разных производителей приведен на рисунке 25.

При таком сравнении становятся очевидными преимущества в качестве реагента (А, Г) перед реагентом (Б, Д) – он в большем разведении обеспечивает насыщение твердой фазы и не выявляет фоновых оптических сигналов при анализе отрицательной сыворотки. Видно, что наиболее эффективная иммобилизация того и другого реагентов в полистирольных планшетах происходит при pH 9,4, а на синтетической бумаге при pH 6,0, что свидетельствует о преимущественной роли свойств твердой подложки. Оптимальное рабочее разведение реагента удовлетворительного качества – 1:400. Концентрация белка в сорбционной смеси имеет существенное значение. Слишком высокая концентрация может приводить к плотной упаковке макромолекул на поверхности адсорбента, к ограничению площади связывания, а, следовательно, к снижению прочности удерживания антигена на твердой фазе (Esser, 2014).

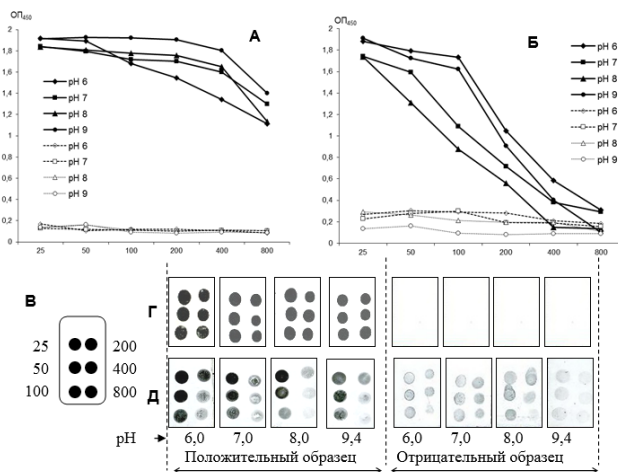


Рис. 25. Результаты сравнительного исследования двух реагентов захвата в ИФА (А, Б) и дот-иммуноанализе (Г, Д). На рис. А и Б

сплошными линиями обозначены результаты анализа положительной сыворотки, а пунктиром – результаты анализа отрицательной сыворотки. По оси ординат – оптическая плотность при $\lambda = 450$ нм, по оси абсцисс – разведения антигенов. На рис. В – схема нанесения на подложку матрицы реагентов захвата в 10 мМ боратном (pH 6,0; pH 7,0); фосфатном (pH 8,0) и карбонатно-бикарбонатном (pH 9,4) буферном растворе.

Кроме того, избыток реагентов во время этапа блокировки матрицы может диффундировать на свободные участки подложки и становиться причиной артефактов или диффузного повышенного фона (см. рис. 26).

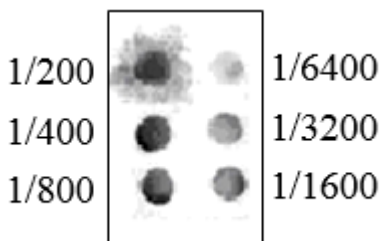


Рис. 26. Пробная иммобилизация серии двукратных разведений антител захвата на подложке из синтетической бумаги. Виден ореол излишков реагента над точкой с разведением 1/200 и слабое насыщение точек с разведениями 1/1600 и 1/3200. Оптимальное разведение – 1/400.

В большей степени, диффузия и осаждение излишков реагента из точки нанесения на окружающие участки матрицы характерно для антител и высокомолекулярных антигенов, способных конкурировать за сайты адсорбции с белками блокирующей смеси. Следствием низких концентраций реагента может быть недостаточное насыщение поверхности подложки.

Существенное влияние на эффективность сорбции имеют время инкубации и температура сорбционной смеси на подложке. Реагенты захвата наносятся на подложку малыми (2–2,5 мкл) каплями, которые при комнатной температуре испаряются в течение 10–15 мин. Этого времени может оказаться недостаточно для осуществления правильной ориентации молекул и образования множественных, прочных

связей. Время высыхания можно замедлить, поместив матрицы в холодильник. Такой прием обычно дает заметный эффект улучшения связывания реагента с подложкой (см. рис. 27).

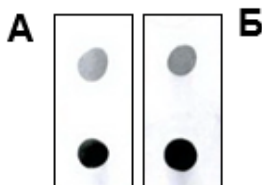


Рис. 27. Сравнение режимов инкубации сорбционного раствора на подложке. А – инкубация подложек с сорбционной смесью на воздухе при комнатной температуре, Б – инкубация в холодильнике при 4°C в течение 2 ч.

Прочность удерживания реагента захвата на подложке во многом зависит от гидрофобных связей между молекулой белка и поверхностью синтетической бумаги. Для эффективного образования таких взаимодействий белок должен очень близко подойти к поверхности подложки, чему препятствуют молекулы воды, связанные как с белком, так и в текстуре подложки. Для удаления воды требуются высокая температура и длительная инкубация при сушке. Поэтому после высыхания капель раствора иммунореагентов матрицы необходимо поместить в термостат при максимально высокой температуре, не оказывающей негативного влияния на специфические свойства белка, на период, достаточный для испарения связанной воды. Иллюстрация эксперимента по подбору режима сушки приведена на рисунке 28.

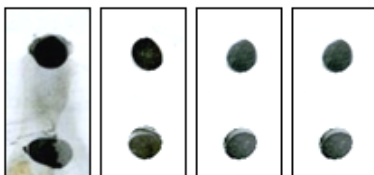


Рис. 28. Подбор режимов сушки матриц после адсорбции реагентов захвата на подложках из синтетической бумаги на основе поливинилхлорида (ПВХ). Цифрами под матрицами обозначено время (ч) досушивания при 55°C.

Видно, что сушка матриц при 55°C в течение 1 ч недостаточна для фиксирования реагентов захвата – при блокировке матрицы эти реагенты диффундируют и связываются соседних участках подложки. При сушке в течение 2 ч реагенты захвата надежно иммобилизуются на синтетической бумаге.

Таким образом, эффективная иммобилизация реагентов захвата на синтетической бумаге происходит в слабокислых условиях (рН 6,0) при инкубации в течение 2 ч при 4°C с последующим досушиванием матриц при 55°C в течение не менее 2 ч.

Блокирование и стабилизация матриц

После иммобилизации реагентов анализа поверхность подложки должна быть обработана составом, препятствующим прямому связыванию анализита и конъюгата со свободными участками поверхности подложки. Обычно для этих целей используются инертные белки (БСА, казеин, молоко и др.) или синтетические полимеры (полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон и др.). Ранее было установлено, что синтетические полимеры мало подходят для блокирования, поскольку не устраняют наличие фона или артефактов на поверхности матрицы после выполнения анализа (*Полтавченко и др., 1999*).

На рисунке 29 приведены результаты оценки эффективности блокирующих составов, приготовленных на основе 0,01 М фосфатного буферного раствора (рН 7,2): 1% БСА; 0,2% казеин; 0,2% казеин + 0,1% лактальбумин; 0,2% казеин + 0,2% казеинат Na; 0,2% казеин + 0,1% овальбумин; 1% обезжиренное молоко (все белки производства Sigma, США).

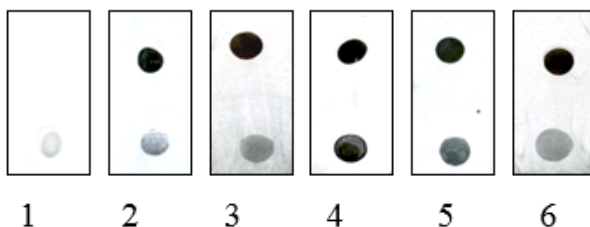


Рис. 29. Сравнительная оценка составов для блокирования поверхности матриц: 1 – 1% БСА; 2 – 0,2% казеин; 3 – 0,2% + 0,1% лактальбумин; 4 – 0,2% казеин + 0,2% казеинат натрия; 5 – 0,2% казеин + 0,1% овальбумин; 6 – 1% обезжиренное молоко.

Матрицы с иммобилизованными на синтетической бумаге реагентами захвата (вверху – кроличьи антитела и внизу – лизатный антиген вируса осповакцины) погружали в блокирующие составы на 2 ч при температуре 20°C, просушивали в этих же условиях и выполняли дот-анализ суспензии вируса осповакцины с биологическим титром 10^5 БОЕ/мл. Видно, что БСА полностью блокирует сигнал на том и другом реагентах захвата (возможно десорбирует их с подложки). Блокирующие составы, содержащие казеин, не препятствуют связыванию вируса со специфическими антителами (верхняя точка на матрице), но по-разному влияют на лизатные белки вируса (нижняя точка). Казеин, как сам по себе, так и в сочетании с другими гидрофобными белками – лактальбумином и, в меньшей степени, овальбумином значительно снижает оптический сигнал. Снижает сигнал и обезжиренное молоко, также содержащее казеин и лактальбумин. Лучшие результаты показывает сочетание гидрофобного казеина и гидрофильного казеината натрия в равных концентрациях – полезный оптический сигнал остается ярким и контрастным, а окружающий фон чистым.

Белки, иммобилизованные на синтетической бумаге, могут храниться при комнатной температуре не менее года, а в условиях холодильника (+ 4°C) не менее 2 лет (срок наблюдения) без заметного снижения специфических свойств. Основными факторами, влияющими на сохранность сорбированных белков, являются влажность и компоненты воздуха. Поэтому после иммобилизации белков и блокирования матриц их целесообразно обработать стабилизирующим составом, предохраняющим матрицы от воздействия внешней среды. При подготовке планшетов для ИФА их часто обрабатывают 10-процентным раствором сахарозы, однако сахароза при высушивании кристаллизуется, в результате чего неприкрытая кристаллами часть поверхности иммуносорбента остается без защиты. Лучший результат дает состав, содержащий наряду с сахарозой небольшое (до 2%) количество легкорастворимого инертного белка (например, пептона). Такой раствор при высушивании образует на поверхности плотную пленку, препятствующую доступу воздуха и значительно продляющую срок службы матрицы. Обработку подложки таким составом следует проводить сразу после выемки матрицы из блокирующего раствора, путем погружения рабочей части матрицы в стабилизатор на 0,5–1 мин.

После блокирования и обработки стабилизатором матрицы необходимо тщательно просушить (1 ч при 50–55°C), промаркировать влагостойкими самоклеящимися этикетками и в теплом состоянии упаковать в герметичные пакеты из фольгированного полиэтилена, препятствующего доступу влаги и воздуха. Лучшие результаты дает вакуумная упаковка. При упаковке следует следить за качеством сушки и влажностью в помещении, где производится упаковка, поскольку даже небольшое количество конденсата делает стабилизатор липким и может привести к слипанию матрицы с материалом пакета. Герметичность упаковки проверяют визуально по отсутствию воздушных пузырей внутри упаковки. Поверх упаковки матрицы маркируют бумажными этикетками и хранят при 4°C.

Изготовление аналитических ванн

Обработка конструкции аналитической ванны

Мультиплексное выявление маркеров (антигенов или антител) проводится с использованием белковых матриц, представляющих собой плотную плоскую подложку с дискретно нанесенными на нее реагентами для захвата выявляемых маркеров. В процессе анализа белковая матрица последовательно инкубируется в ряде рабочих и отмывочных растворов. Таким образом, для выполнения каждого теста необходим набор реакционных сосудов, количество которых определяется числом этапов процедуры анализа. Для анализа целесообразно использовать ванночку, разбитую на необходимое количество изолированных ячеек и заполненную готовыми растворами. В таком случае дот-анализ заключается в последовательном переносе (с заданными временными интервалами) иммуночипов по рядам ячеек.

Таким образом, аналитическая ванна предназначена для последовательных инкубаций белковых матриц в рабочих растворах. Она изготавливается из химически инертной пластмассы, заполняется готовыми рабочими растворами и герметизируется, поэтому материал ванны и ее верхняя поверхность должны позволять надежную изоляцию каждой ячейки. Некоторые растворы обладают чувствительностью к прямому свету, поэтому материал должен быть непрозрачным. Ванна может быть монолитной (т. е. объединять ячейки для выполнения нескольких тестов) или разборной (то есть собирающейся из стрипов, каждый из которых содержит

набор ячеек для выполнения 1 анализа). Макеты первых вариантов монолитной и разборной ванн, изготовленных методом 3D-печати, приведены на рисунке 30.

Оценка эксплуатационных свойств этих макетов позволила сделать следующие выводы:

Ванна должна иметь число рядов ячеек, необходимое для выполнения полного цикла анализа. Для анализа антител достаточно 11 рядов ячеек.

Глубина и уровень заполнения ячеек должны обеспечивать полное погружение рабочей части матриц в раствор. Для одновременного анализа 10 маркеров достаточно глубины 20 мм, однако для успешной отмывки каждый последующий уровень заполнения ячеек должен немного превышать предыдущий. Поэтому оптимальной глубиной ячеек для отмывки следует считать 25 мм.

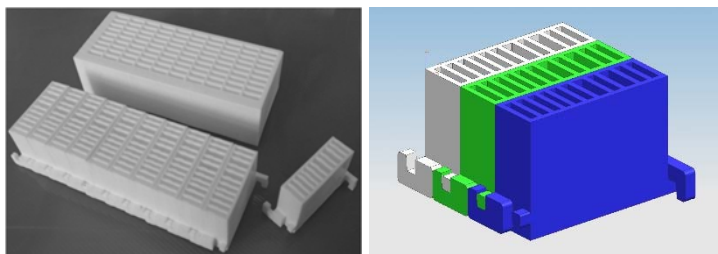


Рис. 30. Макеты монолитной и разборной аналитических ванн для выполнения мультиплексного анализа.

Прямоугольное сечение ячеек не исключает прилипание иммуночипа к стенке ячейки, способное снижать качество анализа и приводить к образованию артефактов. Поэтому ячейки в поперечном сечении целесообразно выполнять в виде вытянутого ассиметричного шестиугольника с острыми противоположно расположенными углами, служащих направляющими при введении в ячейки ванны пластин иммуночипа и препятствующими контакту их поверхностей. При этом введенный иммуночип должен быть ориентирован рабочей поверхностью в сторону большего объема ячейки для взаимодействия с большим количеством рабочего раствора.

Ячейки для дорогостоящих рабочих растворов образца, конъюгата и проявляющего раствора могут быть выполнены реакции с меньшей площадью сечения, чем для отмывочных растворов, что способствует их рациональному использованию и снижает стоимость системы.

Ванна должна быть изготовлена из термопластичного материала, позволяющего осуществлять термическую герметизацию.

Монолитная ванна на 10 анализов неудобна для постановки индивидуальных или мелкосерийных тестов, поскольку имеет значительные габариты и вес, а при одновременной постановке большого числа анализов сложности связаны с точностью переноса большого блока матриц по рядам ячеек.

Разборные ванны могут быть более удобны, поскольку позволяют выполнять индивидуальные тесты или набирать количество элементов по числу анализов и утилизировать их после выполнения теста, избегая хранения вскрытых (использованных) ячеек. Кроме того, такой подход позволяет встряхивать ячейки перед использованием для ресуспендирования возможных осадков в рабочих растворах, что неудобно делать в монолитной ванне с частично вскрытыми ячейками. Однако изготовление таких ванн сложнее и дороже.

Установлено, что отливка массивных ванн сопровождается побочными эффектами в виде более или менее выраженной деформации ячеек. Поэтому в процессе отработки конструкции ванны было признано целесообразным ограничиться пятью рядами ячеек. Чертеж монолитной ванны на пять анализов, учитывающей вышеизложенные соображения приведен на рисунке 31.

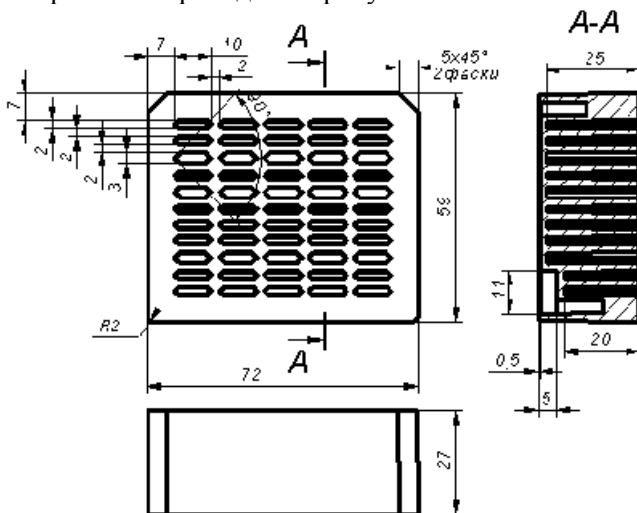


Рис. 31. Чертеж аналитической ванны на 5 анализов (Патент RU 2517035).

По этому чертежу литьем под давлением изготовлена партия ванн из полипропилена (Пат. RU 2517035). Ячейки такой ванны имели следующие объемы: ряды 1 и 2 – 0,6 мл; ряды 3, 5, 6, 7, 9 и 11 – 1,3 мл; ряды 4, 8 и 10 – 0,8 мл.

Такая ванна была пригодна для мультиплексного анализа анти-тел к ряду инфекционных агентов, однако при ее эксплуатации выявились следующие недостатки:

Верхний край ванны выполнен ровным, что при термической запайке ячеек покрывным материалом может приводить к деформации верхней части ячеек.

Ванна приспособлена для выполнения конкретной схемы анализа, алгоритм которой задается числом рядов ячеек (11 рядов) и чередованием рядов ячеек с разной площадью сечения (ячейки для рабочих растворов реакции выполнены с меньшей площадью сечения, чем для отмывочных растворов). Это затрудняет реализацию более сложных схем анализа, например, при выявлении антигенов с использованием вторичных детекторных антител и конъюгатов с третичными антителами (*Пат. RU 2296995; Полтавченко и др. 2006a*) или с применением вторичных биотинилированных антител и конъюгатов со стрептавидином или авидином (*Espina V. et al., 2004*), схем с применением систем амплификации (см., например, *Bhattacharya R. et al. 1999b*) и др. Кроме того, объем ячеек для инкубации иммуночипов с образцом (1-й ряд ячеек) недостаточен для обеспечения высокой чувствительности выявления некоторых маркеров, например, антигенов.

С учетом этих замечаний изготовлен третий вариант универсальной ванны (чертеж приведен на рис. 32), в которой:

– ячейки ванны выполнены одинаковыми по объему и размерам, что позволяет заполнять их реакционными и отмывочными растворами в любой необходимой последовательности. При этом размеры ячеек для инкубации иммуночипов с образцом увеличен, по сравнению с прототипом, что позволяет повысить чувствительность анализа за счет большего объема исследуемого образца;

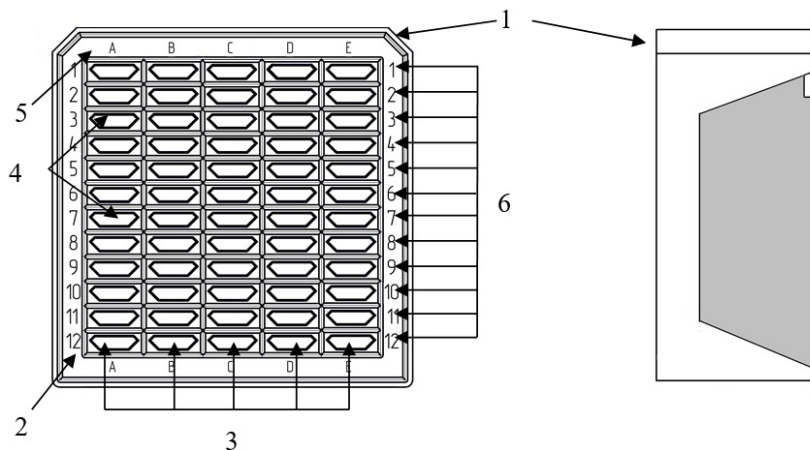


Рис. 32. Схема аналитической ванны для выполнения пяти мультиплексных иммуноанализов: 1 – скошенные углы ванны, 2 – блок ванны, 3 – модули, 4 – ячейки, 5 – сварочный контур, 6 – ряды однотипных ячеек (*Пат. RU 155402*).

– количество рядов ячеек увеличено до 12, что, наряду с произвольным чередованием ячеек, заполненных реакционными и отмывочными растворами, позволяет реализовывать различные схемы анализа, в том числе с использованием сложных конъюгатов и многостадийных вариантов усиления оптического сигнала;

– по верхнему краю ванны выполнен сварочный профиль в виде полукруглого в сечении буртика, окантовывающего каждую ячейку, что повышает надежность и упрощает процедуру герметизации ячеек ванны;

– два внешних угла ванны на стороне старта анализа скошены, а из внешних стенок ванны удалены значительные фрагменты, что снижает расход синтетического материала на изготовление аналитической ванны и, соответственно, массу ванны. Кроме того, скошенные углы ванны способствуют предотвращению возможных ошибок при ориентации ванны во время выполнения анализа;

– модули промаркированы на верхней поверхности ванны рельефными буквами латинского алфавита (A–E) и имеют по двенадцать ячеек. В ванне однотипные ячейки модулей образуют ряды, каждый из которых заполнен определенным рабочим раствором, ряды однотипных ячеек промаркированы на верхней поверхности ванны рельефными цифрами (1–12).

– заполненная ванна запаивается укупорочным материалом с помощью термопресса, при этом температура и давление пресса подбираются таким образом, чтобы расплавились только внутренний слой пластика на укупорочном материале и сварочный контур.

Универсальная ванна позволяет варьировать алгоритмом заполнения ячеек и выполнять различные схемы анализа в пределах 12 операций.

Устройство для автоматического заполнения ванн

Ряды ячеек ванны заполняют готовыми рабочими растворами в объеме, позволяющем полностью погружать в них рабочую часть иммуночипа. Порядок заполнения рядов ячеек растворами определяется алгоритмом проведения анализа. Заполненная ванна герметизируется укупорочным материалом. При выполнении анализа ячейки вскрывают перфоратором, в первый ряд ячеек вносят исследуемые образцы (препараты крови, смывы, суспензии соскобов и т. п.) и погружают в них пластины иммуночипов. После инкубации иммуночипы вынимают и через определенные интервалы времени последовательно переносят по следующим рядам ячеек. После выемки из последнего ряда учитывают результат по наличию или отсутствию темных пятен в местах нанесения на матрицу реагентов захвата. Для одиночных анализов вскрывают и используют отдельные модули.

Порядок заполнения рядов ячеек рабочими и отмывочными растворами определяется алгоритмом процедуры анализа, а уровень заполнения – размерами рабочей зоны матрицы (числом определяемых маркеров). Дозирование растворов должно быть выполнено достаточно точно, поскольку необходимо соблюдать следующие принципы: рабочая область матрицы должна полностью погружаться в рабочие растворы; а уровень отмывочного раствора должен быть выше, чем отмываемый рабочий раствор и повышаться с каждым циклом отмывки. Сложность розлива, помимо параллельного дозирования разных по химическому составу и физическим свойствам растворов, в узкие и глубокие ячейки заключается в возможности образования воздушных пузырей, поэтому заполнение ячеек необходимо выполнять со дна

Доступные аппараты не удается в полной мере приспособить для эффективного и производительного выполнения такой операции в связи с чем возникла необходимость в конструировании нестандартного устройства, отвечающего следующим требованиям:

- обеспечение автоматической или полуавтоматической подачи и позиционирования модулей, как одиночных, так и объединённых в монолитный блок;
- одновременное заполнение ячеек модуля растворами;
- число дозаторов – 14;
- диапазон варьирования объема заполнения от 0,1 до 1,5 мл;
- погрешность дозирования растворов не более 10 %;
- внешний диаметр наконечников для подачи растворов не более 1,2 мм;
- диапазон фиксирования расстояния между наконечниками 2–6 мм;
- заполнение с нижней части ячейки;
- обеспечение блокировки дозаторов при отсутствии модуля под гребенкой.
- применение в конструкции устройства химически стойких материалов;
- возможность санитарной обработки с применением этанола;
- использование в качестве бачков, трубок и наконечников взаимозаменяемых стандартных изделий;
- обеспечение производительности устройства не менее 300 модулей в час.

В соответствии с этими требованиями в кооперации со специалистами ООО «Микро-Контрол» (Новосибирск) сконструировано и изготовлено нестандартное устройство «Розлив-14». Вид устройства (без защитного внешнего кожуха) представлен на рисунке 33.

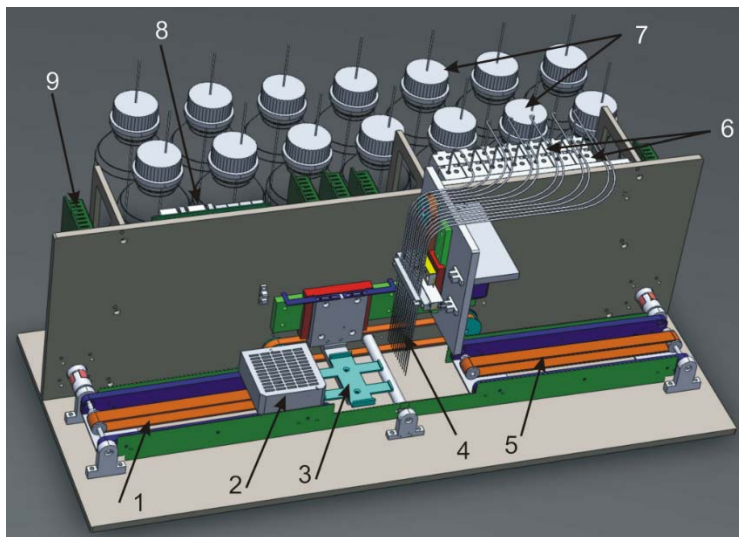


Рис. 33. Общий вид устройства «Розлив-14». 1 – входной конвейер; 2 – ванна; 3 – платформа для ванны; 4 – линейка инжекторов; 5 – выходной конвейер; 6 – клапаны для дозирования растворов; 7 – емкости для растворов; 8 – плата контроллера устройства; 9 – приводы шаговых моторов.

Технические данные и характеристики устройства «Розлив-14»:

- максимальные габариты аналитических ванн – 72x59x27 мм;
- масса ванн не более 100 г;
- рабочее давление воздуха – 0,1 МПа;
- время заполнения растворами 5 рядов ячеек не более – 60 с;
- количество одновременно разливающих каналов – до 14;
- диапазон варьирования объема заполнения от 0,1 до 1,5 мл;
- внешний диаметр наконечников для подачи растворов 1,2 мм;
- электропитание – 220 В, 50 Гц;
- габариты установки 1500 × 870 × 340 мм;
- программное обеспечение совместимое с Windows NT, 2000, XP, 7.

Незаполненные аналитические ванны устанавливаются на входной конвейер в количестве от 1 до 4. Растворы поступают из герметичных емкостей, находящихся под избыточным давлением в 1 атмосферу (давление создается компрессором) и разливаются клапанами-дозаторами через опускающиеся инжекторы. После установки аналитических ванн и достижения рабочего давления в

ёмкостях, устройство готово к работе. Управление устройством осуществляется при помощи специальной компьютерной программы. После проведения настроек устройство запускается клавишей «Пуск». Загорается светодиод «Работа», аналитическая ванна движется по входному конвейеру и перемещается на платформу позиционирования. Платформа с ванной последовательно позиционирует каждый ряд ячеек под линейкой инжекторов. Сопла инжекторов опускаются на $2/3$ глубины ячейки и происходит одновременное заполнение ряда ячеек аналитической ванны. После заполнения всей ванны она перемещается на выходной конвейер для передачи на последующие операции (герметизация и маркировка). Объем залитого раствора в каждой ячейке зависит от времени открытого состояния клапана-дозатора. Все дозаторы включаются одновременно, но выключаются в разное время, чтобы обеспечить индивидуальный объём раствора для каждой ячейки.

Известно, что объём дозируемого раствора зависит от его состава и физических свойств (*Tisone et al.*, 2007), то есть при одинаковом времени открытия клапана, но смене раствора объём существенно меняется. Настройки времени открытия клапанов для достижения необходимых объемов фактических рабочих растворов позволяют производить дозирование с погрешностью не более 5% (*Бессемельцев и др.*, 2014).

Герметизация аналитических ванн

Заполненные растворами аналитические ванны герметизируют комбинированным упаковочным фольгированным материалом при помощи термопресса. Материал представляет собой комбинацию из мягкой алюминиевой фольги с внешней стороны покрытой праймером под печать, а с внутренней стороны – трёхслойной пленкой на основе полиолефинов. На верхней поверхности ванн между ячейками предусмотрен сварочный контур, обеспечивающий герметичность упаковки. Укупорка производится при температуре $230 \pm 5^\circ\text{C}$. Проверка качества герметизации происходит при помощи вакуум-упаковочной машины. По окончании процесса вакуумирования ванны визуально осматриваются. На поверхности фольги не должно быть следов жидкости, пузырей воздуха или повреждений. Сварные швы и буквенно-цифровая маркировка ячеек должны хорошо визуализироваться. Маркировка ванн производится влагостойкими самоклеящимися этикетками, аналогично маркировке матриц.

Выбор и реализация системы детекции иммунологического связывания

Наиболее приемлемыми для быстрого внедрения в практику представляются хромогенные методы. В качестве маркеров в этих методах используются вещества (хромогены), способные при контакте с соответствующими субстратами вырабатывать интенсивно окрашенные нерастворимые продукты, осаждающиеся на подложку и контрастирующие место иммобилизации маркера. Наиболее часто в таких методах используются ферментные маркеры – пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза или неорганические металлодержащие золи (чаще коллоидное золото).

Для сравнительной оценки эффективности хромогенных способов визуализации результатов мультиплексного анализа на подложки аликвотами по 2 мкл наносили серии 2-кратных разведений IgG из сыворотки крови человека. Стрипы высушивали, блокировали казеином и выполняли дот-иммуноанализ с разными системами детекции. Принципиальные схемы использованных систем детекции приведены на рисунке 34.

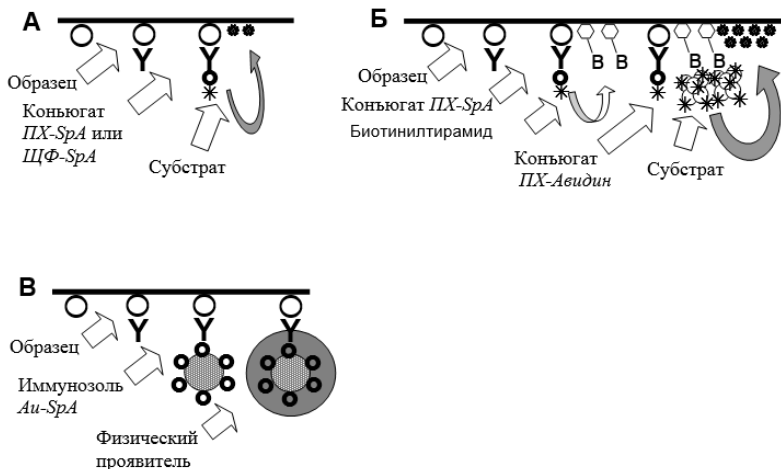


Рис. 34. Принципиальные схемы генерирования хромогенного сигнала в дот-анализе с использованием: (А) ферментных конъюгатов, (Б) системы амплификации сигнала «SuperCard» и (В) золотого иммунозоля. (Приведено из Полтавченко и др., 2007b.)

Использовали коммерческие конъюгаты протеина А *Staphylococcus aureus* с пероксидазой хрена (ПХ-SpA) и со щелочной фосфатазой (ЩФ-SpA); а также конъюгат пероксидазы хрена с авидином (ПХ-Авидин), все препараты производства Sigma, США. Конъюгат коллоидного золота (Au-SpA) с белком А, готовили самостоятельно по известной методике. После инкубации с конъюгатами и отмывки от несвязавшихся компонентов матрицы проявляли с использованием соответствующих проявителей: для ПХ-SpA – «Peroxidase substrate kit DAB-Ni» (Vector lab. Inc., Burlingame, США); для ЩФ-SpA – готовый к применению субстрат BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma, США); а для выявления конъюгатов на основе коллоидного золота применяли физический проявитель на основе метола, содержащий 0,25% лимонной кислоты, 0,2% метола и 0,2% нитрата серебра, который готовили самостоятельно непосредственно перед применением

Приготовление белков, обогащенных электронами (p-OH-ppA-казеин IV) и биотилинированного тирамина (биотинилтирамида), а также выполнение дот-иммуноанализа «Super-CARD» осуществляли так, как это описано в оригинальной статье Bhattacharya R. с соавт. (1999b). В постановке использовали конъюгат - ПХ-Авидин и субстрат – «Peroxidase substrate kit DAB-Ni».

Сравнивали следующие параметры: специфичность системы детекции; минимальное количество IgG, выявляемое системой (лимит определения) и динамический диапазон изменения оптического сигнала пятен в зависимости от количества антител в пятне. Результаты оценки показаны на рисунке 35.

												ПХ-SpA, ДАБ-Ni	Система детекции (конъюгат, проявитель)
												ЩФ-SpA, BCIP/NBT	
												Система «SuperCard»	
												Au-SpA, проявитель с метолом	
10000	5000	2500	1250	625	312	156	78	39	20	10	5	2,5	Разведения IgG
20	10	5	2,5	1,25	0,6	0,3	0,15	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	
												Концентрация IgG, нг/мл	
												Содержание IgG в пятне, нг	

Рис. 35. Результаты сравнительного определения чувствительности дот-иммуноанализа с использованием конъюгатов белка А *Staphylococcus aureus* с пероксидазой хрена (ПХ-SpA), щелочной фосфатазой (ЩФ-SpA) и коллоидным золотом (Au-SpA), а также системы амплификации оптического сигнала «SuperCard». 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 10 мкг/мл. Ниже цифрами обозначены концентрации IgG и их содержание в пятне. Процедура обработки стрипов и выполнения анализа описана в тексте (*приведено из Полтавченко и др., 2016b*).

Видно, что все конъюгаты связываются только с антителами и не связываются напрямую с твердой фазой, на что указывает наличие сигнала только в местах иммобилизации IgG и чистый фон подложки.

Система с использованием конъюгата ПХ-SpA не обеспечивает необходимой чувствительности даже при длительном проявлении. Лимит определения антител в этой системе составляет 2,5 нг, что соответствует концентрации IgG 1,25 мкг/мл.

Системы с применением щелочной фосфатазы считаются более чувствительными, чем пероксидазные. Это подтверждается и в наших экспериментах. Конъюгат ЩФ-SpA при проявлении в течение 10 мин. позволяет выявлять антитела в концентрации 150 нг/мл с лимитом определения 300 пг и динамическим диапазоном от 5 до 0,3 нг (от 1,25 до 0,156 мкг/мл), что примерно на 1 порядок чувствительнее, чем система с ПХ-SpA.

Применение системы «Super-Card» увеличивает чувствительность пероксидазного конъюгата, однако, вопреки утверждениям авторов метода о возможности прироста чувствительности на 5 порядков (Bhattacharya et al., 1999b), нами достигнуто снижение лимита определения только в 30 раз. Это согласуется с мнением Nielsen and Geierstanger (2004) о том, что в реальных экспериментах чувствительность даже наиболее изощренных методов амплификации ненамного отличается от чувствительности стандартного ИФА. Система позволяет выявлять антитела в концентрациях до 40 нг/мл, лимит определения составляет 80 пг, а динамический диапазон – от 10 нг до 80 пг (от 5 мкг/мл до 40 нг/мл). Проявление при этом происходит быстро – сигнал достигает максимума за 1–2 мин. и при дальнейшей экспозиции в проявителе не прирастает. Недостатком амплификации является применение нестандартных, дорогих, короткоживущих компонентов, что удорожает и значительно усложняет рутинную реализацию анализа.

Конъюгат на основе коллоидного золота с обработкой в растворе метолового проявителя в течение 7 мин. выявляет концентрации IgG до 5 нг/мл, и обеспечивает лимит определения 10 пг антител в пятне с динамическим диапазоном от 5 нг до 10 пг, что соответствует диапазону концентраций IgG от 2,5 мкг/мл до 5 нг/мл. Полученные результаты согласуются с данными Liang. et al. (2004), достигнувших с использованием сходной системы детекции лимита определения около 2 пг IgG с динамическим диапазоном от 1 нг до 2 пг. Чувствительность системы детекции с коллоидным золотом и метоловым проявителем примерно в 8 раз выше, чем с амплификацией «Super-CARD», в 30 раз – чем с конъюгатом ЩФ-SpA и в 250 раз – чем с пероксидазным конъюгатом.

Известно, что уровень концентрации специфических IgG, к которому приводит типичный естественный иммунный ответ, находится в диапазоне от 10 нг/мл (Anthony et al., 1994) до более 3 мкг/мл (Granoff et al., 1986). Минимальное значение этого диапазона значительно ниже, чем лимит определения IgG в дот-анализе с использованием ферментных конъюгатов даже с амплификацией сигнала. Это означает, что слабый иммунный ответ может быть не зарегистрирован такими системами. Напротив, динамический диапазон дот-иммуноанализа с коллоидным золотом и метоловым про-

явителем не только перекрывает все возможные значения концентраций специфических антител, но и позволяет проводить их количественную оценку. Такая система обеспечивает быстрое и контрастное выявление положительных результатов и выглядит наиболее перспективной для применения в дот-иммуноанализе.

Приготовление коллоидного золота и конъюгатов на его основе

Конъюгат представляет собой частицы золя золота, связанные с распознающим (детекторным) белком. Свойства таких зондов, такие как специфичность, лимит выявления, воспроизводимость и стабильность зависят как от характеристики частиц золота, так и от активности биологической составляющей конъюгата (*Chandler J. et al., 2000, 2001; Thobhani et al., 2010*). Процедура получения зондов на основе коллоидного золота, описанная в популярных руководствах (*Raska, 1988; Robinson, 2002; Carney et al., 2006; Дыкман и др., 2008; Бычковский и др. 2011*) включает в себя несколько этапов: получение золя с нужным размером частиц, связывание частиц золота с детекторным белком, блокирование свободных участков поверхности золя неспецифическими макромолекулами и очистка зонда от избытка детекторного белка скоростным центрифугированием. После очистки зонд разбавляют до рабочей концентрации подходящим буферным раствором. Этот раствор должен обеспечивать оптимальные условия для иммунного взаимодействия зонда с выявляемыми антителами и придавать стабильность разведенному препарату.

Приготовление золотого конъюгата – деликатный процесс, требующий строгого соблюдения ряда условий, при нарушении которых золь может необратимо коагулировать с утратой специфических свойств. Наиболее типичные электронно-микроскопические снимки препаратов коллоидного золота на разных этапах приготовления иммунохимического зонда приведены на рисунке 36. Комментарии к рисунку в тексте.

Получение коллоидного золота

Золь золота для иммунохимических исследований получают в результате химического восстановления тетрахлораурата водорода ($\text{H[AuCl}_4\text{]}$), цитратом, белым фосфором, боргидридом и другими восстановителями (*Faulk and Taylor, 1971; Frens, 1973; Raska, 1988; Дыкман и др., 2008; Бычковский и др., 2011*). Наиболее простыми и воспроизводимым способом получения золья считается восстановление 0,01-процентного раствора тетрахлораурата водорода 1-процентным раствором цитрата натрия (*Frens, 1973*). Этот метод позволяет приготовить гомогенные золи со сферическими частицами диаметром от 15 до 150 нм. Размер частиц зависит от количества добавляемого цитрата. Частицы 15 нм можно получить быстрым внесением 3–4 мл свежеприготовленного горячего 1-процентного раствора цитрата натрия в колбу с 96–97 мл кипящего 0,01% раствора тетрахлораурата водорода при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. Цвет раствора в течение 1–2 мин. становится бледно-синим и через несколько минут изменяется до цвета красного вина. Примерно через 10 мин. восстановление заканчивается (цвет при дальнейшем нагревании не меняется).

Для получения частиц размером 20, 30, 50 и 60 нм необходимо использовать 2,5; 1,5 мл; 1,0 мл или 0,75 мл цитрата, соответственно. В этом диапазоне размеров золь имеет красный цвет с переходом от оранжевого (15 нм) до темно-бордового (60 нм), частицы диаметром более 70 нм дают фиолетовый цвет. Хорошо контролируется размер золья под электронным микроскопом. Полученные золи можно несколько недель хранить при комнатной температуре и до 1 года при $+4^\circ\text{C}$ в защищенном от света месте.

Мы предпочитаем использовать золи со сферическими частицами диаметром около 20 нм (см. рис. 35А), поскольку такие размеры частиц не вносят значительных стерических помех при иммунном связывании и позволяют надежно адсорбировать на них детекторные биомолекулы.

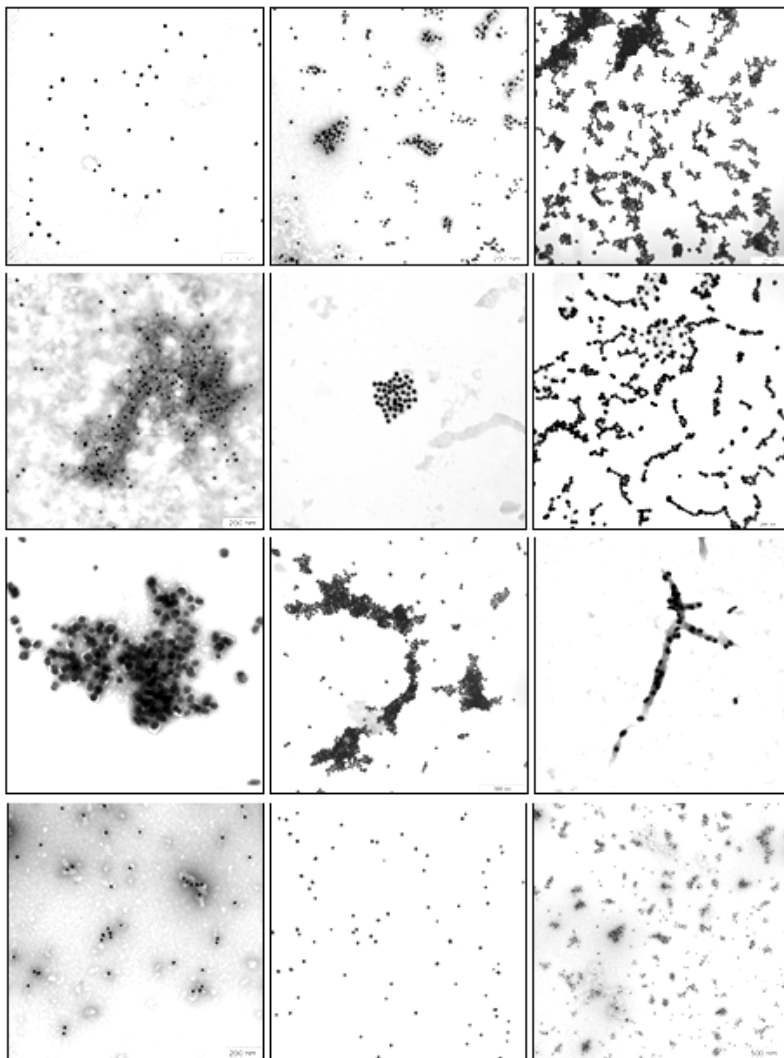


Рис. 36. Электронно-микроскопические снимки препаратов коллоидного золота на разных этапах приготовления иммунохимического зонда. А – качественный препарат коллоидного золота, полученный цитратным методом по классической методике; Б – частично агрегированный золь; В – полностью коагулированный золь; Г, Д – адсорбция частиц золя на сгустках специфического

белка; Е – агрегация частиц золя при грубом регулировании pH; Ж – агрегация частиц зонда при дефиците связываемого с золем специфического белка; З – коагуляция золя при хранении частично агрегированного зонда; И – аккумуляция частиц зонда на агрегатах блокирующего белка. типичный вид зонда после хранения препаратов, содержащих крупные агрегаты; К, Л, М – вид зонда после нагрузки фильтрованными растворами белка, после его очистки низкоскоростным центрифугированием и после хранения в течение года при 4°С, соответственно. Снимки Г-М выполнены после негативного контрастирования 1-процентным раствором уранилацетата. Черная масштабная линейка в правом нижнем углу рисунков соответствует 200 нм. (Приведено из *Poltavchenko et al.*, 2016b.)

При использовании частиц менее 15 нм могут возникать сложности с прикреплением к ним белков (*Liang et al.*, 2004). По мере увеличения размера частиц коллоидного золота, увеличивается их полиморфность и полидисперсность, а также чувствительность к солям и к факторам окружающей среде, золи становятся более склонными к флокуляции и агрегации (*Chaudhuri and Raychaudhuri*, 2001). Стабильность золь обеспечивает анионный слой вокруг частиц благодаря отталкивающим электростатическим силам. Агрегация золя имеет место, когда добавляется небольшое количество концентрированного электролита, т. к. уничтожается отталкивающая электростатика (*Raska*, 1988).

Критическим фактором для получения гомогенных золь является соблюдение чистоты (посуда, реактивы, дозаторы, вода) на всех стадиях процесса. По мнению некоторых специалистов на качество коллоида могут также оказывать негативное влияние излишне интенсивное перемешивание и кипячение в процессе созревания золя (*Chaudhuri and Raychaudhuri*, 2001). На неудовлетворительное качество указывает фиолетовый оттенок полученного коллоида, а под электронным микроскопом это проявляется в виде частиц различного размера и формы, образующих более или менее крупные агрегаты (см. рис. 35Б, В).

Приготовление комплексов золя с белком

Синтезированные наночастицы золота несут на поверхности отрицательный заряд и имеют сродство к белкам, положительно заряженным при нейтральных или физиологических значениях pH (Norde, 1986; Hermanson, 1995). Некоторые из белков, в частности, антитела, могут прочно адсорбироваться коллоидным золотом, образуя стабильные комплексы и сохраняя при этом свои биологические свойства. Связывание макромолекул с коллоидными частицами является более или менее необратимым, характер связей сложен и не до конца изучен (Geoyhegan and Ackerman, 1977; Raska 1987; Safenkova et al. 2010). Для того чтобы получить хорошего качества, стабильный конъюгат белка с наночастицами золота, необходимо рассмотреть несколько параметров. К ним относятся: молекулярная масса, изоэлектрическая точка (pI) и концентрация белка; pH и ионная сила реакционной среды.

Количество белка, адсорбированного золем, зависит как от размеров золя, так и от массы белковых молекул. Стабилизированные 5 нм частицы удерживают на поверхности по 1 молекуле каталазы (мол. м. 250 кД), тогда как 50 нм частицы удерживают белковый монослой из 65 молекул каталазы (Horisberger, 1978). Малые молекулы (типа пептидных гормонов) не могут удовлетворительно стабилизировать коллоид. В таких случаях можно использовать для связывания с частицами золя конъюгат малого пептида с большой нейтральной молекулой БСА (Genevieve et al., 2007). Белковая суспензия может содержать агрегаты и денатурированные молекулы (обратить внимание на срок выпуска коммерческих препаратов). Денатурированные молекулы имеют большое количество гидрофобных участков на поверхности и сродство их к частицам золотого золя возрастает. Связывание таких белков с коллоидным золотом приводит к тому, что не золотые частицы покрываются белком, а белковые агрегаты облепливаются частицами золя, изолируя функционально активные центры органических молекул (см. рис. 35Г, Д). Такие зонды изначально имеют сниженную специфическую активность и окончательно утрачивают ее в течение нескольких недель. Поэтому желательно перед адсорбцией удалить агрегаты центрифугированием белковой суспензии, например 60 мин. при 100000 g для IgG молекул, или, по крайней мере, открыть 15 мин. на Эппендорфовой центрифуге, помещенной в холодильник. (Raska, 1987; Baptista et al., 2008).

Как правило, большинство белков можно оптимальным образом адсорбировать на поверхности металла, используя буферную систему с рН, близким по значению к рI, с удалением от этого значения адсорбция уменьшается (*Thobhani, 2010; Stark, 2011*). Для получения стабильного комплекса необходимо работать при рН слегка выше, чем рI белка. Практически, подразумевается увеличение рН до слегка более щелочных значений. Не работать при рН ниже рI – безопасная мера, важная, если рI не известна точно. Полученный цитратным методом золотой золь имеет кислую среду (рН 4,0–4,5), а для адсорбции антител оптимален диапазон рН от 8,0 до 9,0. Коррекция рН коллоидного золота непростой процесс потому, что многие электролиты нивелируют отрицательный заряд коллоидов, вызывая агрегацию частиц. Наиболее подходящим реагентом для этой процедуры считается 0,1 М раствор углекислого калия, который при перемешивании малыми порциями добавляется в коллоид. Контроль состояния коллоида при этом можно осуществлять визуально, внимательно наблюдая за окраской золя. Потемнение ярко-красного коллоида или появление в нем фиолетового оттенка указывает на необратимое слипание частиц (см. рис. 35Е) и необходимость приготовления новой порции золя (*Bendayan, 1984*). Значения рН для связывания некоторых белковых суспензий приведены в таблице 6.

Таблица 6

Значения рН для связывания коллоидного золота
с некоторыми белками

Белок	рН	Белок	рН
Казеин молока	4,3–4,6	Конъюгат БСА с белками	6,5–7,0
Овальбумин	4,5– 4,7	Стрептавидин	6,4–6,6
БСА	4,5–5,0	Иммуноглобулины	5,5–8,5
Лактальбумин	5,0–5,1	F(ab')-фрагменты	7,2–7,5
Протеин G	5,0–5,2	Пероксидаза	примерно 8,0
Протеин А	6,2–6,5	Авидин	10,0–10,6

Высокая ионная сила имеет понижающий эффект на связывание макромолекул с поверхностью золотых частиц. Концентрация соли не должна превышать 0,005 М. Другую точку зрения имеют Lucosy and Baschong (1986).

Определение минимального количества белка для стабилизации золотых частиц может быть проведено спектрофотометрически, однако чаще используется другая простая процедура – флокуляционный тест (*Raska, 1988*), позволяющая обойтись без точного определения концентрации белка. Концентрация белка должна быть в диапазоне 0,1–1,0 мг/мл. Во-первых, необходимо проверить и установить рН золя выше рI белка. Затем в ячейках планшета для иммунологических реакций приготовить серию 2-кратных разведений белковой суспензии в объеме 50 мкл. Добавить по 100 мкл золя и перемешать. Через 5 мин. внести по 50 мкл 10–20% раствора NaCl перемешать и через несколько минут визуальнo учесть результаты по цвету золя. Слабое изменение цвета (от бледно-розового) свидетельствует о нестабильности золотого комплекса. Полностью нестабильный комплекс синего или фиолетового цвета. Расчет минимального количества белка (V в мкл), необходимого для стабилизации X мкл золя произвести по формуле

$$V = 50 / y \times (X / 100),$$

где 50 – объем белковой суспензии в ячейке планшета, мкл;

y – кратность максимального разведения белковой суспензии, в которой не наблюдается изменения цвета золя;

100 – объем золя в ячейке планшета, мкл.

Для большей надежности увеличить объем белковой суспензии на 20%.

Пипеткой внести в подготовленную емкость количество суспензии белка, определенное флокуляционным тестом, добавить расчетный объем золя золота, закрыть емкость и легко перемешать.

Значительное уменьшение дозы нагрузки золя белком может привести к агрегации за счет связывания двух частиц с одной биомолекулой или взаимодействия неблокированных белком поверхностей частиц золя. Типичная картина таких агрегатов приведена на рисунке 35Ж. Подобные препараты сразу после приготовления могли иметь высокую активность, но в разведенном состоянии в течение 2–4 мес. утрачивали способность к специфическому связыванию, при этом под электронным микроскопом выявляли значительно более крупные агрегаты, чем в исходном зонде (см. рис 35З).

Даже удачно конъюгированные коллоидные частицы все еще способны адсорбировать другие макромолекулы, что может привести к нежелательному или неспецифическому связыванию. Поэтому конъюгаты должны быть дополнительно стабилизированы

инертными макромолекулами, такими, как бычий сывороточный альбумин (БСА), желатин, или полиэтиленгликоль 20000 (ПЭГ). Для этого, спустя 10 мин., необходимо понемногу добавить стабилизирующий агент т.е. БСА или ПЭГ до конечной концентрации 0,02 % продолжить легкое перемешивание в течение последующих 5 мин.

Опыт показывает, что растворы стабилизирующих агентов (особенно полученные из лиофилизированных препаратов) содержат большое количество агрегированных молекул, которые при добавлении золя аккумулируют на своей поверхности его частицы (см. рис. 35И). Для того, чтобы избежать описанных выше проблем, некоторые исследователи считают необходимым перед нагрузкой золя удалять агрегаты из белковых и блокирующих растворов ультрацентрифугированием или ультрафильтрацией (*Chandler et al., 2000; Alanazi et al., 2010; Safenkova et al., 2010*). Хороший результат дает предварительная обработка растворов детекторных белков и блокирующих агентов ультразвуком для разрушения агрегатов (*Полтавченко и др., 2007b; 2016b*). Использование таких растворов заметно улучшает качество приготовленных зондов, однако и при таком подходе в них можно было наблюдать небольшие группы слипшихся частиц (см. рис. 35К).

Полученная суспензия комплекса содержит большое число не связанных активных белков и недостаточно стабилизированных частиц золя и их агрегатов (*Raska, 1988*). Следовательно, нужна очистка центрифугированием при 4°C. В таблице 7 приведены параметры очистки.

Таблица 7

Параметры центрифугирования золотых конъюгатов
(*Raska, 1988*)

Размеры частиц, нм	Время центрифугирования, мин	Ускорение, g
15	45	12 000
20	30	12 000
30	15	12 000
40	10	12 000

После центрифугирования содержимое пробирки прозрачно, рыхлый красный осадок на дне. Супернатант удаляется с помощью

пипетки. На стенке пробирки, на стороне максимальной центрифужной нагрузки может быть обнаружено темное пятно, содержащее преципитаты и/или агрегаты комплексов. Его нужно удалить. Выделенный рыхлый осадок ресуспендируют в небольшом объеме подходящего буферного раствора, содержащего 0,2% ПЭГ и/или БСА. Thobhani et al. (2010) показали, что для стабилизации конъюгата наиболее подходят 0,1 М боратный буферный раствор (рН 7,5–8,5) и 0,1 М трис-буферный раствор (рН 8,5), а фосфатный буферный раствор вызывает высокий уровень агрегирования. Качество комплекса повысится, если повторить центрифугирование или использовать центрифугирование с глицериновой подушкой – на дно заполненной пробирки пастеровской пипеткой поместить 1 мл глицерина и открутить. Осадок при этом остается рыхлым и может содержать некоторое количество агрегатов. Наиболее крупные агрегаты могут быть удалены более кратким центрифугированием при малом ускорении. Пример очищенного конъюгата хорошего качества приведен на рисунке 35Л. Известно, что компоненты, содержащие серу или остатки ртути, приводят к коллапсу иммунозоля (*Chandler et al., 2000*), поэтому для длительного хранения конъюгатов могут быть рекомендованы консервация 0,1% азидом натрия при + 4°C или хранение в 50% глицерине при минусовых температурах (*Slot and Geuze, 1981*). При замораживании конъюгаты необратимо коагулируют и утрачивают свои специфические свойства (*Faulk and Taylor, 1971*).

В автономных наборах для мультиплексного дот-иммуноанализа конъюгат применяется в разбавленном до рабочей концентрации виде. При оценке сроков сохранности растворов в герметизированных ячейках, установлено, что зонд в разведенном до рабочей концентрации виде наиболее быстро, по сравнению с другими компонентами, теряет свои специфические свойства, что ограничивает срок годности диагностических наборов. Изучение возможных причин этого явления показало, что проблемы стабильности конъюгата связаны, в основном, с агрегацией иммунозоля вследствие изложенных выше погрешностей при его изготовлении. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что наличие в препаратах зонда даже небольших агрегатов является признаком нестабильности зонда. При хранении в разбавленном виде такие агрегаты служат причиной неконтролируемой вторичной агрегации

с медленной кинетикой, вероятно, с участием гидрофобных участков на поверхности белков и частиц золя (*De Roe et all, 1987; Carney et all, 2006*). Скорость этого процесса зависит от числа и размеров первичных агрегатов. Даже в конъюгатах хорошего качества после длительного хранения можно обнаружить большее или меньшее количество агрегатов (см. рис. 35М).

Кластеризации частиц золя в той или иной степени может возникать на любой стадии подготовки зонда. Скрупулезное соблюдение технологических режимов минимизирует это явление, но не позволяет полностью его избежать. Наиболее рациональным способом увеличения сроков хранения разбавленных препаратов иммунозоля является очистка их от агрегатов низкоскоростным центрифугированием. Такой подход позволяет обеспечить срок хранения зондов в рабочей концентрации свыше 12 мес.

Проявление золотых конъюгатов

Выше мы отмечали, что наиболее пригодной для визуализации результатов мультиплексного анализа является система с использованием в качестве метки конъюгата – коллоидного золота и в качестве субстрата – физического проявителя на основе метола. Эта относительно недорогая система позволяет наиболее эффективно выявлять в образце весь спектр антител и генерирует контрастные сигналы, легко воспринимаемые визуально.

Физический проявитель нестабилен и готовится из трех запасных растворов: 0,5% лимонной кислоты, 0,4% метола и 10% нитрата серебра, смешиваемых непосредственно перед применением в соотношении 1:1:0,02 по объему, соответственно. При обеспечении высокой чистоты приготовления раствора нитрата серебра, он стабилен и может храниться в темной склянке более года. Раствор метола существенно менее устойчив и может эффективно использоваться только в течение 1–2 суток. Для стабилизации раствора восстановителя можно использовать сульфит натрия, но такой подход значительно снижает контрастность проявления. Очевидно, что тест-система не может укомплектовываться таким запасным раствором и метол должен входить в ее состав в сухом виде. Для укомплектования автономного диагностического набора предложено использовать двухкомпонентный проявитель – таблетированную смесь метола и лимонной кислоты (сухой компонент) в соотношении 2:5 (мас./мас.), а

также 0,4-процентный раствор азотнокислого серебра (жидкий компонент). Экспериментально установлено, что метол в виде сухой смеси с лимонной кислотой в темной упаковке может более года (срок наблюдения) храниться при комнатной температуре без потери активности. Проблема комплектации в таком случае заключается в крайне малой дозировке порций этих компонентов. Для проявления одного чипа необходимо 0,5 мл проявителя. Такой объем проявителя должен содержать 1 мг метола и 2,5 мг лимонной кислоты. Наиболее просто дозирование сухих компонентов проявителя может быть осуществлено путем изготовления тритурационных таблеток (*Технология лекарственных форм, 1991*).

Для изготовления таблеток массой 3,5–4 мг готовили гомогенную смесь с необходимыми пропорциями лимонной кислоты и метола (эти ингредиенты имеют разную дисперсность и должны быть тщательно измельчены и перемешаны). Необходимый объем полученной пудры помещали в стеклянную чашку Петри и увлажняли 80 % этанолом до образования густой пасты. Этой пастой заполняли ячейки силиконовой матрицы и высушивали. При подборе режимов сушки смеси в матрице установлено, что первоначальная сушка при температуре выше 40°C приводила к вытеканию смеси из ячеек вследствие повышения растворимости. Оптимальным признан режим сушки в течение 2 ч при комнатной температуре, а затем в течение 4 ч при 50–55°C. Сушку таблеток необходимо проводить без доступа прямого света, а при их хранении избегать света и влаги. В таких условиях сухой компонент сохраняет свои свойства более 2 лет. Вариабельность массы таблеток в диапазоне от 3,5 до 4 мг не сказывалась заметно на результатах проявления (*Полтавченко и др., 2019b*).

Жидкий компонент проявителя содержит 0,4% нитрата серебра в очищенной воде и расфасован во флаконы из темного стекла. При его приготовлении необходимо избегать попадания прямого света, а также тщательно следить за качеством воды и чистотой посуды.

В оптимальных условиях раствор проявителя стабилен в течение 10–20 мин. и должен быть приготовлен непосредственно перед применением. В наборе таблетки сухой смеси помещаются в пустых ячейках одного из рядов аналитической ванны. При выполнении анализа за 10–15 мин. до проявления в ячейки с сухой смесью вносится по 250 мкл очищенной воды, а непосредственно перед проявлением – такой же объём 0,4% раствора нитрата серебра (введение равного объема жидкого компонента позволяет равномерно перемешать растворы). Время проявления 7–8 мин. при температуре 20°C.

Оценка имеющихся на рынке препаратов метола и нитрата серебра показала, что некоторые доступные реактивы не удовлетворяют требованиям качества и не годятся для изготовления проявителя (*Полтавченко и др. 2019b*). Таким образом, перед изготовлением компонентов проявителя необходим контроль качества исходного сырья.

При проявлении серебро может образовывать отложения разной плотности с различной окраской (от коричневой до черной), что затрудняет учёт результатов. Чтобы устранить эту проблему, в схему анализа введён дополнительный этап стабилизации окраски. На этом этапе проявленную матрицу обрабатывали щелочным раствором тиомочевина, который переводит серебро в его сульфид, имеющий интенсивную и стойкую чёрную окраску.

Для оценки эффективности применения в анализе, описанного проявителя, параллельно выполняли дот-анализ серии разведений образца вируса осповакцины ($8,5 \times 10^6$ БОЕ/мл) с использованием: классической прописи физического проявителя, приготовленного из запасных растворов (см. рис. 37А); двухкомпонентного проявителя (см. рис. 37Б); двухкомпонентного проявителя с последующей стабилизацией оптического сигнала в щелочном растворе тиомочевина (см. рис. 37В).

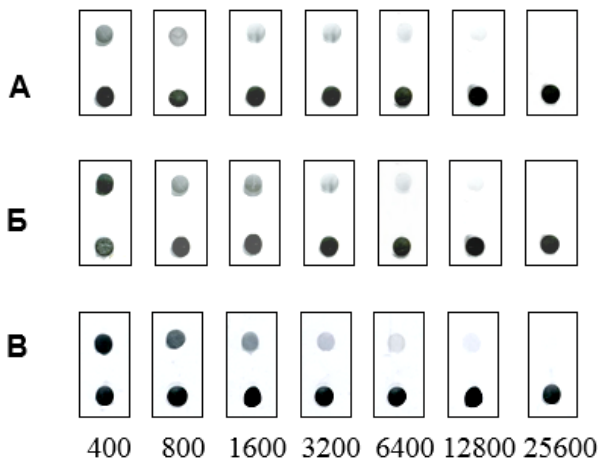


Рис. 37. Вид белковых матриц после выявления вируса осповакцины в дот-иммуноанализе при использовании вариантов проявителя: из запасных растворов (А), двухкомпонентного (Б) и двухкомпонентного с усилением оптического сигнала тиомочевинной (В). Кратность разведения вирусного материала приведена под изображениями матриц. (Приведено из Полтавченко и др., 2019б.)

Видно, что двухкомпонентный и классический проявители обеспечивают идентичные результаты, а применение стабилизатора окраски повышает контрастность проявленных пятен. Чувствительность метода во всех вариантах проявления составляет $6,6 \times 10^2$ БОЕ/мл (Полтавченко и др., 2019б).

Материальные затраты

Расчеты материальных затрат на производство 100 мультиплексных наборов (2000 мультиплексных анализов) для выявления 6 маркеров гемотрансмиссивных инфекций, приведены в таблице 8. Цены приведены по каталогам 2018–2020 гг.

Основные расходы составляют:

- стоимость оснастки (перфораторы, заготовки аналитических ванн и блоков матриц) – более 50%;
- материалы для упаковки (флаконы и коробки) – 24%
- материалы для маркировки (самоклеющиеся этикетки) – около 11%.

Доля затрат на наиболее дефицитные и дорогостоящие иммунокомпоненты за счет экономного расхода реагентов захвата не превышает 2,5%.

Таблица 8

Материальные затраты на производство
100 мультиплексных тестов

№ п/п	Наименование материала	Ед. измер.	Стоимость за ед. (руб.)	Расход на 100 мультиплексных наборов	
				Норма расхода на 100 наборов	Расход (руб.)
1	2	3	4	5	6
1.	Альбумин бычий сывороточный	кг	214195,00	0,001	214,20
2.	Anti-HBs Mab	мг	5000,00	0,01	50,00
3.	Anti-HBs Mab	мг	5000,00	0,01	50,00
4.	Anti-p24 ВИЧ Mab	мг	5000,00	0,01	50,00
5.	Anti-p24 ВИЧ Mab	мг	5000,00	0,01	50,00
6.	Антиген ВГС	мг	11700,00	0,01	117,00
7.	Антиген ВИЧ	мг	11400,00	0,01	114,00
8.	Антигены <i>T. pallidum</i>	мг	26000,00	0,006	156,00
9.	Антиген p24 ВИЧ	мг	15000,00	0,01	150,00
10.	HBsAg	мг	15000,00	0,01	150,00
11.	Mab против IgG человека	мг	27000,00	0,01	270,00
12.	IgG человека (K+)	мг	4000,00	0,01	40,00
13.	Вода очищенная	л	1,00	3,00	3,00
14.	Вода дистиллированная	л	0,50	30,00	15,00
15.	Глицерин	кг	140,0	0,01	1,40
16.	Заготовки аналитических ванн	шт	55,00	400	22000,00
17.	Заготовки блоков матриц	шт	7,50	400	3000,00
18.	Казеин	кг	14000,00	0,050	700,00
19.	Кислота соляная	кг	90,00	0,001	0,09
20.	Кислота тетрахлорзолотая	г	22140,00	0,005	110,70

Окончание таблицы 8

1	2	3	4	5	6
21	Материал упаковочный «Colflex»	кг	6000,00	0,005	30,00
22	Натрия азид	кг	22800,00	0,007	159,60
23	Натрия гидроокись	кг	150,00	0,008	1,00
24	Натрий тетраборнокислый	кг	1940,00	0,001	1,94
25	Натрий фосфорнокислый	кг	561,00	0,010	5,61
26	Натрий хлористый	кг	271,00	0,036	9,76
27	Натрия цитрат 5,5-водный	г	2500,00	0,001	2,50
28	Пакеты для упаковки матриц	шт	1,50	400	600,00
29	Перфоратор	шт	15,00	100,00	1500,0
30	Сахароза	кг	1062,00	0,2	212,40
31	Серебро азотнокислое	кг	38000,00	0,002	76,00
32	Спирт этиловый ректификованный	кг	200,00	1,000	200,00
33	Таблетки сухой смеси проявителя	шт	0,10	2000	200,00
34	Твин-20	л	1692,00	0,02	33,84
35	Тиомочевина	кг	5008,00	0,007	35,06
36	Детергент 7-X	л	400,00	0,06	24,00
37	Коробка (вторичная упаковка)	шт	100,00	10	1000,00
38	Коробка (первичная упаковка)	шт	80,00	100	8000,00
39	Ложмент в коробку	шт	18,00	100	1800,00
40	Флаконы с крышкой	шт	7,00	200	1400,00
41	Этикетка на коробку	шт	0,50	100	50,00
42	Этикетки самоклеящиеся (матрица)	м	206,00	22,00	5477,00
43	CD-диск с конвертом	шт	24	100	2400,00
ИТОГО на 100 наборов					50460,10
ИТОГО на 1 набор					504,6
Итого на 1 анализ 6 маркеров					25,23
Итого на 1 маркер					4,20

При массовом производстве наборов общие затраты могут быть сокращены примерно на 10–15% за счет снижения цены элементов оснастки при их масштабного изготовления, а также благодаря более рациональному (безотходному) использованию иммунологических и химических реагентов.

Оптимизация условий применения набора

Методология применения иммуночипов представляет собой дот-иммуноанализ с применением золотых иммунозоль и усилением иммунологического сигнала физическим проявлением. При использовании аналитической ванны, заполненной готовыми рабочими и отмывочными растворами, такой тест может применяться во внелабораторных условиях.

Мультиплексный дот-анализ антител включает несколько стадий, в общем виде его принципиальная схема приведена на рисунке 38.

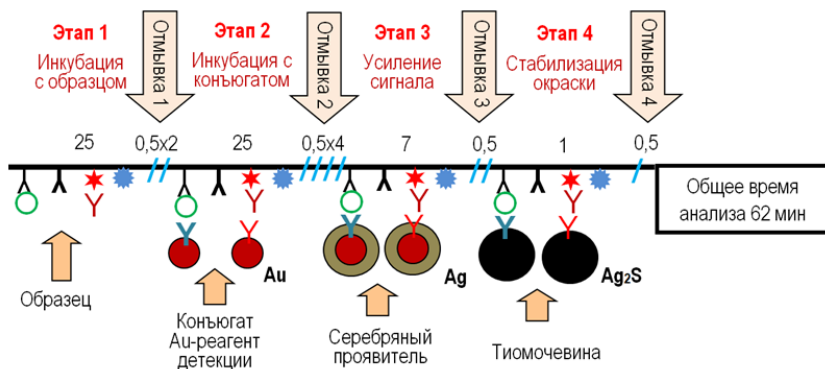


Рис. 38. Общая схема мультиплексного дот-иммуноанализа антител с применением иммунозоля золота, усилением сигнала физическим проявлением и стабилизацией окраски щелочным раствором тиомочевины.

На первом этапе имеющиеся в образце аналиты связываются с соответствующими реагентами захвата, иммобилизованными на подложке. Не связанные белки удаляются при отмывке. На втором этапе золотой иммунозоль связывается с аналитами, выделенными на 1 этапе. На третьем этапе, после отмывки, чип погружается в физический проявитель, содержащий соль серебра и восстановитель (метол) в кислой среде. В результате каталитической реакции

частицы восстановленного серебра оседают на поверхности частиц иммунозоля, визуализируя места их скопления. На дополнительном, четвертом, этапе осажденное на матрице серебро переводится в устойчивый и интенсивно окрашенный сульфид серебра путем обработки в щелочном растворе тиомочевины.

Растворы

На первом этапе происходит селекция, при которой на подложке в зонах нанесения реагентов захвата концентрируются интересные аналиты, а балластные белки удаляются отмывкой. Эффективность этого разделения определяется качеством иммобилизованных реагентов захвата, чем лучше селективность реагента захвата, тем выше специфичность анализа. Использование в качестве реагентов захвата лизатов природных возбудителей, несущих на себе большое разнообразие антигенных детерминант или поликлональных антител, способных связываться с тысячами разнообразных эпитопов, сопряжено с рисками получения ложноположительных результатов. Сложности при учете результатов от образцов с высокими фоновыми сигналами могут быть преодолены использованием на белковых чипах более специфичных и более чистых реагентов захвата. Однако полностью исключить перекрестную реактивность, как правило, не удастся, в образце всегда находятся компоненты, которые связываются (как правило, с низким аффинитетом) с реагентами захвата. Для борьбы с этими явлениями образец разводят в подходящем буферном растворе (РБРО), содержащем компоненты, снижающие вероятность низкоаффинных связываний (*Batteiger et al.*, 1982).

В качестве факторов, ослабляющих такое связывание, применяют: увеличение кратности разведения образца; повышение pH буферного раствора; добавление «мягких» детергентов (чаще, Твин-20 или Тритон-X100); введение биореагентов, нейтрализующих нежелательные компоненты образца (например, лизат клеток *E. coli*); внесение слабых денатурирующих агентов (например, мочевины); добавки реагентов, препятствующих образованию S-S связей (чаще, меркаптоэтанол). Для предотвращения прямого связывания компонентов образца с подложкой в состав РБРО вводят

реагент, использовавшийся для блокирования матриц (например, казеин). Эффективность каждого из этих факторов и их сочетание, дающее необходимый результат, подбирают эмпирически. Другим путем решения проблемы высокого фона может быть оцифровка оптических сигналов на матрице при учете результатов с вычетом заранее определенных фоновых значений по каждой точке.

На втором этапе используют раствор для разведения конъюгата (РБРК) – среду, призванную обеспечить максимальное связывание конъюгата с аналитами, выделенными на матрице из образца. Известно, что наиболее эффективные иммунные взаимодействия происходят в физиологических условиях при нейтральных значениях рН 7,2–7,4. Для предотвращения неспецифических связываний с подложкой и блокирующим белком в состав РБРК вводят небольшие количества казеина. Кроме эффективного связывания РБРК должен обеспечивать длительное хранение рабочего разведения конъюгата. Для этого в его состав вводят небольшие концентрации ПЭГ-20000, препятствующего агрегации золя золота.

Отмывочный раствор (ФСБ-Т) готовят на базе наиболее подходящего буферного раствора, использующегося для приготовления РБРО и РБРК, в который добавляют детергент (чаще Твин-20) в концентрации, дающей необходимый эффект отмывки от не связавшихся с подложкой компонентов. В качестве консерванта всех растворов эффективен азид натрия в концентрации 0,08–0,1%. Составы типовых рабочих растворов приведены в таблице 9.

Оптимальные концентрации иммунозоля золота подбирают опытным путём. Для этого несколько белковых матриц, проинкубированных в одинаковых условиях с образцом, обрабатывают разными разведениями конъюгата, приготовленными на РБРК. За рабочее разведение принимают концентрацию иммунозоля, обеспечивающую наиболее высокие положительные сигналы при отсутствии визуально определяемых ложноположительных сигналов.

Таблица 9

Типовые составы растворов
для проведения мультиплексного анализа

Наименование	РБРО	РБРК	Отмывочный раствор	Стабилизатор
Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ)	0,01 М	0,01 М	0,01 М	
Твин 20	0,1 % (о/о)	0,1 % (о/о)	0,1 % (о/о)	
Казеин	0,05% (в/о)	0,05% (в/о)	—	
ПЭГ-20000	—	0,01% (в/о)	—	
Натрия азид	0,1% (в/о)	0,1% (в/о)	0,1% (в/о)	
Гидроксид натрия				1% (в/о)
Тиомочевина				1% (в/о)
pH	9,5 ± 0,2	7,2 ± 0,2	7,2 ± 0,2	~ 12,0

Экспозиции

Автономный тест предусматривает выполнение анализа без использования энергозатратных термостатирующих и регистрирующих устройств. В то же время тест должен обеспечивать максимально быстрое получение результатов. Процедура анализа проста. Перед началом анализа перфоратором вскрывают ячейки первого ряда, вносят в исследуемые образцы и погружают белковые матрицы. Далее анализ проводят шаг за шагом, перемещая матрицы из одного ряда в другой и, инкубируя их в ячейках определенные периоды. Определение оптимальных периодов экспозиции может быть проведено эмпирически. Ниже приведены примеры экспериментов по оценке периодов инкубации матрицы для выявления антител к 5 возбудителям инфекционных заболеваний в рабочих растворах при комнатной температуре (20–22°C). При оценке использовали сыворотку крови человека, содержащую антитела ко всем возбудителям в разной концентрации, а также конъюгат – золь золота (20 нм), связанный с моноклональными антителами к IgG человека.

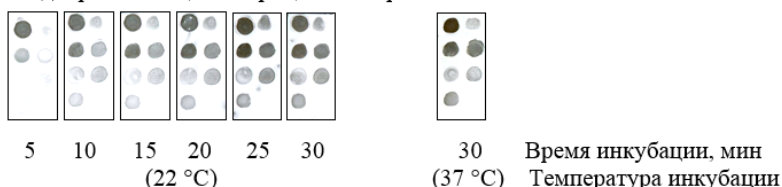
Для определения периода экспозиции с образцом матрицы инкубировали в одном образце сыворотки и удаляли по одной через фиксированные промежутки времени, дважды отмывали погружением в отмывочный раствор, одновременно обрабатывали 25 мин.

рабочим разведением конъюгата, снова отмывали отмывочным раствором и очищенной водой и 8 мин. проявляли в метоловом проявителе.

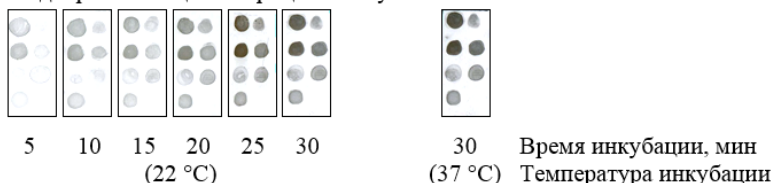
При определении необходимого времени инкубации с иммунозомем все матрицы одновременно 25 мин. выдерживали в сыворотке, отмывали, помещали в золь и удаляли по одной через установленные промежутки времени. Матрицы отмывали и одновременно проявляли 8 мин.

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 39.

Подбор экспозиции матрицы с сывороткой



Подбор экспозиции матрицы с иммунозомем



Подбор времени проявления матриц (22 °C)

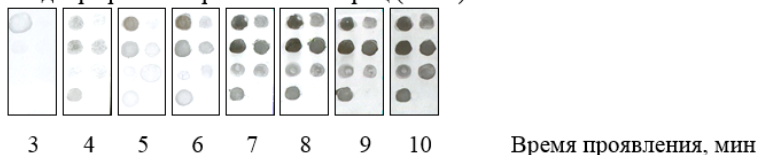


Рис. 39. Результаты экспериментов по подбору условий инкубации и проявления матриц при выполнении дот-иммуноанализа. Условия выполнения экспериментов описаны в тексте.

Видно, что при инкубации менее 20 мин., в том и в другом случае, оптический сигнал выглядит существенно ослабленным, тогда как матрицы, инкубированные при 22°C как с образцом, так и с зо-лем 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. Оптимальное время проявления при 22°C составляет 7 мин.

Кратность и продолжительность отмывок должны быть подобраны так, чтобы максимально удалить не связавшиеся компоненты. Экспериментально установлено, 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 – 0,3–0,5 мин., а оптимальный объем отмывочного раствора – 0,5 мл.

Перед проявлением необходимо дистиллированной водой отмыть с матрицы остатки буферного раствора, который может дезактивировать проявитель, 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. Перед проявлением матрицу необходимо отмыть водой дважды по 0,5 мин., а для удаления остатков проявителя перед стабилизацией сигналов достаточно погрузить матрицу на 0,5 мин. в дистиллированную воду. После стабилизации сигнала в щелочном растворе мочевины (1% NaOH и 1% тиомочевины в очищенной воде) в течение 1 мин. достаточно ополоснуть матрицу водой.

Таким образом, типовая процедура мультиплексного анализа антител включает 12 последовательных операций и может быть выполнена при комнатной температуре в течение 62–63 мин. (с учетом времени переноса иммуночипа по ячейкам). Хронологическая схема выполнения анализа представлена в таблице 10.

Таблица 10

Хронологическая схема выполнения
мультиплексного анализа антител

№ операции	№ ячейки ванны	Наименование этапа	Раствор	Время, мин.
1	1	Инкубация с образцом	Сыворотка 1/20 на РБРО	25
	2	Отмывка 1	ФСБ-Т	0,5
	3			0,5
2	4	Инкубация с конъюгатом	Рабочее разведение конъюгата на РБРК	25
	5	Отмывка 2	ФСБТ	0,5
	6		ФСБТ	0,5
	7		Очищенная вода	0,5
	8		Очищенная вода	0,5
3	9	Физическое проявление	Метоловый проявитель	7
	10	Отмывка 3	Очищенная вода	0,5
4	11	Стабилизация сигнала	Щелочной раствор тиомочевины	1
	12	Отмывка 4	Очищенная вода	0,5
Всего				62

Другие схемы анализа могут содержать большее или меньшее число этапов и отмывок, но периоды экспозиции матриц в рабочих и отмывочных растворах, в основном, соответствуют значениям, приведенным в табл. 10.

Регистрация результатов

Учет результатов после выполнения на них дот-иммуноанализа производится по наличию цветных пятен в точно пространственно определенных зонах нанесения реагентов захвата. Интенсивность окраски (оптический сигнал) в каждой зоне коррелирует с концентрацией соответствующего анализита в образце (*Бойко и др., 2015*).

В мультиплексной системе совмещение различных по природе и качеству реагентов захвата в одном анализе порождает дополнительные сложности – фоновые сигналы на менее чистых белках могут выглядеть сходно со специфичными сигналами на более каче-

ственных реагентах захвата. При визуальном учете это может вызвать трудности в субъективном восприятии и интерпретации результатов. Обычно сложности возникают при исследовании образцов с низкими уровнями аналитов, когда трудно принять решение к положительному или отрицательному результату отнести едва различимое пятно. Такая проблема возникает и при определении конечной положительной точки разведения аналита для оценки чувствительности теста, а также и при определении протективных титров антител, определяющих защитные свойства сыворотки (Бойко и др., 2015; Ериш и др., 2015). Объективную оценку результатов может обеспечить специальная программа компьютерного анализа оцифрованного изображения матрицы после выполнения анализа (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016617045, 2016; Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2020610604, 2000).

Обе программы выполняют следующие основные задачи:

- количественная оценка оптической плотности зон нанесения иммунореагентов захвата на белковой матрице;
- интерпретация результата анализа;
- хранение полученных данных в локальной базе;
- выдача на печать протокола исследования.

Разработчики путем редактирования файлов настройки программы могут управлять:

- изменением параметров блока матриц;
- количеством и расположением зон нанесения иммунореагентов;
- наименованиями инфекций;
- отсекаемыми значениями фона по каждому аналиту;
- соответствием оптических сигналов по каждой зоне количественным показателям аналита (при наличии таких показателей).

Функции программы, осуществляемые пользователем при учете результатов:

- загрузка отсканированного изображения иммуночипа с результатами анализа;
- автоматическое распознавание вида и серии набора по QR-коду;
- автоматическая загрузка данных файла настроек в зависимости от вида и серии набора;

- автоматический поиск зон нанесения иммунореагентов на изображении;
- автоматический анализ оптической плотности обнаруженных зон;
- автоматическое вычитание фоновых значений по каждому анализу;
- автоматическое сопоставление полученных результатов оптической плотности по каждому иммунореагенту с количественными показателями аналита (при наличии таких показателей);
- автоматическая интерпретация полученного результата как отрицательного или положительного;
- ввод Ф.И.О. и учетного номера пациента по каждому анализу;
- сохранение в локальной базе изображений и данных результатов анализа;
- вывод на печать заключения установленной формы.

Большинство функций программы при учете результатов выполняются автоматически, а роль пользователя сводится к сканированию белковой матрицы, вводу полученного изображения с QR-кодом и личных данных пациента в программу, задании адреса сохранения данных и выдаче команды на печать протокола. Программа нетребовательна к ресурсам системы, проста в применении и может выполняться оператором, имеющим минимальный навык пользователя персонального компьютера.

Испытания мультиплексных тестов

Оценка эксплуатационных характеристик иммунохимического теста базируется на его способности корректно идентифицировать действительно-положительные и действительно-отрицательные образцы, которая оценивается с помощью диагностических (клинических) показателей – чувствительности и специфичности (*Контроль качества клинических диагностических лабораторных исследований, 1994*).

Диагностическую чувствительность и специфичность в процентах по каждому маркеру для каждого теста рассчитывают по общепринятой формуле:

$$X = \frac{\text{число правильно квалифицированных образцов}}{\text{число исследованных образцов данной квалификации}} \times 100$$

Чувствительность вычисляют по положительным, а специфичность по отрицательным образцам. Оценку диагностических показателей можно выполнять с использованием аттестованных контрольных и стандартных панелей образцов, а также по любой выборке образцов, содержащих или не содержащих анализируемые маркеры, в сравнении с сертифицированными (референсными) тестами. Такая оценка для дот-анализа может быть проведена, как по визуально определяемым, так и по инструментально регистрируемым результатам. При визуальном учете часть образцов с низким содержанием определяемого маркера может вызывать затруднения при отнесении их к положительным или отрицательным пробам. При инструментальном учете результатов образцы с оптическим сигналом (ОС) ниже 10 условных единиц (у.е.) не различимы невооруженным глазом и однозначно трактуются как отрицательные результаты, а образцы с $ОС > 20$ у.е. видны как отчетливое пятно и отнесение их к положительным пробам тоже не вызывает сомнения. Таким образом, основные разночтения при визуальной оценке относятся к образцам с ОС в диапазоне от 10 до 20 у.е. Обычно таких образцов немного, тем не менее, они могут существенно повлиять на оценку эксплуатационных характеристик тест-системы.

Аналитическая чувствительность (предел определения) отражает минимальную концентрацию аналита, выявляемую тестом. Обычно ее определяют при анализе калибровочных образцов или как конечную положительную точку титрования образца с известным содержанием маркера. Интенсивность оптических сигналов дот-анализа пропорциональна концентрации аналита в образце, поэтому график, построенный по оцифрованным данным анализа калибровочных образцов, позволяет полу-количественно оценивать содержание маркера в исследуемых пробах. При параллельном анализе серии разведений одного образца в дот-анализе и референс-тесте предел выявления (наибольшее разведение образца) можно определить как сравнительную с тестом сравнения характеристику.

Цифровые значения, полученные при инструментальном учете результатов дот-анализа, позволяют проводить расчет статистических показателей тестирования: воспроизводимости результатов внутри одной серии и между разными сериями наборов, предельного срока хранения и степени снижения оптического сигнала по каждому маркеру в различных условиях и периодах хранения.

Ниже приведены ранее опубликованные оценки некоторых показателей лабораторных образцов наборов для мультиплексного анализа маркеров разных групп инфекционных заболеваний, которые могут быть использованы в качестве прототипа при организации производства диагностических тестов.

Набор для комплексного выявления антител к возбудителям TORCH-инфекций и инфекций мочеполовой сферы

(Патент РФ № 2298795; Яковченко, 2007; Полтавченко и Яковченко, 2007с)

Схема анализа для мультиплексного выявления антител приведена на рисунке 40.

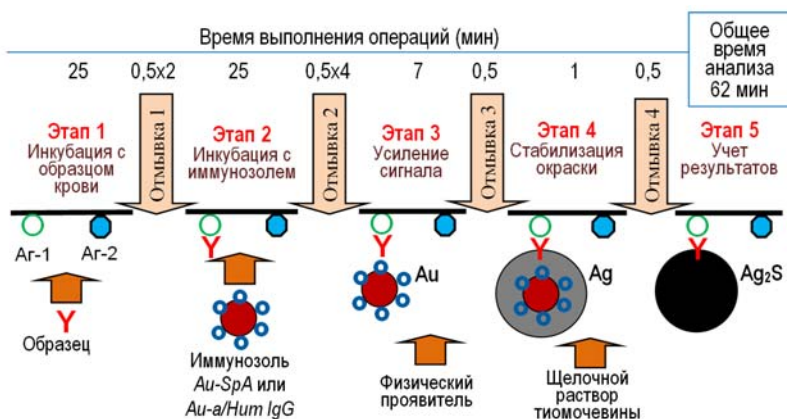


Рис. 40. Схема мультиплексного дот-иммуноанализа антител.

Набор предназначен для одновременного выявления в сыворотке (плазме) крови человека антител класса G к возбудителям: краснухи (*Rubella virus*), простого герпеса (*Herpes simplex virus (HSV)*), цитомегаловирусной инфекции (*Cytomegalovirus (CMV)*), токсоплазмоза (*Toxoplasma gondii*), сифилиса (*Treponema pallidum*), хламидиоза (*Chlamydia trachomatis*), микоплазмоза (*Mycoplasma hominis*) и уреаплазмоза (*Ureaplasma urealyticum*). Диагностическая роль набора реагентов заключается в возможности его использования для комплексного контроля инфекций перина-

тального периода у беременных и новорожденных. Может использоваться при реализации программ обеспечения репродуктивного здоровья.

Схема размещения реагентов захвата на матрице и результаты оценки аналитической чувствительности теста приведены на рисунке 41.

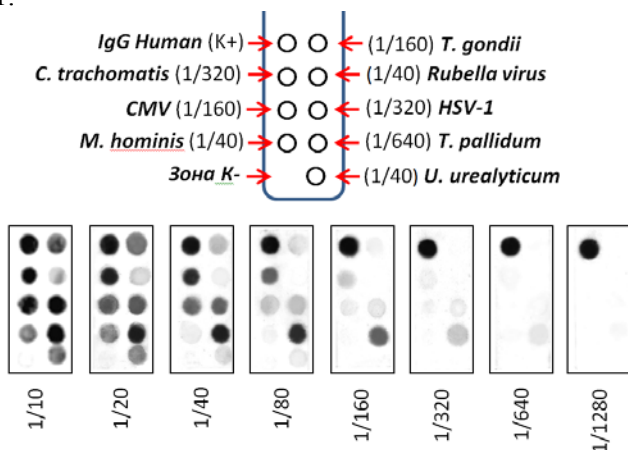


Рис. 41. Результаты оценки аналитической чувствительности мультиплексного теста для комплексного выявления антител к возбудителям TORCH-инфекций и инфекций мочеполовой сферы. На рисунке приведены: вверху – схема нанесения антигенов на белковом чипе (в скобках указан титр соответствующих антител в контрольной сыворотке, определенный с использованием ИФА), внизу – результаты мультиплексного дот-иммуноанализа серии разведений контрольной сыворотки (цифры под чипами указывают соответствующие разведения контрольной сыворотки).

При сравнительной оценке аналитической чувствительности этих тестов готовили серию двукратных разведений контрольной сыворотки. Титры специфических антител параллельно определяли в дот-иммуноанализе и на соответствующих тест-системах для ИФА (ООО «ИмДи-спектр»). Белковые матрицы и тест-системы для ИФА были изготовлены с применением идентичных антигенов. Видно, что результаты, полученные с использованием рекомбинантных антигенов *T. gondii*, *C. trachomatis*, *Rubella virus*, HSV, CMV и *T. pallidum* в ИФА и мультиплексном анализе совпа-

дают (1/160, 1/320, 1/40, 1/320, 1/160 и 1/640, соответственно), тогда как на лизатных антигенах *M. hominis* и *U. urealyticum* матрицы выявляют антитела в большем разведении, чем ИФА.

Оценку диагностических характеристик теста при определении антител к *CMV*, *HSV* и *C. trachomatis* проводили с использованием соответствующих стандартных панелей сывороток, производства ЗАО «Медико-биологический союз» (Бердск). Результаты исследований приведены в таблице 10.

Чувствительность теста при выявлении антител к хламидиям составила 94%, а к *HSV* и *CMV* – 95%. При анализе отрицательных сывороток получены слабые оптические сигналы в 1 образце панелей на хламидиоз, *CMV* и *HSV*. Таким образом, специфичность теста составила 94 % – для *CMV*, 93% – для *HSV* и 95% – для хламидиоза.

Доступных коммерческих панелей сывороток, содержащих другие антитела, анализируемые в тесте, найти не удалось. Поэтому оценку чувствительности и специфичности теста при определении антител к вирусу краснухи и *T. gondii* проводили на выборках из образцов рабочей панели сывороток с использованием референс-тестов. Результаты оценки представлены в таблице 11.

При выявлении антител к возбудителю токсоплазмоза данные, полученные с использованием референс-тестов и мультиплексного анализа, полностью совпадали, а при выявлении антител к вирусу краснухи дот-анализ позволял определять меньше позитивных сывороток, чем тест-системы для ИФА фирм «Medac» и «Вектор-Бест». Вероятно, это связано с особенностями антигенов, используемых в разных тестах, поскольку результаты мультиплексного анализа и тест-системы для ИФА «ИмДи-спектр», изготовленных с использованием одинаковых антигенов, совпадали.

Сравнительную оценку эффективности выявления антител мультиплексным тестом и наборами для ИФА, серийно выпускающимися ООО «ИмДи-Тест» с использованием рабочей панели из 150 образцов сывороток представлены в таблице 12.

Таблица 11

Оценка чувствительности и специфичности мультиплексного теста при определении антител класса IgG к *CMV*, *HSV* и *C. trachomatis* на коммерческих панелях, производства ЗАО «Медико-биологический союз»
(приведено из Полтавченко и Яковченко, 2007с)

Возбудитель	<i>CMV</i>	<i>HSV</i>	<i>C. trachomatis</i>
Панель	Стандартная панель сывороток, содержащих и не содержащих IgG к ЦМВ ОСО-42-28-360 серия 001	Стандартная панель сывороток, содержащих и не содержащих IgG к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов ОСО-42-28-373 серия 001	Стандартная панель сывороток, содержащих и не содержащих IgG к <i>C. trachomatis</i> ОСО-42-28-313 серия 003
Положительных образцов (всего /определено)	20/19	20/19	16/15
Отрицательных образцов (всего /определено)	16/15	14/13	20/19
Диагностическая чувствительность	95%	95%	94%
Диагностическая специфичность	94%	93%	95%

Таблица 12

Результаты оценки показателей мультиплексного теста (МПТ) при выявлении IgG
к возбудителям токсоплазмоза и краснухи относительно тест-систем сравнения
(приведено из Полтавченко и Яковченко, 2007)

Инфекция (число образцов)	Референсные тест-система	Образцы	Определено образцов		Относительные диагностические показатели МПТ	
			референс- тестом	МПТ	Чувствительность, %	Специфичность, %
Токсоплазмоз (32)	Toxoplasma gondii IgG «Sentinel CH», Италия	полож	12	12	100	
		отриц	20	20		100
	Токсоплазмоз IgG-антитела «ИмДи-спектр» Новосибирск	полож	12	12	100	
		отриц	20	20		100
Краснуха (34)	Rubella IgG – ELISA f. Medac, Германия	полож	26	25	96	
		отриц	8	9		89
	ВектоРубелла-IgG-стрип «Вектор-Бест» Новосибирск	полож	27	25	92	
		отриц	8	9		89
	Краснуха IgG-антитела «ИмДи-спектр» Новосибирск	полож	25	25	100	
		отриц	9	9		100

Таблица 13

Результаты сравнительной оценки выявления антител мультиплексным тестом (МПТ) и наборами для ИФА, изготовленными с использованием одинаковых антигенов

Инфекция	Определено образцов				Число несовпадений	Совпадение результатов, %
	Положительных		Отрицательных			
	ИФА	МПТ	ИФА	МПТ		
Токсоплазмоз	56	59	94	91	3	98
Краснуха	114	115	36	35	1	99
ЦМВИ	110	113	40	37	3	98
Простой герпес	133	134	17	16	1	99
Сифилис	14	15	136	135	1	99
Хламидиоз	21	21	129	129	0	100
Уреаплазмоз	52	64	98	86	12	92
Микоплазмоз	58	76	92	74	18	88

Видно, что результаты, полученные с использованием в двух тест-системах одинаковых рекомбинантных антигенов *T. gondii*, *Rubella virus*, *CMV*, *HSV*, *T. pallidum* и *C. trachomatis* в ИФА и мультиплексном анализе совпадают на 98–100%. На антигенах, представленных лизатами возбудителей мико- и уреаплазмоза, мультиплексный анализ выявлял значительно больше позитивных сывороток, чем ИФА. Совпадения результатов составляли 92 и 88%, соответственно. Объяснить это, вероятно, можно недостаточно хорошей очисткой антигенов. При проведении ИФА антител к *M. hominis* и *U. urealyticum* фоновые сигналы определялись в диапазоне 0,150–0,300 ОЕ. В дот-анализе такие сигналы визуализируются в виде слабо окрашенных, но отчетливо различимых пятен и могут интерпретироваться как положительный результат.

Таким образом, чувствительность и специфичность определяются в основном качеством применяемых в них антигенов. Используемые нами рекомбинантные антигены обеспечивали достаточно высокие показатели чувствительности и специфичности мультиплексного анализа. Антигены на основе лизатов натуральных возбудителей в ряде случаев провоцировали высокий уровень фоновых сигналов, что затрудняло визуальный учет результатов.

Для проверки воспроизводимости результатов мультиплексного анализа распечатывали по 160 белковых чипов на 3 листах синтетической бумаги. После блокировки и стабилизации чипов из разных мест каждого листа вырезали по 6 чипов и параллельно в одинаковых условиях проводили на них анализ одного и того же образца сыворотки. Результаты учитывали визуально. Отмечены незначительные различия в интенсивности визуальных сигналов на отдельных чипах, связанные с небольшими отклонениями во времени проявления, однако эти различия никак не сказывались при качественном учете результатов анализа. Все использованные чипы идентично выявляли спектр антител образца, что подтверждает хорошую воспроизводимость при серийном изготовлении чипов.

При исследовании стабильности, упакованные белковые чипы хранили при температуре 2–8°C и ежемесячно исследовали их работоспособность и чувствительность. Полученные данные показали, что чипы адекватно выявляют весь спектр контролируемых антител и не теряют чувствительности в течение года.

Все исследования эксплуатационных свойств мультиплексного дот-анализа антител к возбудителям инфекций TORCH-комплекса и инфекций мочеполовой сферы выполнены с визуальным учетом результатов. Исследования показали, что тест может обеспечивать высокие показатели чувствительности, специфичности и воспроизводимости, сравнимые с показателями моноспецифических иммуноферментных тест-систем.

Набор для комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям (Патент РФ № 2495434; Ersh et al., 2014; Epi, 2015; Epi и др., 2015)

Схема анализа приведена на рисунке 39, а схема размещения реагентов захвата на матице – на рисунке 40. Матрица для мультиплексного выявления антител к возбудителям детских вакциноуправляемых вирусных инфекций (ДВИ) включает набор антигенов вирусов: краснухи (*Rubella virus*), кори (*Measles virus*) и паротита (*Mumps virus*), а также IgG человека как положительный контроль.

Корь, краснуха и эпидемический паротит относятся к вирусным антропонозным инфекциям с одинаковым путем передачи и сходной контагиозностью. Традиционно они считаются детскими инфекциями, однако в последнее время все 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 ликвидацию этих болезней. В Российской Федерации действуют национальные проекты по элиминации этих инфекций, в результате реализации которых удалось снизить заболеваемость до спорадических случаев (*Постановление Главного государственного врача РФ №23 от 12.04.2010*). Однако периодически в ряде регионов России эпидемиологическая ситуация по кори осложняется, отмечается рост заболеваемости краснухой и эпидемическим паротитом.

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 путем серологического обследования. Мультиплексный тест создан, как альтернатива ИФА, для осуществления скрининга поствакцинального иммунитета в условиях недостаточно оснащенных медицинских учреждений.

Сравнение эффективности выявления антител класса G к вирусам краснухи, кори и паротита с применением наборов для ИФА и мультиплексного дот-иммуноанализа проводили на рабочей панели сывороток, а оценку лимита определения – на серии калибровочных образцов из соответствующих ИФА тест-систем, производства ЗАО «Вектор-Бест». Результаты дот-анализа сначала учитывали визуально, а затем изображение иммуночипов оцифровывали с использованием планшетного сканера и анализировали с применением компьютерной программы. Результаты сравнительного исследования приведены в таблице 13, а в обобщенном виде – в таблице 14.

Таблица 14

Результаты определения IgG к вирусам кори, паротита и краснухи в образцах рабочей панели сывороток с применением наборов для ИФА и мультиплексного теста (МПТ) (приведено из Ерш и др., 2015)

№ обр.	Корь			Паротит			Краснуха		
	МБС	Вектор-Бест	МПТ	МБС	Вектор-Бест	МПТ	МБС	Вектор-Бест	МПТ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,065	0,078	6,0	0,142	0,086	3,3	0,669	>2	67,0
2	0,082	0,120	25,0	0,148	0,194	2,6	1,214	>2	83,0
3	0,262	0,237	16,0	0,167	0,123	11,0	0,753	>2	57,0
4	0,099	0,279	8,8	0,186	0,083	1,2	0,218	0,489	16,0
5	0,079	0,128	7,2	0,172	0,112	5,5	1,105	>2	49,0
6	1,808	>2	68,0	1,268	1,564	85,0	0,830	>2	65,0
7	0,083	0,096	8,8	1,141	0,987	55,0	0,566	1,945	45,0
8	1,235	1,464	50,0	0,649	0,738	37,0	0,412	1,929	36,0
9	1,665	>2	58,0	1,180	0,913	51,0	0,355	0,999	22,0
10	0,311	0,529	16,0	1,706	1,720	75,0	0,854	>2	55,0
11	0,173	0,086	1,3	0,165	0,072	1,0	0,168	1,539	21,0
12	0,176	0,129	3,6	0,145	0,070	4,1	0,832	>2	81,0
13	0,071	0,113	1,0	0,348	0,483	18,0	0,103	0,797	30,0
14	0,071	0,119	6,9	0,168	0,172	13,0	0,173	1,274	35,0
15	0,075	0,095	4,6	0,143	0,139	3,2	0,667	>2	74,0
16	1,733	1,868	66,0	0,394	0,441	16,0	1,365	>2	82,0
17	1,246	1,673	49,0	0,257	0,182	11,0	0,046	0,089	2,4
18	1,224	1,024	46,0	0,164	0,121	9,3	0,070	0,427	8,2

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
19	0,403	0,542	12,0	0,176	0,149	5,0	0,268	0,893	21,0
20	1,591	1,648	59,0	0,415	0,661	21,0	0,488	>2	39,0
21	1,503	>2	24,0	0,372	0,407	8,1	0,234	0,642	20,0
22	0,451	0,832	22,0	0,284	0,258	3,7	0,424	1,266	45,0
23	0,317	0,668	34,0	0,325	0,304	7,8	0,920	>2	87,0
24	0,762	1,112	29,0	1,308	0,753	19,0	0,690	1,911	46,0
25	1,576	>2	60,0	>2	0,698	29,0	0,729	1,646	49,0
26	0,191	0,446	7,8	0,173	0,312	5,7	0,985	>2	61,0
27	1,277	1,999	40,0	0,611	0,333	14,0	0,219	0,758	24,0
28	1,133	1,650	28,0	0,355	0,291	4,5	0,191	1,026	34,0
29	1,822	>2	47,0	0,444	0,401	8,1	0,040	0,079	1,9
30	0,078	0,230	1,4	0,187	0,104	0,7	0,036	0,079	0,4
31	0,151	0,512	11,0	0,303	0,369	9,8	0,041	0,092	0,3
32	0,467	0,423	13,0	1,475	0,804	20,0	0,040	0,082	1,7
33	0,131	0,357	4,6	0,209	0,366	4,3	0,037	0,112	1,0
34	0,537	0,999	22,0	1,042	0,582	22,0	0,042	0,118	0,2
35	0,139	0,492	4,5	0,907	0,426	11,4	0,057	0,081	0,9
36	0,386	0,121	4,0	0,499	0,348	1,6	0,041	0,078	0,5
37	0,828	1,469	27,0	0,218	0,080	3,0	1,645	>2	54,0
38	0,878	0,957	25,0	0,212	0,085	9,0	0,836	0,639	29,0

Окончание таблицы 14

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
39	>2	>2	62,0	0,112	0,074	4,0	>2	>2	70,0
40	1,826	1,678	39,0	0,113	0,077	7,0	0,438	0,535	26,0
41	0,997	0,829	30,0	0,685	0,414	44,0	>2	>2	69,0
42	0,865	1,936	39,0	0,429	0,256	26,0	>2	>2	63,0
43	0,752	1,347	34,0	0,514	0,499	26,0	>2	>2	89,0
44	0,412	0,646	24,0	0,385	0,422	20,0	0,123	0,159	2,4
45	0,964	0,809	28,0	0,574	0,471	26,0	>2	>2	62,0
ОП _{крит}	0,268	0,318	10,0	0,351	0,416	15,0	0,245	0,493	15,0
Калибровочные образцы из тест-систем, производства ЗАО «Вектор-Бест»									
Антитела к вирусу кори, МЕ	МЕ	БЕСТ	МПТ	Антитела к вирусу краснухи, МЕ	МЕ	БЕСТ	МПТ		
	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	0,164	19,0		
	0	0,098	0,8		0	0,072	0,2		

Примечание. В таблице приведены значения оптической плотности (ОП₄₅₀), полученные при анализе образцов с использованием наборов для ИФА (ЗАО «МБС» и ЗАО «Вектор-Бест»), а также оптические сигналы (в относительных единицах), зарегистрированные с применением иммуночипов. Заливкой выделены образцы, положительные по результатам теста. Жирным шрифтом выделены образцы с протективными титрами антител. МЕ – международные единицы.

Таблица 15

Обобщенные данные результатов, представленных в таблице 14
(приведено из Ерш и др., 2015)

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

Примечание: в последних столбцах в скобках указано число образцов, дифференцированных с помощью программы учета (визуальная оценка этих образцов затруднена). + – положительные образцы. – – отрицательные образцы.

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 (*Legutki et al., 2010*). Доступные в литературе данные относительно минимальных протективных уровней антител неоднозначны. Так для краснухи этот уровень варьирует от 10 (*Юминова Н.В., 2004*) до 25 МЕ/мл (*Постановление Главного государственного санитарного врача РФ № 108*), а для кори – от 0,2 (*Arguelles M. H. et al., 2006*) до 0,5 МЕ/мл (*Bouche F. et al., 1998*). Вероятно, такая неоднозначность связана с различиями подходов авторов к комплексной оценке гуморальных и клеточных факторов иммунитета. Ряд наборов для ИФА антител к вирусам краснухи и кори содержит калибровочные образцы с определенным содержанием специфических антител. Такие образцы из наборов ЗАО «Вектор-Бест» мы использовали для калибровки мультиплексного теста. Результаты приведены в нижней части таблицы 14, а вид иммуночипов после калибровки показан на рисунке 40. 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 13 жирным шрифтом.

Видно, что результаты по определению защитных уровней антител наборами ЗАО «Вектор-Бест» и многопрофильным дот-анализом совпадают. На иммуночипах оптические сигналы от сывороток с протективными уровнями антител выглядят как отчетливо

различимые невооруженным глазом темные пятна в местах нанесения соответствующих антигенов (см. рис. 42).

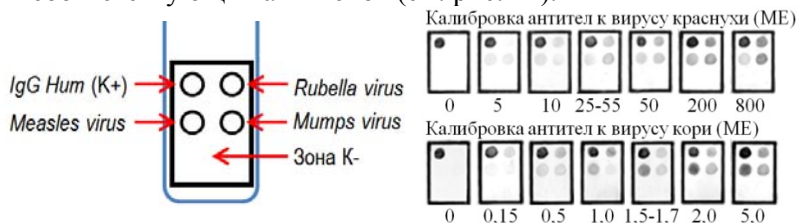


Рис. 42. Схема размещения антигенов на матрице и вид матриц после оценки калибровочных образцов с разным содержанием антител к вирусам краснухи и кори.

Таким образом, учет результатов анализа таких образцов может легко и надежно осуществляться визуально.

Цифровые значения, полученные при инструментальном учете результатов дот-анализа, позволяют проводить расчет статистических показателей тестирования. Данные корреляционного анализа оптических сигналов, приведенных в таблице 13, показаны в таблице 15.

Корреляция результатов, полученных с применением иммуночипов и двух наборов для количественного определения антител к вирусам краснухи, кори и паротита методом ИФА, сопоставима по своему значению с корреляцией данных между этими ИФА-наборами.

Таблица 16

Коэффициенты корреляции данных таблицы 14, полученных с использованием разных наборов для определения антител класса

G к вирусам кори, паротита и краснухи

(приведено из Ерш и др., 2015)

Инфекция	Набор	МБС	Вектор-Бест	МПП
Корь	МБС	1,000	0,926	0,904
	Вектор Бест	0,926	1,000	0,877
Паротит	МБС	1,000	0,828	0,722
	Вектор Бест	0,828	1,000	0,902
Краснуха	МБС	1,000	0,799	0,814
	Вектор Бест	0,799	1,000	0,913

Это свидетельствует о том, что мультиплексный анализ может быть использован для количественной оценки протективных уровней антител и в этом отношении не уступает тест-системам для

ИФА.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 учета их содержания. Такие образцы, положительные по антителам к вирусу паротита, в таблице 14 также выделены жирным шрифтом.

Приведенные выше данные свидетельствуют о возможности эффективного использования мультиплексного набора для комплексной оценки поствакцинального иммунитета. При этом мультиплексный тест может значительно облегчить осуществление серомониторинга. По предварительным данным (ограниченное число экспериментов) для проведения этого теста можно использовать 5–10 мкл цельной капиллярной крови, которую легко можно получить проколом пальца. Это обстоятельство особенно важно в педиатрической практике, поскольку у малолетних детей взятие даже 5 мл крови из вены считается значительной кровопотерей. Таким образом, мультиплексный тест может служить инструментом для контроля коллективного и индивидуального иммунитета с целью коррекции мероприятий по борьбе с вакциноуправляемыми инфекциями.

Набор для комплексного выявления антител к возбудителям гемотрансмиссивных инфекций (ГТИ)

(*Poltavchenko et al., 2016c; Полтавченко и др. 2018, 2019*).

Белковая матрица для комплексного антител к возбудителям гемотрансмиссивных инфекций (ГТИ) – содержит антигены вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатита С (ВГС), гепатита В (ВГВ) и цитомегаловируса (ЦМВ); а также возбудителей сифилиса (*Treponema pallidum*) и токсоплазмоза (*Toxoplasma gondii*). Наборы предназначены для первичного тестирования доноров и населения из групп риска с целью диагностики ГТИ. Диагностическая роль наборов заключается в комплексном обследовании пациентов, поскольку ГТИ нередко встречаются в виде смешанных инфекций с разным сочетанием заболеваний этой группы. Схема анализа антител к возбудителям ГТИ аналогична схеме, приведенной на рисунке 39, а порядок размещения реагентов захвата на матрице отражен на рисунке 43.

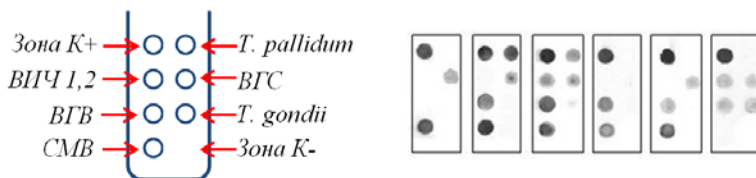


Рис. 43. Схема рабочей части белковой матрицы для комплексного выявления антител к возбудителям ГТИ и примеры результатов мультиплексного анализа образцов сыворотки крови.

Формат иммуночипа не позволяет одновременное определение антител и антигенов, поэтому вместо директивного маркера – поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), в мультиплексном тесте выявляется другой маркер вируса гепатита В – антитела к его ядерному антигену (анти-НВс). Эти антитела сравнительно быстро появляются в крови инфицированного и могут служить циркулирующим серологическим маркером инфекции (*WHO, 2009*). Кроме 4 возбудителей ГТИ (ВИЧ, ВГВ, ВГС и *T. pallidum*), анализ препаратов крови по которым предписан международными и региональными правилами, тест дополнен выявлением антител к ЦМВ и *T. gondii*, цикл развития которых связан с форменными элементами крови.

Сравнение результатов дот-анализа, с данными, полученными на наборах для ИФА производства ЗАО Вектор-Бест (В-Бест) и ЗАО Медико-биологический Союз (МБС), с использованием рабочей панели сывороток, включающей 20 образцов сывороток человека, содержащих антитела к возбудителям ГТИ в различных сочетаниях и концентрациях, приведено в таблице 17.

Несовпадения с результатами ИФА (в таблице выделены желтой заливкой) выявлены при анализе антител к ЦМВ, *T. pallidum* и *T. gondii*. В этих случаях по одной сыворотке в ИФА определены как отрицательные, а дот анализе, как положительные образцы. Затруднения при визуальном учете результатов дот-анализа (в таблице выделены жирным шрифтом) относятся к сывороткам с низким содержанием определяемых антител.

Из 120 показателей, полученных в нашей системе на панели из 20 сывороток, такими сигналами обладают 7 образцов (5,8%), 5 из которых при инструментальном учете определены как положительные.

Результаты, полученные с использованием этих наборов, различаются и по величине оптических сигналов на одинаковых образцах панели. Данные корреляционного анализа оптических сигналов, полученных при анализе образцов панели наборами для ИФА и мультиплексным тестом приведены в таблице 17.

Таблица 17

Результаты сравнительного анализа образцов рабочей панели сывороток с применением наборов для ИФА, а также мультиплексного теста (МПТ), n=3, p=0,95 (приведено из *Poltavchenko et al., 2016c*)

Возб.		ВИЧ			ВГС			ВГВ		
Набор		ИФА		МПТ	ИФА		МПТ	ИФА		МПТ
		В-Бест	МБС		В-Бест	МБС		В-Бест	МБС*	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Номер рабочей панели сывороток	1	3,42±1,2	3,16±0,6	77,4±5,2	2,64±1,0	2,96±0,5	80,8±9,7	0,82±0,2	0,10±0,1	55,9±6,4
	2	0,17±0,1	0,04±0,1	0,7±1,0	0,05±0,1	0,04±0,1	3,2±2,6	0,08±0,1	2,16±0,4	1,3±1,0
	3	3,45±0,6	2,87±0,4	84,0±9,3	2,96±0,5	3,15±0,4	83,4±8,7	2,14±0,4	0,10±0,1	52,6±8,2
	4	3,41±0,3	2,94±0,4	85,7±5,1	2,48±0,8	2,55±0,8	71,5±9,3	2,42±0,4	0,08±0,1	45,4±5,6
	5	3,39±0,4	3,15±0,5	84,2±4,2	2,54±0,4	2,84±0,5	77,1±6,4	0,15±0,1	1,99±0,3	1,3±1,2
	6	3,41±1,3	3,36±0,7	83,8±3,6	3,08±0,5	3,36±0,6	81,8±8,2	2,84±0,3	0,08±0,1	45,6±4,3
	7	3,41±0,6	3,38±0,5	68,9±8,2	0,45±0,2	0,55±0,4	13,1±6,3	2,65±0,5	0,08±0,1	58,1±6,6
	8	3,43±0,8	3,40±0,5	60,8±6,4	0,18±0,1	0,04±0,1	6,4±2,8	0,07±0,1	2,34±0,5	1,9±1,3
	9	0,07±0,1	0,10±0,1	0,7±0,8	0,05±0,1	0,04±0,1	0,7±1,0	0,12±0,1	2,18±0,5	1,9±1,0
	10	0,28±0,1	0,12±0,1	5,2±1,4	0,09±0,1	0,04±0,1	1,0±1,0	0,12±0,1	2,56±0,6	0,6±1,0
	11	3,65±0,8	3,42±0,8	80,4±6,3	0,05±0,1	0,06±0,1	2,6±1,2	3,18±0,6	0,45±0,5	36,5±0,4
	12	3,65±0,7	3,52±0,3	84,6±5,8	2,19±0,9	2,49±0,5	63,3±6,8	0,14±0,1	1,98±0,4	0,8±1,0
	13	3,68±0,7	3,53±0,6	87,0±6,9	0,05±0,1	0,05±0,1	1,9±1,6	0,17±0,1	1,90±0,4	2,5±2,0
	14	3,69±0,2	3,46±0,4	52,2±4,2	2,48±0,4	2,19±0,6	35,8±2,8	0,06±0,1	1,99±0,5	4,3±2,4
	15	3,65±1,5	3,23±0,5	70,2±9,2	0,06±0,1	0,04±0,1	1,2±1,0	0,10±0,1	2,52±0,4	0,6±1,0

Продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	16	0,08±0,1	0,04±0,1	1,3±1,2	0,05±0,1	0,05±0,1	3,0±2,0	0,08±0,1	2,14±0,3	4,3±1,6
	17	2,45±0,4	2,14±0,3	64,0±5,6	2,41±0,6	2,12±0,5	34,5±3,4	0,15±0,1	0,30±0,1	11,0±1,5
	18	2,21±0,5	2,56±0,5	57,9±5,3	0,06±0,1	0,04±0,1	3,0±2,2	0,09±0,1	2,13±0,6	1,9±1,0
	19	2,34±0,5	2,98±0,5	52,0±5,3	1,83±0,4	2,14±0,5	46,8±4,1	0,09±0,1	1,41±0,4	1,8±1,0
	20	2,36±0,6	2,42±0,4	48,2±3,4	1,62±0,6	1,63±0,3	18,4±2,3	0,07±0,1	2,64±0,5	1,3±1,2
ОС _{крит}		0,30	0,24	10,0	0,25	0,24	10,0	0,27	0,80	13,0
Возб.		Treponema pallidum			ЦМВ			Toxoplasma gondii		
Набор		ИФА		МПТ	ИФА		МПТ	ИФА		МПТ
		В-Бест	МБС		В-Бест	МБС		В-Бест	МБС	
Номер рабочей панели сыровороток		2,89±0,3	3,12±0,5	85,1±6,2	2,14±0,6	1,82±0,3	36,6±6,4	2,33±0,5	2,11±0,3	64,5±4,2
	2	0,21±0,1	0,16±0,1	11,1±2,4	0,80±0,6	0,4±0,2	18,4±3,3	0,08±0,1	0,09±0,1	0,8±0,6
	3	0,06±0,1	0,10±0,1	6,5±2,1	2,54±0,5	2,11±0,4	68,0±4,9	2,52±0,4	2,47±0,6	72,5±6,1
	4	0,05±0,1	0,06±0,1	4,9±2,2	1,70±0,3	1,65±0,4	34,8±5,5	0,37±0,2	0,12±0,1	9,2±1,0
	5	0,06±0,1	0,06±0,1	6,6±2,8	2,48±0,3	2,51±0,3	68,2±8,3	0,10±0,1	0,08±0,1	4,7±1,0
	6	0,07±0,1	0,06±0,1	1,0±0,6	2,18±0,3	2,36±0,4	63,7±5,2	0,09±0,1	0,10±0,1	1,3±1,0
	7	1,42±0,1	1,11±0,4	46,0±9,1	2,24±0,4	2,21±0,6	51,9±5,2	0,10±0,1	0,10±0,1	0,7±1,0
	8	0,06±0,1	0,07±0,1	0,1 ±0,1	0,46±0,1	0,15±0,1	15,2±1,0	0,07±0,1	0,10±0,1	2,1±1,0
	9	0,07±0,1	0,08±0,1	6,4±2,2	1,86±0,4	2,31±0,3	50,4±6,8	0,55±0,3	0,42±0,2	17,4±2,3
	10	0,06±0,1	0,07±0,1	6,2±2,0	2,12±0,3	2,46±0,5	54,9±5,2	0,08±0,1	0,08±0,1	1,3±0,5
	11	0,06±0,1	0,06±0,1	3,2±0,8	2,46±0,4	2,85±0,5	61,3±5,2	1,95±0,4	1,05±0,2	31,5±2,5

Окончание таблицы 17

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	12	0,06±0,1	0,06±0,1	2,0±1,0	2,75±0,5	3,12±0,4	64,6±4,4	2,65±0,4	2,26±0,4	72,0±4,6
	13	2,56±0,4	2,32±0,5	54,4±5,4	2,78±0,5	3,01±0,4	68,4±5,8	2,44±0,3	2,43±0,5	69,7±5,2
	14	0,06±0,1	0,06±0,1	1,3±1,0	0,20±0,1	0,1±0,1	4,3±1,0	0,08±0,1	0,08±0,1	0,8±1,0
	15	0,07±0,1	0,1±0,1	0,6±0,6	1,53±0,4	2,13±0,3	43,6±8,4	0,09±0,1	0,09±0,1	1,3±1,0
	16	0,05±0,1	0,06±0,1	1,1±0,6	0,2±0,1	0,12±0,1	5,4±0,2	0,09±0,1	0,08±0,1	0,8±1,0
	17	0,87±0,2	1,95±0,4	47,5±4,8	2,11±0,2	1,63±0,5	23,4±2,6	1,57±0,2	1,04±0,3	37,4±2,9
	18	0,68±0,2	0,70±0,1	24,2±2,6	1,22±0,1	1,89±0,2	25,4±3,3	2,14±0,6	2,00±0,8	49,3±3,1
	19	0,27±0,1	0,80±0,3	28,1±4,2	1,40±0,5	1,45±0,7	23,1±3,5	0,51±0,1	0,2±0,1	17,7±2,5
	20	0,05±0,1	0,06±0,1	1,9±1,0	1,69±0,3	1,95±0,5	30,0±2,6	0,79±0,2	0,48±0,1	25,5±2,0
ОС _{крит}		0,30	0,25	14,0	0,30	0,27	14,0	0,30	0,30	12,0

Примечания к табл. 17:

– в таблице приведены средние значения оптических сигналов (ОС) 3 параллельных определений образца и доверительный интервал для вероятности 95%;

– * положительными считаются результаты со значениями < ОС_{крит};

– положительные результаты выделены заливкой, а несовпадающие результаты – курсивом;

– результаты, вызывающие затруднения при визуальном учете, выделены жирным шрифтом.

Таблица 18

Коэффициенты корреляции данных таблицы 17, полученных с использованием разных наборов для определения антител к возбудителям ГТИ (приведено из Полтавченко и др., 2018)

Возбудитель	Набор	Вектор-Бест	МБС	МПТ
ВИЧ	Вектор-Бест	1,000	0,980	0,949
	МБС	0,980	1,000	0,926
ВГС	Вектор-Бест	1,000	0,986	0,870
	МБС	0,986	1,000	0,916
ВГВ	Вектор-Бест	1,000	0,802	0,868
	МБС	0,802	1,000	0,879
<i>T. pallidum</i>	Вектор-Бест	1,000	0,939	0,896
	МБС	0,939	1,000	0,980
ЦМВ	Вектор-Бест	1,000	0,933	0,910
	МБС	0,933	1,000	0,898
<i>T. gondii</i>	Вектор-Бест	1,000	0,961	0,966
	МБС	0,961	1,000	0,971

Видно, что коэффициенты корреляции результатов, полученных с применением иммуночипов и двух наборов для ИФА, сопоставимы по своему значению с коэффициентами корреляции данных между тестами для ИФА. Таким образом, мультиплексный тест по сравнению с ИФА-наборами сравнения выглядит не хуже, чем эти наборы по отношению друг к другу.

Более масштабное сравнение диагностических характеристик наборов для ИФА и мультиплексного теста выполняли с использованием массива из 240 клинических образцов сыворотки крови. Подсчитывали общее число положительных и отрицательных образцов, одинаково квалифицированных более чем половиной референс-тестов, а также количество положительных и отрицательных образцов, определенных каждым тестом. Результаты оценки приведены в таблице 19.

Таблица 19

Сравнительный анализ специфических антител в массиве из 240 образцов сывороток с применением коммерческих наборов для ИФА и мультиплексного теста (МПТ) (приведено из Полтавченко и др., 2018)

Наборы	Число образцов, квалифицированных по содержанию антител к:											
	ВИЧ 1,2		ВГС		ВГВ		<i>T.pallidum</i>		<i>T.gondii</i>		ЦМВ	
	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–
<i>1</i>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Всего определено	197	43	148	92	113	127	24	210	84	156	201	39
В-Бест	197	43	148	87	109	121	21	210	–	–	–	–
Чувствительность, %	100		100		96		88		–	–	–	
Специфичность, %		100		94		95		100		–	–	–
МБС	197	43	145	89	107	122	24	210	82	153	200	37
Чувствительность, %	100		98		95		100		98		99	
Специфичность, %		100		97		96		100		98		95
ДС	197	43	148	80	–	–	24	209	84	148	196	37
Чувствительность, %	100		100		–		100		100		98	
Специфичность, %		100		86		–		99		95		95
ЭКОлаб	197	43	–	–	111	121	24	205	–	–	–	–
Чувствительность, %	100		–		98		100		–		–	
Специфичность, %		100		–		95		98		–		–

Окончание таблицы 19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ИмДи-спектр	197	43	–	–	–	–	–	–	82	149	188	39
Чувствительность, %	100		–		–		–		98		94	
Специфичность, %		100		–		–		–		95		100
МПТ	197	43	148	90	109	121	24	205	84	150	198	38
Чувствительность, %	100		100		96		100		100		98	
Специфичность, %		100		98		95		98		96		97

Примечания: производители наборов для ИФА: В-Бест – ЗАО «Вектор-Бест (Новосибирск); МБС – ЗАО «Медико-биологический союз» (Бердск); ДС – НПО «Диагностические системы» (Н-Новгород); ЭКОлаб – фирма «ЭКОлаб» (Электрогорск); ИмДи-спектр – ООО «ИмДи-спектр» (Кольцово).

Жирным шрифтом выделено число образцов, квалифицированных не менее чем 50% референс-наборов.

Заливкой выделены расчетные данные.

«–» – не определяли.

Графическое сравнение аналитической чувствительности дот-анализа и ИФА представлено на рисунке 44.

Графики наглядно показывают, что мультиплексный анализ по чувствительности не уступает ИФА.

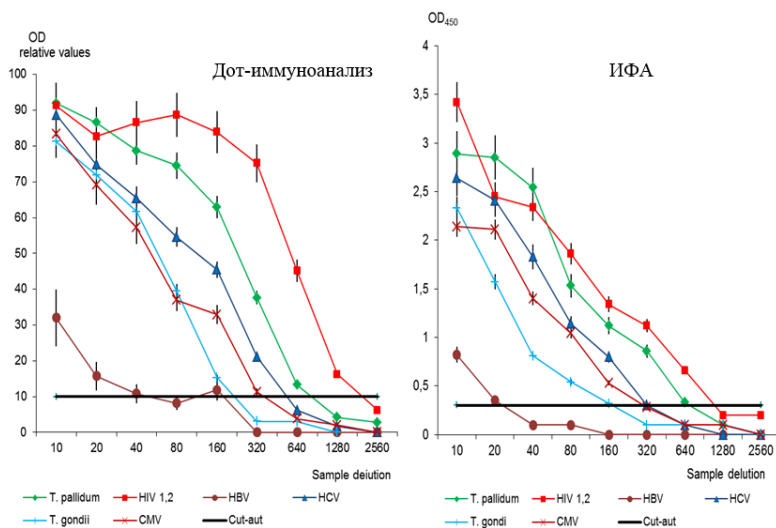


Рис. 44. Сравнительная оценка чувствительности выявления маркеров ГТИ в образце №1 рабочей панели дот-анализом на белковых матрицах и ИФА-наборами ЗАО «Вектор-Бест» (приведено из *Poltavchenko et al., 2016c*).

График, построенный по данным дот-анализа калибровочных образцов антител к *T. gondii* из тест-системы ЗАО «ЭКОлаб», приведен на рисунке 45.

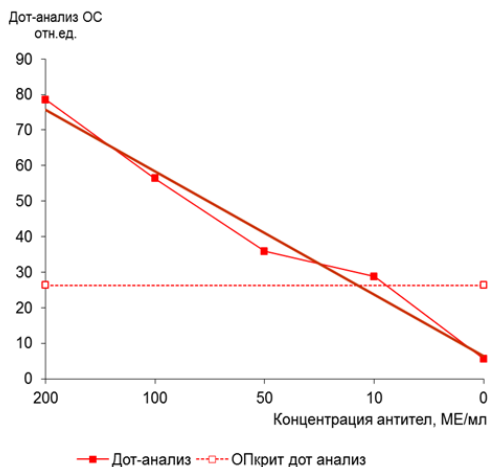


Рис. 45. График зависимости оптических сигналов дот-анализа от концентрации антител к *Toxoplasma gondii* в исследуемом образце (приведено из *Poltavchenko et al.*, 2016с).

Представленные на графике данные хорошо аппроксимируются прямой (см. линию тренда), что позволяет проводить полуколичественную оценку содержания определяемого маркера в образце.

В таблице 20 приведены результаты оценки набора на коммерческих контрольных и стандартных панелях сывороток.

Таблица 20

Характеристики контрольных и стандартных панелей сывороток и результаты их определения в мультиплексном дот-иммуноанализе (приведено из *Полтавченко и др.*, 2018)

Наименование панели	Характеристики панели		Результаты анализа	
	+	–	+	–
МБС, Контроль АТ(+/-)ВИЧ-1,2	6	2	6	2
МБС, Контроль АТ(+/-) <i>T.pallidum</i>	4	2	4	2
МБС, Контроль АТ(+/-) ЦМВ	5	3	5	3
МБС, Контроль АТ(+/-) <i>T. gondii</i>	5	3	5	3
МБС, Контроль АТ(+/-) ВГС	4	4	4	4
МБС, Контроль АТ(+/-) НВeAg	4	4	4	4
ДС «ДС-Стандартная панель-анти-НCV»	20	8	19	9

Видно, что мультиплексный тест адекватно определяет все положительные и отрицательные образцы панелей. Данные таблицы показывают, что мультиплексный дот иммуноанализ обеспечивает диагностическую чувствительность и специфичность выявления всех маркеров ГТИ не ниже 95% и не уступает характеристикам коммерческих наборов для ИФА.

В таблице 21 приведены результаты оценки воспроизводимости результатов внутри одной серии и между разными сериями наборов.

Видно, что коэффициент вариации (Kv) сигналов для отдельных маркеров, как внутри серии, так и между сериями не превышает 7%, что является показателем воспроизводимости, удовлетворяющим требованиям ГОСТ Р 51352-99 ($Kv < 12$).

При испытании стабильности мультиплексных наборов цифровые значения инструментального учета результатов дот-анализа позволяют не только определять предельный срок хранения, но и объективно оценивать степень снижения оптического сигнала по каждому маркеру в различных условиях и периодах хранения. Примеры оценки стабильности наборов в условиях хранения при температуре 4°C приведены в таблице 21.

Видно, что при хранении в рекомендованных условиях в течение 12 месяцев максимальное снижение оптических сигналов по отношению к исходным составляет менее 13%, что не сказывается заметно на диагностических характеристиках набора.

Приведенные выше данные свидетельствуют о возможности эффективного использования мультиплексного набора для первичной комплексной оценки содержания маркеров инфекционных заболеваний в образце. Это подтверждено и при проведении межлабораторных испытаний мультиплексного набора. Результаты испытаний приведены в таблице 22.

Таблица 21

Результаты оценки воспроизводимости оптических сигналов при определении антител к возбудителям ГТИ в образце №1 рабочей панели сывороток при серийном изготовлении наборов
(приведено из *Poltavchenko et al., 2016c*)

Серия	Набор	Результаты определения антител к возбудителям ГТИ в образце №1 рабочей панели сывороток, относит. ед. (n = 5, p = 0,95)					
		ВИЧ	ВГС	ВГВ	ЦМВ	<i>T.pallidum</i>	<i>T.gondii</i>
001	1	96,2±3,1	95,3±4,1	50,5±3,6	84,2±4,8	89,6±5,1	94,2±6,1
	2	95,4±3,2	91,7±3,2	47,2±3,5	85,1±4,4	90,5±5,3	86,3±6,2
	3	88,4±4,8	92,5±3,6	47,4±3,8	87,2±3,6	97,1±4,9	84,3±5,4
	<i>Kv, % (n=15)</i>	4,7	2,3	3,5	1,8	4,7	6,0
002	1	91,0±6,2	91,3±3,5	56,4±4,5	85,4±4,8	90,4±5,2	90,3±5,2
	2	83,2±5,4	89,8±2,4	51,2±2,3	83,1±3,7	91,5±5,6	87,2±5,2
	3	95,3±4,9	90,0±2,6	52,4±2,7	90,3±5,1	96,0±7,4	83,6±5,8
	<i>Kv, % (n=15)</i>	6,8	1,1	4,9	4,2	3,5	4,0
003	1	85,3±5,1	84,3±4,5	57,5±3,4	82,3±5,7	88,5±4,6	93,7±5,1
	2	82,4±3,7	91,5±4,9	50,2±2,6	85,5±3,3	91,1±5,3	89,7±4,7
	3	91,4±6,3	93,0±3,4	50,4±2,2	91,4±3,2	92,0±5,3	87,4±4,3
	<i>Kv, % (n=15)</i>	5,3	5,3	4,5	5,3	2,3	3,4
<i>Kv, % (n=45)</i>		5,9	3,4	6,8	3,5	3,3	4,3

Примечания к таблице 21:

- в таблице приведены среднее и доверительный интервал для данных трех серий;
- заливкой выделены расчетные данные.

Таблица 22

Результаты оценки интенсивности оптических сигналов (ОС) при испытаниях долговременной стабильности экспериментальных образцов набора для мультиплексного анализа маркеров 6 гемотрансмиссивных инфекций
(приведено из *Poltavchenko et al., 2016c*)

Срок хранения	Серия	Оптические сигналы, измеряемые программой инструментального учета при анализе образца №1 рабочей панели образцов предприятия, в относительных единицах					
		ВИЧ	ВГС	ВГВ	ЦМВ	T. pallidum	T. gondii
0 мес.	001	95,7	95,0	50,0	83,7	89,3	93,8
	002	83,2	88,6	51,1	83,3	90,8	87,0
	003	91,0	93,0	49,9	91,0	92,2	86,7
	M $\pm\epsilon_{0,95}$	90,0 $\pm$ 0,2	92,2 $\pm$ 0,1	50,3 $\pm$ 0,1	86,0 $\pm$ 0,6	90,8 $\pm$ 0,1	89,2 $\pm$ 0,1
	ОС, %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3 мес.	001	95,0	94,9	50,0	84,0	89,0	94,0
	002	83,5	88,0	50,1	81,0	91,8	86,0
	003	93,0	94,3	50,0	90,0	90,6	86,6
	M $\pm\epsilon_{0,95}$	90,5 $\pm$ 0,2	92,4 $\pm$ 0,1	50,0 $\pm$ 0,1	85,0 $\pm$ 0,2	90,5 $\pm$ 0,1	88,7 $\pm$ 0,2
	ОС, %	100,5	102,0	99,4	98,8	99,7	99,4
6 мес.	001	93,0	92,8	48,8	82,7	87,1	90,0
	002	82,7	85,0	49,1	80,0	90,2	85,1
	003	90,1	93,2	48,4	88,8	88,7	85,0
	M $\pm\epsilon_{0,95}$	88,6 $\pm$ 0,2	90,3 $\pm$ 0,2	48,8 $\pm$ 0,1	83,8 $\pm$ 0,2	88,7 $\pm$ 0,1	86,7 $\pm$ 0,1
	ОС, %	98,4	97,9	97,0	96,5	97,7	97,2

Окончание таблицы 22

9 мес.	001	90,2	89,7	46,5	79,0	84,2	88,6
	002	80,6	82,1	47,7	78,5	88,6	83,0
	003	86,5	90,5	46,2	85,8	85,5	83,1
	$M \pm \epsilon_{0,95}$	85,8 $\pm$ 0,3	87,4 $\pm$ 0,3	46,8 $\pm$ 0,2	81,1 $\pm$ 0,3	86,1 $\pm$ 0,3	84,9 $\pm$ 0,2
	ОС, %	95,3	94,8	93,0	94,3	94,8	95,2
12 мес.	001	86,3	85,1	43,3	75,9	80,9	85,7
	002	77,3	78,6	44,0	75,0	85,3	80,3
	003	81,0	86,5	44,1	81,4	81,8	80,6
	$M \pm \epsilon_{0,95}$	81,5 $\pm$ 0,2	83,4 $\pm$ 0,2	43,8 $\pm$ 0,1	77,4 $\pm$ 0,2	82,7 $\pm$ 0,2	82,2 $\pm$ 0,3
	ОС, %	90,6	90,4	87,1	90,0	91,1	92,2
ОПкрит		19,9	16,1	24,1	21,0	15,0	18,9

Примечания к таблице 22:

- $M \pm \epsilon_{0,95}$ – среднее и доверительный интервал для данных трех серий ($n = 3$, $p = 0,95$);
- ОС – оптический сигнал, в процентах от исходного (0 мес.) сигнала;
- заливкой выделены ячейки с расчетными данными.

Таблица 23

Процент совпадения качественных результатов
в дот-иммуноанализе и ИФА при проведении
межлабораторных испытаний набора

Лаборатория	Выполнено анализов	ВИЧ	ВГС	ВГВ	<i>T.pallidum</i>	ЦМ В	<i>T.gondii</i>
ГБУЗ «НРБ №1», п. Кольцово	50	100	95	95	90	Н.о.	Н.о.
ГБУЗНСО «ГИКБ №1» г. Новосибирск	30	100	97	86 *	97	97	97
ЗАО «ИмДи», г. Новосибирск	35	100	100	95	97	97	95
БУЗ ВО «Воронежский областной центр профилактики и борьбы со СПИД»	20	100	100	75 *	90 **	100	100
ТОО «Городской центр ПМСП», г. Караганда, Казахстан	4x5	Н.о.	100	100	Н.о.	100	100
КГП «ОДКБ», г. Караганда, Казахстан	20	100	100	100	100	100	100
ОсОО «Аква- лаборатория», г. Бишкек, Кыргызстан	15	100	100	100	100	100	100
ООО «Диамед», г. Душанбе, Таджикистан	15	100	100	100	100	100	100

Примечания к таблице 23:

* Несовпадения с тестом для выявления HBsAg. По сравнению с тестами для выявления HBsAg, тесты для выявления антител к вирусу гепатита В квалифицируют как положительные большее количество проб, поскольку положительно определяют образцы от пациентов, вакцинированных против гепатита В (Ющук и др., 2014; Kamath et al., 2014).

*** Несовпадение с кардиолипновым тестом, но совпадение с результатами ИФА. Кардиолипновый тест неспецифичен и может давать положительные результаты при биохимических изменениях в составе крови не связанных с заболеванием сифилисом (Wicher et al., 1999).*

Участниками испытаний отмечены следующие **положительные стороны** набора:

1) возможность одновременного выявления в препаратах крови маркеров 6 возбудителей ГТИ, что особенно удобно для многопрофильных стационаров;

2) хорошее совпадение результатов дот-анализа с данными ИФА (конкретные данные приведены в таблице 23);

3) хорошая воспроизводимость результатов анализа (отмечено ТОО «Городской центр ПМСП», г. Караганда, Казахстан при исследовании образцов в 5 дублях);

4) возможность применения набора вне лаборатории без использования дополнительного оборудования;

5) простота использования, удобство в эксплуатации;

6) возможность проведения единичных и малосерийных исследований, что удобно для работы небольших лабораторий с малым объемом исследований;

7) возможность визуального учета результатов;

8) возможность выполнения анализа специалистом со средним медицинским образованием.

Следует отметить, что при испытаниях набора в ТОО «Городской центр ПМСП», г. Караганда, Казахстан случайно (ИФА не выполняли) выявлены и в дальнейшем подтверждены анамнестическими и лабораторными данными случаи ВИЧ инфекции и сифилиса, что подтверждает тезис об актуальности комплексного обследования.

Как **недостатки** предлагаемого набора отмечены:

– неполное соответствие номенклатуры маркеров, выявляемых в мультиплексном анализе, современному регламенту исследования (необходимо выявление HBsAg и антигена p24 ВИЧ), что не позволяет использовать набор в официальной практике диагностических центров;

– многоэтапность процедуры анализа и возможность ошибок, связанных с человеческим фактором;

– сложность одновременного выполнения большого количества (более 20) исследований, что вызывает сомнения в перспективности использования набора в лабораториях с большим потоком пациентов.

Кроме того, при проведении исследований в ряде случаев возникали сложности использования программы инструментального учета, связанные с использованием устаревшего компьютерного оборудования и операционных программ, а также с недостаточными навыками оператора.

Такой тест не позволяет дифференцировать антитела в активной фазе инфекции, от антител поствакцинального ответа или ранее перенесенного заболевания. Он предназначен для первичного тестирования, задачей которого является установление факта контакта пациента с возбудителем инфекционного заболевания. В последующем, при необходимости, выполняется детальное изучение последствий такого контакта (*Жибурт, 2010*). Наборы могут использоваться при реализации программ борьбы с ВИЧ и вирусными гепатитами.

Набор для комплексного выявления директивных маркеров возбудителей гемотрансмиссивных инфекций

(Патент РФ № 2686490)

Учитывая вышеприведенные замечания, была предпринята попытка модернизации набора – антигены *CMV* и *T. gondii* на матрице заменены на моноклональные антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) и раннему белку р24 ВИЧ (р24 HIV-1). Кроме того, схема размещения реагентов захвата на матрице (см. рис. 44) дополнена двумя контрольными точками: K₂⁺ – HBsAg и K₃⁺ – р24 HIV-1 для контроля работоспособности компонентов сложного конъюгата.

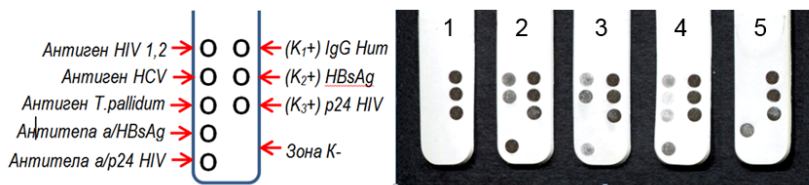


Рис. 46. Схема рабочей части белковой матрицы для комплексного выявления маркеров ГТИ и примеры результатов мультиплексного анализа образцов крови.

Принципиальная схема анализа осталась прежней (см. рис. 37), однако при его выполнении использовали сложный конъюгат, представляющий собой смесь золей золота, связанных с антителами: a/IgG-Hum, a/HBsAg и a/ HIV-1 p24.

Такой набор позволял выявлять все директивные маркеры ГТИ – маркеры, предписанные документами при обследовании групп риска (*WHO, 2009*). Однако при испытании набора установлено, что он позволяет достоверно выявлять антигены HBsAg и p24 HIV-1 в концентрации, превышающей 0,1 нг/мл, что значительно больше требуемого предела обнаружения (0,05 нг/мл). Возможно, использование термощейкера и длительных экспозиций, применяемых при постановке ИФА, позволили бы повысить чувствительности, однако при этом мультиплексный дот-анализ лишился бы своих важных преимуществ – оперативности и автономности.

Тем не менее, приведенные данные свидетельствуют о возможности использования того и другого вариантов мультиплексного набора для комплексного первичного тестирования образцов крови доноров и населения из групп риска. Результаты, полученные с использованием мультиплексного набора, недостаточны для назначения лечения или реализации организационных мероприятий, однако они позволяют оперативно и с небольшими трудозатратами ограничить спектр потенциальных инфекций, требующих дополнительного изучения. Применение наборов наиболее целесообразно в небольших (в том числе сельских) медицинских учреждениях, не имеющих собственной лабораторной базы. Они могут оказаться востребованы также при оценке потенциальной инфекционной опасности для пациентов и медицинского персонала при оказании экстренной хирургической и акушерской помощи в медицинских учреждениях любого уровня.

Мультиплексный анализ возбудителей инфекционных заболеваний

(Патент РФ № 2296995; Полтавченко и др., 2006а).

Мультиплексный иммуноанализ антигенов обычно предполагает использование двух видов антител: первичных (антител захвата) на подложке и вторичных (антител обнаружения) в растворе. Необходимость двух высоко специфичных антител к разным эпитопам каждого определяемого антигена является основной проблемой, ограничивающей сэндвич-подход в мультиплексном анализе белков (*Ekins, 1998; Espina et al., 2004*). За последнее десятилетие в каталогах ряда фирм, производящих иммунореагенты, появились пары специально подобранных моноклональных антител к некоторым инфекционным агентам, которые позволяют успешно выполнить анализ без длительного подбора компонентов. Пример одновременного выявления антител и двух антигенов (HBsAg и p24 HIV-1) приведен выше.

При диагностике инфекционных заболеваний эта проблема значительно упрощается, так как микробиологические агенты (вирусы, бактерии и др.) поливалентны – т.е. имеют множество одинаковых антигенных детерминант, мозаично распределенных на их поверхности. В таком случае можно использовать разнообразные антитела детекции, в том числе и сходные с иммуноглобулинами захвата. Очевидно, что при использовании одинаковых первичных и вторичных антител, анализ может быть выполнен с отдельными стадиями выделения антигена из образца на антителах захвата и выявления выделенных антигенов антителами детекции.

Другая проблема мультиплексного выявления антигенов связана с ограничениями применения сложного конъюгата. При приготовлении сложного конъюгата необходимо получить отдельные порции коллоидного золота, связанного с определенным реагентом захвата, а затем смешать их. Конъюгаты на основе коллоидного золота специфично работают в ограниченном диапазоне концентраций. При смешивании нескольких конъюгатов в оптимальном для них рабочем разведении общая концентрация золя повышается кратно числу смешиваемых порций и, при превышении определенного порогового значения, возникают проблемы со специфичностью и устойчивостью комбинированного зонда (*Joos and Berger,*

2006). Попытки одновременного связывания частиц золота с несколькими реагентами могут приводить к неравномерной нагрузке золя и связанному с этим снижению чувствительности анализа по тому или иному маркеру. Таким образом, возможности мультиплексирования дот-иммуноанализа антигенов с использованием сложных конъюгатов ограничены.

Проблема мультиплексирования может быть решена применением на втором этапе анализа смеси неконъюгированных антител детекции с последующим выявлением их конъюгатом коллоидного золота с антивидовыми антителами. Схема анализа приведена на рисунке 47.

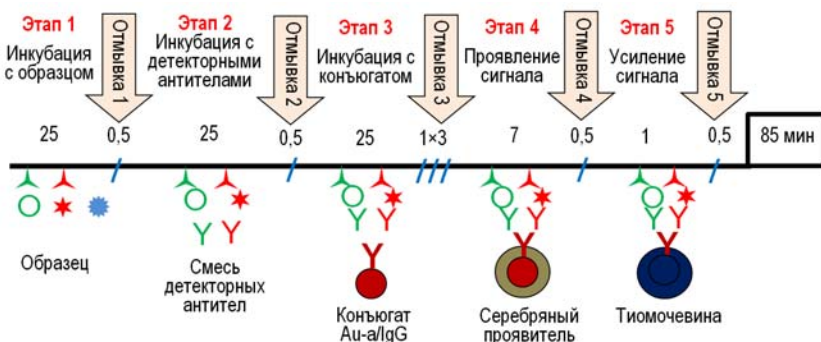


Рис. 47. Схема мультиплексного дот-иммуноанализа для комплексного выявления возбудителей инфекций с применением вторичных антител детекции и конъюгата на основе антивидовых антител.

Такой подход предусматривает дополнительный этап и увеличивает время анализа на 25 мин., однако позволяет одновременно выявлять и дифференцировать до 10 возбудителей. Так для комплексного выявления инфекций, передающихся половым путем (ИППП), на матрицу наносили моноклональные антитела к возбудителям: трихомониаза (*T. vaginalis*), гонореи (*Neisseria gonorrhoeae*), хламидиоза (*Chlamydia trachomatis*), микоплазмоза (*Mycoplasma hominis*), уреаплазмоза (*Ureaplasma urealyticum*) и гарднереллеза (*Gardnerella vaginalis*), а также IgG человека (как контроль работоспособности конъюгата) и асцитическую жидкость мыши, не содержащую специфических антител, (как отрицательных контроль). Схема размещения реагентов захвата на мат-

рице приведена на рисунке 48. В качестве вторичного иммунореагента использовали смесь сывороток человека, содержащих (по данным ИФА) высокие титры антител к выявляемым агентам, а в качестве конъюгата коллоидное золото, связанное с антителами против IgG человека. Результаты сравнительного исследования эффективности выявления спектра патогенов в этих образцах, проведенные с использованием серийно выпускаемых ЗАО «ИмДи» моноспецифических ИФА тест-систем, а также белковых чипов, приведены в табл. 22.

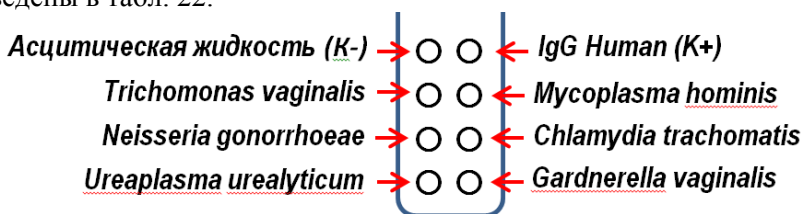


Рис. 48. Схема размещения на белковой матрице зон выявления возбудителей инфекций, передающихся половым путем.

Таблица 24

Сравнительные результаты выявления антигенов возбудителей мочеполовых инфекций в образцах вагинальных смывов наборами для ИФА и мультиплексным дот-иммуноанализом (иммуночип)

Тест-система	ИФА						Иммуночип					
№ образца	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<i>T. vaginalis</i>	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
<i>C. trachomatis</i>	+	+	–	–	+	–	+	+	–	–	+	–
<i>M. hominis</i>	+	–	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–
<i>U. urealyticum</i>	–	–	+	–	+	–	–	–	+	–	+	–
<i>N. gonorrhoeae</i>	–	–	–	+	+	–	–	–	–	+	+	–
<i>G. vaginalis</i>	–	+	+	+	–	–	–	+	+	+	–	–
<i>IgG человека (K+)</i>							+	+	+	+	+	+
<i>Асцитическая жидкость (K-)</i>							–	–	–	–	–	–

Примечание: заливкой выделены ячейки с положительными результатами.

Вид иммуночипов после анализа образцов вагинальных смывов от пациенток с различной урогенитальной патологией продемонстрирован на рисунке 49. Видно, что белковые чипы позволяют уверенно осуществлять визуальный учет результатов, которые полностью совпадают с результатами традиционного ИФА.

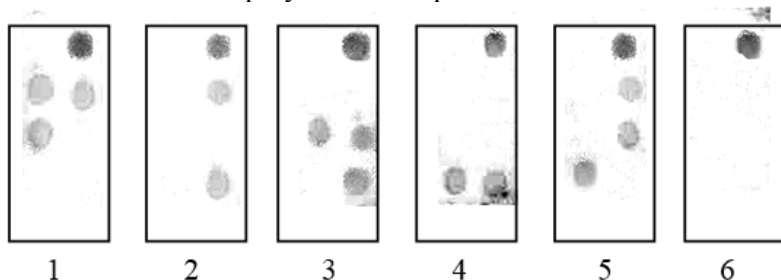


Рис. 49. Вид белковых матриц после выполнения мультиплексного дот-иммуноанализа образцов вагинальных смывов от пациенток с различной урогенитальной патологией.

Мультипараметрический тест для комплексного выявления антител к отдельным антигенам вируса гепатита С (HCV)

(Неопубликованные данные)

Матрица для комплексного выявления антител отдельным антигенам гепатита С включает набор антигенов: химерный антиген, включающий эпитопы структурного (Core) и неструктурных (NS3, NS4 и NS5) белков HCV; структурный антиген Core; неструктурные антигены NS3, NS4 и NS5 (см. рис. 50). При этом химерный антиген обеспечивает получение предварительного (скринингового) результата, а анализ на отдельных антигенах служат подтверждающими тестами (дот-иммуноблоттинг). Схема выполнения анализа типична для мультиплексного анализа антител (см. рис. 38). Набор предназначен для выявления нескольких маркеров одного заболевания, поэтому к нему более применим термин «мультипараметрический» тест, чем «мультиплексный», в котором определяются маркеры ряда заболеваний. Диагностическая роль набора заключается в возможности подтверждения или не подтверждения скрининговых тестов на HCV методом дот-блоттинга путем выявления отдельных маркеров гепатита С.

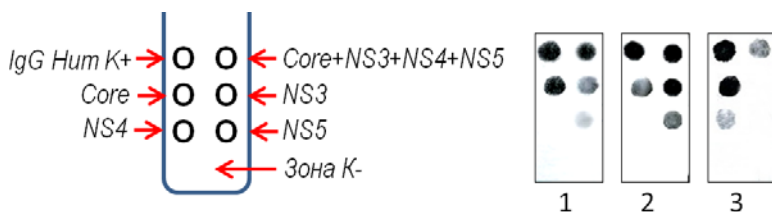


Рис. 50. Схема рабочей части белковой матрицы для HCV подтверждающего теста и примеры результатов мультипараметрического анализа образцов сыворотки крови на отдельные маркеры HCV.

Результат теста на наличие антител класса IgG к вирусу гепатита С считали положительными, если:

- 1) результат анализа на присутствие антител к антигену Core положительный;
- 2) результаты анализа на присутствие антител к любым двум или более NS антигенам положительны;
- 3) при соблюдении вышеперечисленных условий 1 и 2.

Результаты теста на наличие антител IgG к вирусу гепатита С считали отрицательными, если антитела ко всем четырем антигенам не выявляли.

Если исследуемый образец давал положительную реакцию на антитела только к одному из NS антигенов, при отрицательной реакции к антигену Core, то результат считали сомнительным.

Оценку чувствительности и специфичности теста определяли с помощью стандартной панели сывороток, производства ЗАО «Медико-биологический союз» (Бердск). Результаты исследований приведены в таблице 23.

Таблица 25

Оценка чувствительности и специфичности
мультипараметрического теста для комплексного выявления
антител к отдельным антигенам HCV

Панель	Стандартная панель сывороток, содержащих и не содержащих антитела к вирусу гепатита С. ОСО 42-28-310-02п серия 11
Положительных образцов (всего /определено)	16/16
Отрицательных образцов (всего /определено)	8/8
Диагностическая чувствительность	100%
Диагностическая специфичность	100%

При исследовании стандартных образцов не выявлено сомнительных результатов. Таким образом, мультипараметрический тест для комплексного выявления антител к отдельным антигенам вируса гепатита С полностью определяет образцы стандартных и рабочих панелей и обеспечивает диагностическую чувствительность и специфичность не менее 100%.

Выявление спектра антител к структурным и неструктурным белкам вируса гепатита С в ряде случаев позволяет не только подтвердить данные скрининга, но и ориентировочно установить период (разгар и ранняя реконвалесценция) и характера течения (острый и хронический гепатит) заболевания (*Чернобровкина и др., 2005*).

Вероятно, аналогичным образом могут быть изготовлены подтверждающие тесты для выявления антител в ВИЧ, возбудителю сифилиса и других инфекций.

Набор для мультипараметрического выявления маркеров лихорадки денге на всех стадиях заболевания

(Полтавченко и др. 2019с).

Набор является мультипараметрическим поскольку выявляет несколько маркеров одного заболевания – лихорадки денге (ЛД). Диагностическая роль набора заключается в возможности определения инфекции на всех стадиях заболевания за счет одновременного дифференцированного выявления в образцах специфического антигена NS1 и антител классов IgM и IgG.

ЛД является наиболее быстро распространяющимся вирусным заболеванием в мире. Ежегодно регистрируется более 50 млн случаев заражения лихорадкой денге, 2,5 млрд человек живут в эндемичных по денге странах (*Guo et al., 2017*). В резолюции WHA58.3 Всемирной ассамблеи здравоохранения о пересмотре Международных медико-санитарных правил, в которых предусмотрено включение лихорадки денге в перечень заболеваний, способных вызвать чрезвычайные ситуации международного значения с последствиями для безопасности здоровья населения (*Резолюция Всемирной ассамблеи здравоохранения WHA 58.3*).

Источником инфекции служат больной человек, обезьяны и, возможно, летучие мыши, а человеку инфекция передается комарами *Aedes aegypti*. Лихорадка денге распространена в тропических

и субтропических районах и встречается в странах Южной и Юго-Восточной Азии, Океании, Африки и бассейна Карибского моря (*Sergeeva et al.*, 2015).

Для ЛД, как и для многих других инфекционных заболеваний, характерны периоды, в течение которых серологические маркеры заболевания сменяют друг друга. С начала заболевания (с момента появления клинических симптомов) в крови определяется белок NS1 возбудителя, указывающий на размножение патогена в организме. К 10 дню в крови появляются иммуноглобулины класса М (IgM), а уровень NS1 с появлением антител прогрессивно снижается. Уровень IgM достигает максимума примерно через две–три недели после появления симптомов. В течение третьей недели начинают вырабатываться иммуноглобулины класса G (IgG), а уровень IgM снижается до неопределяемого уровня в течение 2–3 мес. Во время вторичного инфицирования антитела класса IgG определяются на высоком уровне даже в острый период болезни, IgM не обнаруживаются или выявляются в низком титре (*Новак и др.*, 2016). В крови переболевших IgG персистируют длительно, иногда пожизненно. Таким образом, если белок NS1 и IgM указывают на острое заболевание, то наличие IgG свидетельствует о поздней стадии заболевания, повторном заражении или о ранее перенесенной инфекции.

Наиболее эффективное дифференциальное выявление специфических IgG и IgM осуществлено по схеме, при которой захват IgG производился на суммарном антигене вируса денге с детекцией с помощью меченных антител а/IgG человека, а выявление IgM осуществлялось захватом на антителах а/IgM человека с детекцией меченным суммарным вирусным антигеном. Выявление белка NS1 вируса денге выполнено с использованием подобранной пары моноклональных антител, одно из которых иммобилизовано на подложке, а другое связано с золем золота. Схема нанесения реагентов захвата на матрицу и возможные результаты анализа представлены на рисунке 51.

В наборе используется сложный конъюгат, включающий порции коллоидного золота, связанного: с моноклональными антителами против IgG человека, с моноклональными антителами против белка NS1 вируса денге и со смесью антигенов вируса денге типов 1–4.

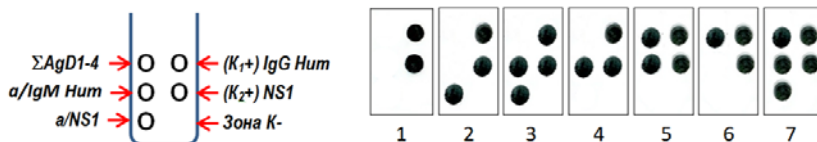


Рис. 51. Схема нанесения реагентов захвата для выявления маркеров лихорадки на подложку белковой матрицы (слева): К– – зона контроля фоновых явлений (без реагентов захвата); K_1+ – зона контроля работоспособности антивидовых детекторных антител (IgG человека); K_2+ – зона контроля работоспособности детекторных антител к раннему белку NS1 вируса Денге (NS1); $\Sigma AgD1-4$ – зона теста на антитела класса IgG против вируса денге (смесь видовых антигенов вируса Денге I-IV типов); $a/IgM\ Hum$ – зона теста на антитела к классу IgM против вируса денге (моноклональные антитела против IgM человека); T3 – зона теста на ранний белок NS1 вируса денге (моноклональные антитела против белка NS1 вируса денге); и возможные варианты результатов анализа (справа): 1 – отрицательный, 2 – положительный по NS1, 3 – положительный по NS1 и IgM, 4 – положительный по IgM, 5 – положительный по IgM и IgG, 6 – положительный по IgG, 7 – положительный по всем маркерам ЛД (приведено из Полтавченко и др., 2019с).

Оптимальные концентрации и соотношение порций в конъюгате подобраны эмпирически. Сравнительные испытания набора на панели клинических образцов показали хорошее совпадение результатов с данными, полученными с использованием импортных коммерческих тестов (Полтавченко и др., 2019с). Разработанный набор может найти применение для скрининга клинических образцов, как в стационарных лабораториях, так и в полевых условиях, непосредственно у постели больного.

Набор для ускоренного выявления ортопоксвирусов

Этот набор не является ни мультиплексным, ни мультипараметрическим, поскольку предназначен для выявления одного маркера – родоспецифических антигенов ортопоксвирусов (ОПВ). В настоящей работе описание этого набора приведено, во-первых, потому, что он изготовлен на базе оснастки мультиплексного теста (описанные выше белковые матрицы и аналитические ванны). Во-вторых – потому, что при его разработке выявлены два нетипичных

для сэндвич-анализа феномена: (1) возможность определения вируса с использованием одинаковых реагентов захвата и детекции при одновременной (одностадийной) инкубации матрицы с образцом и конъюгатом; (2) увеличение чувствительности выявления вируса при одностадийном анализе, по сравнению с выполнением теста с раздельной (двухстадийной) последовательной инкубации матрицы в образце и конъюгате.

Род *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* объединяет крупные и сложные ДНК-содержащие вирусы, способные инфицировать людей и вызывать у них тяжелые контагиозные заболевания (*Shchelkunov et al., 2005*). Несмотря на успешную ликвидацию натуральной оспы, возможность применения вируса натуральной оспы (ВНО) в террористических или военных целях (*Whitley, 2003*), а также зоонозные инфекции вызываемые вирусом оспы обезьян (ВОО), вирусом оспы коров (ВОК) и вирусом осповакцины (ВОВ), остаются угрозой для с каждым годом возрастающего числа невакцинированных лиц (*Shchelkunov, 2013*). Раннее выявление заболеваний, вызываемых ОПВ, важно для оперативного принятия обоснованных решений относительно изоляции и лечения пациентов, а также определения эпидемиологии заболевания и осуществления мер по его контролю (*Townsend, 2013*).

Диагноз ОПВ инфекции не может быть поставлен только по клиническим признакам, поскольку сходные симптомы характерны и для ряда других заболеваний. Дифференциальная диагностика может быть проведена лабораторными методами с применением: электронной микроскопии (выявление вирусных частиц), полимеразной цепной реакции (выявление вирусной ДНК) или иммунохимических тестов (выявление вирусных белков). Электронная микроскопия может быть выполнена быстро, но чувствительность ее не велика. Анализы ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР) позволяют в течение нескольких часов выявлять сотни и даже десятки (*Максютов, 2016*) копий вирусной ДНК и дифференцировать виды ОПВ, однако такой анализ может выполняться в строго контролируемых лабораторных условиях и может быть неэффективен в отношении генетически измененных штаммов. Иммунохимические методы менее чувствительны, чем ПЦР. Так лабораторный иммуноферментный анализ (ИФА) с парой тщательно подобранных моноклональных антител позволяет обнаруживать ОПВ при вирусной

нагрузке выше 1×10^3 БОЕ/мл (*Stern et.al., 2016a*). С другой стороны, иммунохимические тесты менее прихотливы к условиям анализа и могут выполняться существенно быстрее ПЦР. Так, известен коммерчески доступный иммунохроматографический (lateral flow immunoassay) тест Orthopox BioThreat® Alert, допускающий выявление ОПВ в концентрациях 10^6 – 10^7 БОЕ/мл в течение 20–25 мин. (*Townsend et al., 2013*). Другим примером может служить иммуно-филтрационная система ABICAP (Antibody Immuno Column for Analytical Processes), позволяющая в течение 45 мин. достоверное выявление ОПВ при их содержании в образце, превышающем 10^4 БОЕ/мл (*Stern et.al., 2016b*). Оба теста могут выполняться во внелабораторных условиях, однако уступают в чувствительности ИФА.

Диагностическая роль созданного нами набора заключается в возможности выявления патогенных ортопоксвирусов (натуральной оспы, оспы обезьян, коров и др.) в клиническом материале и пробах окружающей среды при завозных случаях инфекции или применения возбудителей в террористических или военных целях. Схема ускоренной постановки анализа приведена на рисунке 52.

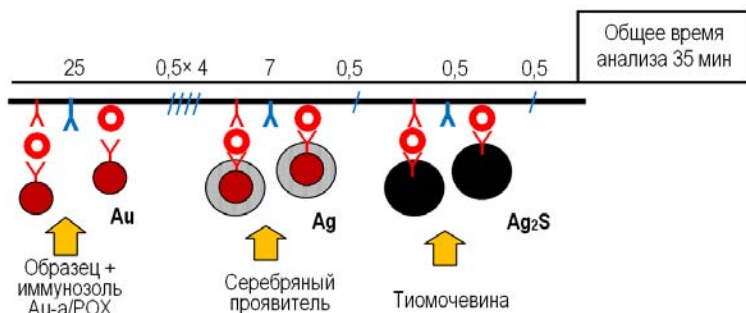


Рис. 52. Схема ускоренного теста для выявления ортопоксвирусов. Y – антитела a/POX, ● – вирус.

Сокращение времени выполнения анализа достигается за счет совмещения стадий инкубации белковых матриц в образце и конъюгате и сокращения числа отмывок. Увеличение чувствительности, вероятно, происходит за счёт формирования на субвирусных структурах крупных агрегатов сенсibilизированных частиц золота (см. рис. 53) и одновременного связывания их с антителами захвата на подложке.

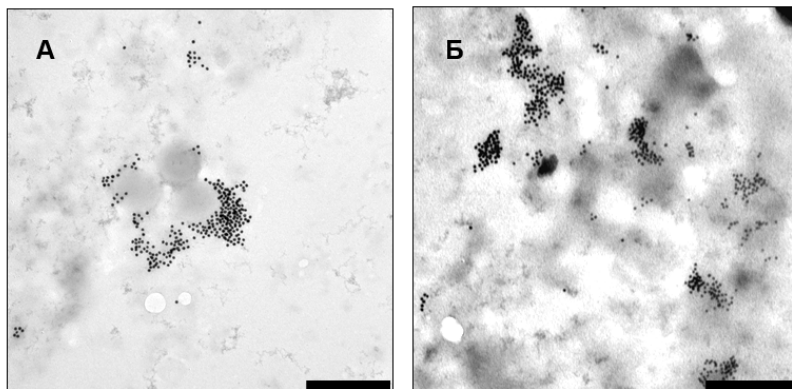


Рис. 53. Электронно-микроскопические снимки: очищенного (А) и неочищенного (Б) вирусов осповакцины с иммунозолем Au-a/POX. Темная полоса в нижней правой части снимков соответствует 500 нм.

В отличие от рутинного сэндвич-анализа, использующего пары моноклональных антител против разных антигенных детерминант ОПВ, в ускоренном методе применены кроличьи поликлональные антитела против вируса осповакцины (ВОВ). Эти антитела используются и в качестве иммобилизованного на подложке реагента захвата, и в качестве связанных с частицами коллоидного золота антител детекции. Размещение реагентов захвата на матрице и примеры выявления разных концентраций культурального препарата вируса осповакцины показаны на рисунке 54.

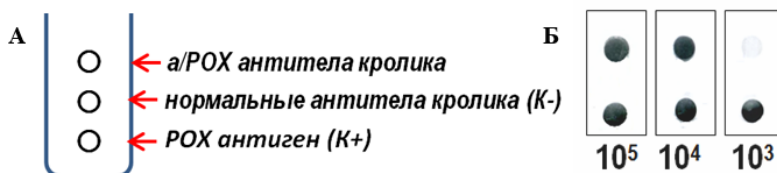


Рис. 54. Схема размещения иммунореагентов захвата на подложке белковой матрицы (А) и вид матриц после выполнения ускоренного анализа суспензий вируса осповакцины (Б). Цифрами под матрицами обозначен инфекционный титр вирусного материала в БОЕ/мл.

Результаты сравнения рутинного (схема постановки рутинного анализа аналогична схеме, приведенной на рис. 38) и ускоренного вариантов дот-анализа ОПВ приведены в таблице 24. Предел обнаружения вирусов рассчитывали, как результат умножения исходного титра образца вируса на максимальное разведение, при котором контрольная точка четко определялась визуально.

Видно, что лимит определения ОПВ имеет обратную зависимость от степени очистки препаратов от субвирусных структур; а одностадийный вариант дот-иммуноанализа, наряду с сокращением времени анализа, позволяет, как минимум, в два раза увеличить чувствительность выявления ОПВ в неочищенных вирусных препаратах. Такой прирост чувствительности может быть объяснен образованием крупных агрегатов частиц иммунозоля на поверхности субвирусных структур, значительно усиливающих оптический сигнал при проявлении результатов анализа (*Полтавченко и др., 2019d*).

Оба варианта постановки анализа специфичны и не обнаруживают взаимодействий с препаратами незараженной клеточной культуры, обработанной в соответствии с протоколами подготовки вирусных образцов 1–3, и с гетерогенными контролями возбудителей экзантематозных инфекций (корь, краснуха, ветряная оспа).

С учетом возможных погрешностей в титровании вируса и постановке дот-анализа чувствительность ускоренного варианта выявления ортопоксвирусов в неочищенных препаратах ОПВ можно обозначить диапазоном 10^3 – 10^4 БОЕ/мл (*Poltavchenko et al., 2020*). С такой же чувствительностью ускоренный дот-анализ позволяет выявлять ОПВ в гомогенатах тканей из органов инфицированных животных (*Полтавченко и др., 2021*). Достигнутая чувствительность сходна с лимитом обнаружения в ИФА с использованием тщательно подобранных пар моноклональных антител (*Stern et al., 2016a*), но превышает чувствительность известных систем для внелабораторной («point of care») детекции ОПВ (*Townsend et al., 2013; Stern et al., 2016b*).

Таблица 26

Чувствительность выявления препаратов ортопоксвирусов в разных вариантах условий постановки
дот-иммуноанализа (*приведено из Poltavchenko et al., 2020*)

Образец (штамм)	Тип образца	Исходн. титр, БОЕ/мл	Лимит определения в дот-анализе			
			Рутинный анализ		Ускоренный анализ	
			Развед.	Титр, БОЕ/мл	Развед.	Титр, БОЕ/мл
Вирус оспы обезьян, штамм V79-1-005	1	$4,0 \times 10^9$	Н.о.	Н.о.	1/1600	$2,5 \times 10^3$
Вирус осповакцины, штамм ЛИВП	1	$1,1 \times 10^7$	1/1600	$7,2 \times 10^3$	1/3200	$3,6 \times 10^3$
	2	$3,6 \times 10^7$	1/1600	$2,2 \times 10^4$	1/3200	$1,1 \times 10^4$
	3	$8,5 \times 10^6$	1/3200	$2,6 \times 10^3$	1/12800	$6,6 \times 10^2$
	4	$3,0 \times 10^8$	1/800	$6,2 \times 10^5$	1/1600	$1,9 \times 10^5$
Вирус экстримиелии, штамм К-1	1	$2,3 \times 10^6$	1/200	$1,1 \times 10^4$	1/800	$2,8 \times 10^3$
	2	$1,9 \times 10^7$	1/100	$1,9 \times 10^5$	1/400	$4,8 \times 10^4$
	3	$8,5 \times 10^6$	1/100	$8,4 \times 10^4$	1/400	$2,1 \times 10^4$
	4	$2,2 \times 10^8$	1/400	$5,5 \times 10^5$	1/800	$2,8 \times 10^5$
Вирус оспы коров, штамм GRI-90	1	$9,8 \times 10^6$	1/200	$4,8 \times 10^4$	1/800	$1,2 \times 10^4$
	2	$3,0 \times 10^7$	1/200	$1,5 \times 10^5$	1/800	$3,8 \times 10^4$
	3	$1,3 \times 10^7$	1/200	$6,4 \times 10^4$	1/800	$1,6 \times 10^4$
	4	$4,0 \times 10^8$	1/800	$5,0 \times 10^5$	1/1600	$2,5 \times 10^5$
Вирус оспы кроликов, штамм Утрехт	1	$1,0 \times 10^6$	1/800	$1,2 \times 10^3$	1/1600	$6,2 \times 10^2$
Контроль клеточной культуры*	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
Гетерогенный контроль**	Ветр. оспа	0	0	0	0	0
	Корь	0	0	0	0	0
	Краснуха	0	0	0	0	0

Типы образцов:

1 – криолизат инфицированных клеток (два цикла замораживания-оттаивания);

2 – образец 1, обработанный ультразвуком (2 раза по 10 с при 20 кГц);

3 – супернатант после центрифугирования образца 2 (5000 об/мин., 15 мин., 4°C);

4 – очищенный вирус – нижняя фракция после центрифугирования образца 3 с сахарозной подушкой (14000 об/мин., 2 ч, 4°C).

* Для контроля использованы неинфицированные клетки, обработанные как образцы 1–3.

** В качестве гетерогенные контролей использованы антигены возбудителей экзантематозных инфекций.

Н.о. – не определяли.

Существенным преимуществом теста является то, что он изготовлен с использованием одного вида поликлональных антител и в качестве реагента захвата, и в качестве реагента детекции, что значительно упрощает и снижает стоимость производства диагностической системы (*Czerny et al., 1989*). Хотя в настоящем исследовании были протестированы только несколько штаммов ОПВ, известно, что они обладают широкой перекрестной антигенной реактивностью (*Gilchuk et al., 2016*), и результаты должны быть сходными для всех ОПВ, в том числе и для вируса натуральной оспы. Результаты теста считываются визуально без необходимости дополнительного оборудования и просты для интерпретации, что важно при выполнении анализов в соответствии с протоколами биоконтроля BSL 3 или BSL 4. Этот способ анализа применим во внелабораторных условиях и может быть полезен при обнаружении вирусной угрозы в различных приложениях биологической защиты.

Заключение

Одним из наиболее быстрых и надежных способов диагностики инфекционных заболеваний является серологическое обследование пациентов с целью выявления маркеров отдельных инфекций – белков (антигенов) возбудителей заболевания или антител против них, вырабатываемых организмом в ответ на инфицирование. Часто при серологическом обследовании возникает необходимость выявления нескольких маркеров. Такая потребность возникает при смешанных инфекциях, когда организм поражается сразу несколькими возбудителями, а также при дифференциации заболеваний, имеющих сходную клиническую картину. Кроме того, ряд федеральных программ борьбы с отдельными группами инфекционных заболеваний включает в себя обследование широких контингентов населения на наличие определенных наборов маркеров инфекций. Определение нескольких маркеров необходимо также при дифференциации паразитозных инвазий, определении этиологических факторов аллергических состояний и в других ситуациях.

В настоящее время серологическое обследование обычно проводится с помощью моноспецифичных (предназначенных для выявления 1–2 маркеров одной инфекции) тест-систем для иммуноферментного анализа (ИФА). Таким образом, комплексное обследование предполагает выполнение нескольких иммунологических тестов и представляет собой длительную и дорогостоящую процедуру. Кроме того, не все медицинские учреждения располагают условиями для реализации ИФА, поэтому такие анализы выполняются в основном в диагностических лабораториях при крупных медицинских учреждениях, а оперативная доставка образцов в такие лаборатории из отдалённых населённых пунктов часто является трудной задачей. Существует проблема диагностики инфекций на местах, в частности, при оказании экстренной хирургической и акушерской помощи, когда врачу необходимо выявить инфекционную угрозу персоналу и окружению, но на лабораторный анализ нет времени. Для таких случаев могут быть особо востребованы недорогие и простые в исполнении мультиплексные тест-системы, позволяющие оперативно проводить комплексное серологическое обследование пациентов, в том числе и в условиях слабо оснащенных медицинских пунктов. Такой подход позволит сделать обследование более доступным, массовым, своевременным и эффективным.

Мультиплексная иммунодиагностика – новое направление, предполагающее использование так называемых «белковых матриц» или «иммуночипов», позволяющих одновременно определять в исследуемом образце множество различных аналитов. Мультиплексные анализы требуют меньше времени, реагентов и объема образца, они более информативны и экономически эффективны, по сравнению с моноспецифичными тестами. Несмотря на очевидные преимущества, иммуночипы не смогли пока радикально изменить диагностику, поскольку технические и эксплуатационные проблемы, препятствуют их реализации в клинических условиях. Большинство проблем при разработке белковых чипов обусловлены чрезвычайным разнообразием в биохимических свойствах, структуре и аффинности белков и на решение этих проблем направлены значительные усилия ученых. Попытки создания таких систем включали: суспензионные иммуночипы на наборах микрошариков с детекцией по принципу проточной цитометрии; микрожидкостные устройства; одновременное выявление маркеров в иммунохроматографических системах с боковым потоком; многомодульные иммуно-фильтрационные системы с использованием в отдельных модулях разных систем детекции; микроматрицы, напечатанные на поверхности дна ячеек микротитровального планшета; иммуночипы на плоских слайдах; а также 2D белковые матрицы, в которых реагенты захвата нанесены в каплях гидрогеля. Однако применение большинства из перечисленных тестов в клинической диагностике остается проблематичным из-за сложности процессов, значительных затрат и необходимости применения сложных технических устройств.

Нами создана технология изготовления автономных наборов для мультиплексного анализа, сочетающая достоинства мультиплексного анализа с простотой изготовления и применения иммуночипов. Технология основана на применении плоских белковых матриц с низкой плотностью нанесения реагентов захвата, конъюгатов на основе коллоидного золота, системы усиления и стабилизации оптического сигнала, визуального или инструментального учета результатов. Основными элементами набора являются белковые матрицы (иммуночипы) и аналитические ванны.

Матрицы изготовлены из синтетической бумаги блоками в виде гребня с 5 зубцами, каждый из которых является иммуночипом. На него дискретно пятнами по 2 мм в диаметре нанесены реагенты захвата и контроля работоспособности системы (размеры иммуночипа позволяют выявлять до 10 различных маркеров). Аналитические ванны изготовлены литьем из полипропилена и содержат 5 модулей по 12 ячеек в каждом. Ячейки заполнены готовыми рабочими растворами и герметизированы фольгой. Размеры гребенки и ванны сопоставимы, что позволяет одновременно исследовать 5 образцов, или, отрезав один зубец, проводить индивидуальное исследование.

Способ применения набора прост и не требует особой квалификации персонала. Методология представляет собой дот-иммуноанализ с применением конъюгатов на основе коллоидного золота и каталитическим усилением оптического сигнала. Процедура выполнения анализа заключается в переносе иммуночипа с определенными временными интервалами по рядам ячеек аналитической ванны. Анализ выполняется при температуре выше 20°C.

Учет результатов анализа осуществляется визуально по наличию темных пятен в местах нанесения определенных антигенов. Полуколичественный учет может выполняться инструментально путем обработки оцифрованного сканером изображения матрицы специально разработанной компьютерной программой. Набор полностью укомплектован, не требует энергообеспечения и может использоваться повсеместно.

Мультиплексные наборы имеют ряд конкурентоспособных преимуществ:

- выявление необходимого набора (до 10) маркеров в одном анализе;
- чувствительность и специфичность на уровне ИФА;
- простота процедуры анализа, не требующая высокой квалификации оператора;
- оперативность выполнения комплексного анализа при комнатной температуре;
- возможность как визуального, так и полуколичественного инструментального учета результатов;
- наличие встроенных контролей;
- автономность – полная комплектация набора и выполнение анализа без дополнительного оборудования и энергопотребления;

- возможность выполнения как индивидуальных, так и групповых анализов;
- невысокая стоимость комплексного анализа, сравнимая со стоимостью выявления 1 маркера в ИФА тест-системах;
- гибкость формата иммуночипа, позволяющая легко изменять номенклатуру выявляемых маркеров;
- в процессе производства и потребления продукции не употребляются и не образуются продукты вредные для персонала и окружающей среды.

Одновременное выявление всего необходимого спектра маркеров ГТИ является основным преимуществом набора, обуславливающим оперативность и информативность комплексного анализа.

Высокая чувствительность анализа достигается за счет применения системы детекции на основе золей золота с каталитическим усилением сигнала, позволяющей выявлять маркеры инфекций в пикограммовом диапазоне и формирующей при этом визуально различимые оптические сигналы, пропорциональные содержанию маркера в образце. Такая детекторная система обладает примерно в 30 раз большей чувствительностью и в 4 раза меньшей стоимостью, чем система на основе щелочной фосфатазы, обычно применяющаяся в автономных наборах.

Каждый иммуночип имеет встроенные контроли работоспособности конъюгата (конъюгатов) и проявляющей системы (K⁺), а также фоновых явлений при выполнении анализа (K⁻).

Автономность и простота выполнения обусловлена применением рациональной схемы анализа, не требующей термостатирования, и оригинальной конструкцией элементов набора, позволяющей выполнять индивидуальные или групповые анализы путем механического перемещения иммуночипов по рядам ячеек аналитической ванны.

Низкая стоимость анализа достигается за счет малого (в 50 раз меньше, чем в ИФА-системах) удельного расхода иммунореагентов захвата, применением недорогих материалов для изготовления элементов оснастки, конъюгатов и рабочих растворов набора, а также применением для производства набора разработанных нами уникальных относительно недорогих, но эффективных автоматических устройств. Себестоимость набора по материальным затратам в зависимости от числа маркеров составляет около

400–600 руб. (20–30 руб./комплексный анализ или около 5 руб. за анализ 1 маркера).

Гибкость формата иммуночипа обусловлена возможностью замены отдельных реагентов захвата без принципиальных изменений способов изготовления и применения набора, необходим только подбор эффективных и совместимых реагентов захвата.

Новизна и приоритетность подходов, использованных при создании наборов, зафиксирована в ряде патентов РФ.

В то же время, для широкомасштабной интеграции мультиплексных иммуноанализов в клинических условиях необходимо найти оптимальное решение ряда проблем.

Одна из них – развитие и стандартизация технологии получения и выделения специфичных белковых лигандов, обладающих высокой аффинностью и низкой перекрестной реактивностью. Некоторые белки, потенциально пригодные для использования на иммуночипах, выпускаются рядом биотехнологических компаний в виде библиотек модифицированных продуктов. При этом каждый продукт имеет значительную стоимость, что превращает подбор оптимального варианта в финансово непосильную задачу. Следует отметить, что даже разные партии одного и того же продукта могут значительно отличаться по своим характеристикам. Ряд исследователей считают, что эта проблема может быть решена только тогда, когда станут доступными химически синтезированные лиганды.

Другая проблема – разработка надежного метода иммобилизации реагентов захвата в массиве. Для этого необходима разработка стандартизованных специализированных материалов подложки, позволяющих эффективно связывать белки без нарушения их функциональной активности.

Чтобы иметь коммерческую ценность, требуется одобрение регулирующих органов для параллельных анализов. Эти тесты должны проходить всевозможные виды процедур контроля качества. Требуемые нормативные процедуры составляют значительную часть бюджета разработки даже новой моноспецифической диагностической системы. Для мультиплексных же систем число проверочных анализов, исследуемых образцов, референс-тестов и, соответственно, финансовых расходов возрастает кратно степени мультиплексирования. Таким образом, нужна разработка рациональной схемы сертификации мультиплексных тестов.

Клиническое применение мультиплексных тестов требует и правового урегулирования. Например, если клиент не хочет, чтобы на чипе был результат одного конкретного теста, означает ли это, что он может платить меньше? Если производитель просто вычеркивает результат, который не нужен клиенту, и этот тест указывает на тяжелое заболевание пациента, несет ли производитель или медицинское учреждение ответственность? Эти гипотетические примеры показывают, что есть много вопросов, которые еще предстоит решить, прежде чем иммуночипы смогут проникнуть на рынок диагностики.

Улучшение во всех аспектах производства и применения технологии иммуночипов может сделать их данные более надежными. Медицинские потребности в сочетании с общим снижением затрат должны стать движущей силой, чтобы белковые матрицы заняли значительную долю рынка IVD и оправдали возложенные на них ожидания.

Список литературы

1. *Авсеенко Н.В., Морозова Т.Ю., Атауллаханов Ф.И. Морозов В.Н.* Иммобилизация белков в иммунохимических микроципах, полученных методом электрораспыления // Аналитическая химия, 2001, 73 (24): 6047–6052.
2. Антитела. Методы / под ред. Д. Кэтти. – В 2 т. – М.: Мир, 1991. – 287 с.
3. *Бангхем Д.* Стандартные препараты и эффекты матрикса // Новые методы иммуноанализа / под ред. У.П. Коллинз. – М.: Мир, 1991. – С. 25–37.
4. *Бессмельцев В.П., Горяев Е. П., Ралдугин А.Н. и др.* Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Устройство для автоматического заполнения аналитических ванн // Биотехнология. – 2014. – №4. – С. 88–96.
5. *Бойко А.В., Кузнецов О.С., Киреев М.Н. и др.* Количественная оценка результатов дот-иммуноанализа // Биотехнология. – 2015. – №2. – С. 91–96.
6. *Бохински Р.* Современные воззрения в биохимии. – М.: Мир, 1987. – 544 с.
7. *Быков В.А., Денисов-Никольский Ю.И., Ребров Л.Б.* Использование биотест-систем в обеспечении биобезопасности // Вестн. РАМН. – 2002. – №10. – С. 42–45.
8. Быстрые и простые методы определения вирусных инфекций в лабораторной службе России. Методические рекомендации. – М., 2004 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.biograd.ru/publications/methodical_recommendations/hiv/contents
9. *Бычковский П.М., Кладиев А.А., Соломевич С.О., Щеголев С.Ю.* Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – 10 (3). – С. 37–46.
10. *Венгеров Ю.Ю., Булгарина Т.В., Куц А.А. и др.* Современные методы иммуноанализа (иммуноферментного) для диагностики вирусных инфекций // Биотехнология. – 1987. – №3. – С. 291–295.
11. ВОЗ. Доклад № 784. Применение синтетических антигенов для диагностики инфекционных болезней. – Женева: ВОЗ, 1991.
12. ВОЗ. 10 ведущих причин смерти в мире [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (дата обращения 07.02.2022).

13. *Воробьев А.А.* Проблемы биологической безопасности на современном этапе // Вестн. РАМН. – 2002. – №10. – С. 9–12.
14. ГОСТ Р 51352-99 «Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний».
15. Государственный доклад: О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 256 с.
16. *Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Кочнева Г.В. и др.* Клонирование и экспрессия в *E.coli* основных антигенов *Treponema pallidum* и исследование их иммунохимических свойств // Иммунология. – 1998. – №4. – С. 17–20.
17. *Джеймс Т.Х.* Теория фотографического процесса. – Л.: Химия, 1980. – 672 с.
18. *Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е.* Современные методы лабораторной диагностики сифилиса. Часть II // Вестн. дерматол. венерол. – 1996. – №3. – С. 33–38.
19. *Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г.* Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. – М.: Наука, 2008.
20. *Дюкова В.И.* Количественный анализ анатоксинов на гидрогелевых биологических микрочипах: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Инст. мол. биол. РАН. – М., 2006.
21. *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высш. шк., 1991. – 275 с.
22. *Ерш А.М.* Разработка диагностического набора для выявления антител к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита методом мультиплексного дот-анализа: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. – Кольцово, 2015.
23. *Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Пьянков С.А. и др.* Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям // *Вопр. вирусол.* – 2015. – 60 (1). – С. 45–49.
24. *Киселев А.В.* Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. – М.: Высшая школа, 1986. – 360 с.

25. *Колкот К., Барнстон Р., Хилл К. и др.* Получение и очистка моноклональных антител // Новые методы иммуноанализа / под ред. У.П. Коллинз. – М.: Мир, 1991. – С. 37–52.

26. Контроль качества клинических диагностических лабораторных исследований: Принципы и методы. – М.: Медицина, 1994. – 154 с.

27. *Кохен Ф., Амир-Зальцман Ю., Страсбургер С. и др.* Авидин-биотиновая реакция в иммуноанализе // Новые методы иммуноанализа / под ред. У.П. Коллинз. – М.: Мир, 1991. – С. 65–77.

28. *Максютов Р.А.* Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров // Проблемы ООИ. – 2016. – Вып. 4. – С. 60–63.

29. *Мей К.* Анализ на дому // Новые методы иммуноанализа / под ред. У.П. Коллинз. – М.: Мир, 1991. – С. 90–102.

30. *Мельниченко П.И., Шумилов В.И., Карниз А.Ф.* Совершенствование индикации возбудителей опасных инфекционных болезней в условиях локальных войн и вооруженных конфликтов // ЖМЭИ. – 2000. – №2. – С. 3–6.

31. *Мирзабеков А.Д.* Биочипы в биологии и медицине 20-го века. Выступление на научной сессии общего собрания РАН // Вестник РАН. – 2003. – №5. – С. 412–415.

32. *Новак К.Е., Эсауленко Е.В., Федуняк И.П., Дьячков А.Г.* Анализ завозных случаев лихорадки денге в Санкт-Петербурге // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2016. – 21 (5). – DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-5-262-267.

33. Новые методы иммуноанализа / под ред. W.P. Collins. – М.: Мир, 1991. – 280 с.

34. *Одиторе-Харгивз К., Харгивз В.* Анализ в кабинете врача и на дому // Новые методы иммуноанализа / под ред. У.П. Коллинз. – М.: Мир, 1991. – С. 78–90.

35. *Осипов А.П., Самсонова Ж.В., Кондаков С.Э.* Наночастицы металлов как новый класс меток в быстрых методах иммуноанализа // Вестн. моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2015. – Т. 56 (3). – С. 164–174.

36. *Панас М.Г.* Точечный твердофазный иммуноферментный анализ // Новые методы иммуноанализа / под ред. У.П. Коллинз. – М.: Мир, 1991. – С. 117–137.

37. *Парфит Г., Рочестер К.* Адсорбция из растворов на поверхностях твердых тел. – М.: Мир, 1986. – 488 с.

38. Патент РФ № 2298795. Набор для многопрофильного анализа сыворотки крови с целью одновременного выявления специфических антител к возбудителям TORCH-инфекций методом дот-иммуноанализа. – Приоритет от 29.03.04.

39. Патент РФ № 2296995. Способ многопрофильного иммунохимического выявления антигенов в жидких образцах. – Приоритет от 20.06.03.

40. Патент РФ № 2495434. Набор для многопрофильного иммунологического анализа антител в препаратах крови. – приоритет от 09.12.2011.

41. Патент РФ № 2517035. Аналитическая ванна для проведения мультиплексного дот-иммуноанализа». – Приоритет от 13.02.2013.

42. Патент РФ на полезную модель №155402. Аналитическая ванна для проведения мультиплексного дот-иммуноанализа. – Приоритет от 13.04.2015.

43. Патент РФ на полезную модель №184859. Универсальная аналитическая ванна для выполнения мультиплексного иммуноанализа». – Приоритет от 29.05.2018.

44. Патент РФ №2686490. Набор для мультиплексного иммунологического анализа антигенов и антител в препаратах крови. – Приоритет от 01.06.2018.

45. Патент РФ №2712149. Набор для дифференцированного выявления в сыворотке крови маркеров на всех стадиях инфекционного заболевания методом мультипараметрического дот-иммуноанализа. – Приоритет от 27.03.2019.

46. Патент РФ №2729635. Набор для быстрого выявления антигенов возбудителей инфекционных заболеваний в формате дот-анализа «у постели больного». – Приоритет от 27.05.2019.

47. *Полтавченко А.Г., Агафонов А.П., Ничеухина С. и др.* Использование иммуносуспension на основе углеродных маркеров для определения антител к вирусу паротита методом поверхностного дот-иммуноанализа // Биотехнология. – 1999. – №3. – С. 86–91.

48. *Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А.* Многопрофильная иммунохимическая индикация возбудителей инфекционных заболеваний // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006а. – №5. – С. 39–42.

49. 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. – 2006b. – №5. – С. 77–87.

50. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 2. Имобилизация антигенов на подложке белкового чипа // Биотехнология. – 2007а. – №1. – С. 86–94.

51. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А., Карпышев Н.Н. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 3. Визуализация результатов анализа // Биотехнология, 2007b. – №2. – С. 63–71.

52. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 4. Лабораторные испытания многопрофильного теста // Биотехнология. – 2007с. – №3. – С. 88–94.

53. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М., Кривенчук Н.А., Рыбаков А.Н. Разработка панели с нормированным содержанием IgG к *Treponema pallidum* // Вестн. дерматологии и венерологии. – 2007d. – №3. – С. 5–13.

54. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Пьянков С.А. и др. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Инструментальный учет результатов анализа// Биотехнология. – 2013. – №4. – С. 74–82.

55. Полтавченко А.Г., Зайцев Б.Н., Ерш А.В. и др. Выбор материала подложки белковых матриц // Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2016а. – 52 (2). – С. 1–7. – DOI: 10.7868/S0044185616020236.

56. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Крупницкая Ю.А. Выбор системы детекции для мультиплексного дот-иммуноанализа антител // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016b. – №4. – С. 229–233. – DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-229-233.

57. Полтавченко А.Г., Нечитайло О.В., Филатов П.В., Ерш А.В. Автономный набор для мультиплексного выявления антител к возбудителям инфекционных заболеваний // Биотехнология. – 2018. – 34 (5). – С. 57–66. – DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-57-66.

58. Полтавченко А.Г., Нечитайло О.В., Филатов П.В., Ерш А.В. Оценка метода мультиплексного выявления антител к возбудителям

инфекционных заболеваний // *Инфекция и иммунитет*. – 2019а. – 9 (1). – С. 209–215. – DOI: 10.15789/2220-7619-2019-1-209-215.

59. Полтавченко А.Г., Ериш А.В., Азаев М.Ш., Филатов П.В. Оптимизация условий проявления результатов дот-иммуноанализа в автономном наборе для выявления ортопоксвирусов // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2019b. – 24 (2). – С. 77–83. – DOI: 10.18821/1560-9529-2019-24-2-77-83.

60. Полтавченко А.Г., Терновой В.А., Ериш А.В. и др. Выявление маркеров лихорадки денге методом ДОТ-иммуноанализа // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2019с. – №3. – С. 81–86. – DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-81-86.

61. Полтавченко А.Г., Ериш А.В., Таранов О.С. и др. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) // *Вопр. вирусол.* – 2019d. – Т. 64. №6. – С. 291–297. – DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297.

62. Полтавченко А.Г., Ериш А.В., Филатов П.В. и др. Быстрая детекция ортопоксвирусов в полевых условиях // *Проблемы ООИ*. – 2021.

63. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ №23 от 12.04.2010 «О реализации Программы ликвидации кори в Российской Федерации к 2010 году в рамках стратегического плана Европейского региона ВОЗ 2005–2010 [Electronic resource]. – Access mode: <http://base.garant.ru/12178062>.

64. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ № 108 от 28 июля 2011 г. «Об утверждении СП 3.1.2952-11 «Профилактика кори, краснухи и эпидемического паротита» [Electronic resource]. – Access mode: <http://bazazakonov.ru/doc/?ID=2866674>

65. Расмунсен С.Е. Носители и реактивы // *Новые методы иммуноанализа* / под ред. У.П. Коллинз. – М.: Мир, 1991. – С. 52–64.

66. Резолюция Всемирной ассамблеи здравоохранения WHA 58.3. Пересмотр Международных медико-санитарных правил [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://apps.who.int/gb/archive/e_wha58.html (дата обращения 13.09.2019).

67. Сандахчиев Л.С., Мартынюк Р.А., Немесов С.В. Исследовательские приоритеты и будущие программы исследований // *Материалы 11 сессии общего собрания РАМН «Медицинские проблемы*

биобезопасности» (3–6 апреля 2002 г., Москва) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bio.su/sar.htm>

68. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016617045 «Программа для инструментального учета результатов мультиплексного дот-иммуноанализа АРМ «Лаборант-15». – Дата регистрации 23.06.2016.

69. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020610604. Программа для инструментального учета результатов дот-иммуноанализа «DOTREADER 2000». – Дата регистрации 04.02.2020.

70. Скоупс Р.К. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – 358 с.

71. Соболенко Р. Принципы струйной печати // в компьютерной газете «Нестор» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.nestor.minsk.by/kg/1997/45/kg74505.htm> (дата обращения: 30.08.2014).

72. Таранов А.Г. Диагностические тест-системы: Радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики. – Новосибирск: Мокеев, 2002. – 288 с.

73. Таранова Н.А., Жердев В., Дзантиев Б.Б. Иммунохимические тест-системы для внелабораторной диагностики // Иммунология. – 2014. – 15. – С. 541–564.

74. Технология лекарственных форм / под ред. Л.А. Ивановой. – Т. 2. – М.: Медицина, 1991. – С. 201.

75. Храмов Е.Н. Специфическая и неспецифическая индикация микроорганизмов в окружающей среде // Материалы 11 сессии общего собрания РАМН «Медицинские проблемы биобезопасности» (3–6 апреля 2002 г., Москва) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bio.su/hrr.htm>

76. Чернобровкина Т.Я., Жаров С.Н., Лучшев В.И. Некоторые аспекты антителогенеза вирусного гепатита С // Международный медицинский журнал. – 2005. – №1. – С. 107–110.

77. Шевченко Ю.Л. Экология человека: Вызовы цивилизации, долг общества, ответственность здравоохранения // Вестн. РАМН. – 2002. – №10. – С. 3–6.

78. Щербakov Г.Я. Источники и основные угрозы для национальной биологической безопасности // Материалы 11 сессии общего собрания РАМН «Медицинские проблемы биобезопасности» (3–6 апреля 2002 г., Москва) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bio.su/schr.htm>

79. Юминова Н.В. Диагностика краснухи в Российской Федерации // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. – 2004. – 6. – С. 18–22.

80. Ющук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О. и др. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 600 с.

81. Яковченко А.М. Разработка методологии многопрофильного выявления антител к возбудителям инфекционных заболеваний: автореф. дис. ... канд. биол. наук / ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. – Новосибирск, 2007.

82. Afanassiev V., Hanemann V., Wolf S. Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film // Nucleic Acids Res, 2000, 28 (12): 1–5.

83. 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, 44: 2733–2738.

84. Alivisatos A., Gu W., Larabell C. Quantum dots as cellular probes // Annu Rev Biomed Eng, 2005, 7: 55–76.

85. Allain L. R., Stratis-Cullum D. N., Vo-Dinh T. Investigation of microfabrication of biological sample arrays using piezoelectric and bubble-jet printing technologies // Analytica Chimica Acta, 2004, 518 (1–2): 77–85.

86. Andresen H., Bier F.F. Peptide microarrays for serum antibody diagnostics // Methods Mol. Biol., 2009, 509: 123.

87. Anthony B.J., Concepcion I.E., Concepcion N.F. et al. Relation between maternal age and serum concentration of IgG antibody to type III group B streptococci // J. Infect. Dis, 1994, 170: 717–720.

88. Alanazi F.K., Radwan A.A., Alsarra I.A. Biopharmaceutical applications of nanogold // Saudi Pharmaceutical Journal, 2010, 18: 179–193. DOI: 10.1016/j.jsps.2010.07.002.

89. Alcantara F.F., Iglehart D.J., Ochs R.L. Heparin in plasma samples causes nonspecific binding to histones on Western blots // J. Immunol. Meth, 1999, 226: 11–18.

90. Alexandre I., Hamels S., Dufour S. et al. Colorimetric silver detection of DNA microarrays // Anal. Biochem, 2001, 295 (1): 1–8.

91. Alter J. One-Step separation of plasma from whole blood for in vitro diagnostics // Genetic Engineering News, 1996a, 16 (5): 28–31.

92. *Alter J.* Single-Step vertical plasma separation of whole blood for tests and sample preparation // *Genetic Engineering News*, 1996b, 16 (20): 30–34.
93. *Angenendt P., Glokler J., Murphy D. et al.* Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials // *Anal. Biochem.*, 2002, 309 (2): 253–260.
94. *Arenkov P., Kukhtin A., Gemmell A. et al.* Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions // *Anal. Biochem.*, 2000, 278 (2): 123–131.
95. *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; 44: 2733–2738. DOI: 10.1128/JCM.00980-05.
96. *Bacarese-Hamilton T., Gray J., Ardizzoni A., Frisanti A.* Allergen microarrays // *Meth. Mol. Med.*, 2005, 114: 195–207.
97. *Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P. et al.* Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391: 943. DOI: 10.1007/s00216-007-1768-z
98. *Barbulovic-Nad I., Lucente M.I., Sun Y. et al.* Bio-Microarray Fabrication Techniques (Review) // *Critical Reviews in Biotechnology*, 2006, 26(4): 237–259. DOI: 10.1080/07388550600978358.
99. *Bastarache J. A., Koyama T., Wickersham N. E. et al.* Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: A validation study // *J. Immunol. Meth.*, 2011, 367: 33–39. DOI:10.1016/j.jim.2011.01.005.
100. *Bates D.L.* Enzyme amplification in diagnostics // *Trends Biotechnol.*, 1987, 5: 204–209.
101. *Batteiger B., Newhall W.J., Robert B.* The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes // *J. Immunol. Meth.*, 1982, 55: 297–307.
102. *Bayer E.A., Wilchek M.* The use of avidin-biotin complex as a tool in molecular biology // *Meth. Biochem. Anal.*, 1980, 26: 1–45.
103. *Bendayan M.* Protein-A gold electron microscopic immunocytochemistry, methods, applications and limitations // *J. Electron. Microsc. Tech.*, 1984, №1: 243–248.
104. *Bensinger W.I., Buckner C.D., Clift R.A., Thomas E.D.* Clinical trials with staphylococcal Protein A // *J. Biol. Resp. Modif*, 1984, №3, P. 347–401.

105. *Benters R., Niemeyer C.M., Wohrle D.* Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays // *Chembiochem.*, 2001, 2 (9): 686–694.

106. *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 // *J. Immunol. Meth.*, 1999a, 227: 31–39.

107. *Bhattacharya D., Bhattacharya R., Dhar T.K.* A novel signal amplification technology for ELISA based on catalyzed reporter deposition. Demonstration of its applicability for measuring aflatoxin B1 // *J. Immunol. Meth.*, 1999b, 230: 71–86.

108. *Biagini R.E.* Method for simultaneous measurement of antibodies to 23 pneumococcal capsular polysaccharides // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003, 10: 744–750.

109. *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, 11: 50–55.

110. *Bischoff R., Luider T.M.* Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers // *Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2004, 803(1): 27–40.

111. *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, 136 (1): 175–179.

112. *Blackburn J.M., Hart D.J.* Fabrication of protein function microarrays for systems-oriented proteomic analysis // *Methods Mol. Biol.*, 2005, 310: 197–210.

113. *Bloom J.W., Wong M.F., Mitra G.* Detection and reduction of Protein A contamination in immobilized Protein A purified monoclonal antibody preparations // *J. Immunol. Meth.*, 1989, 117 (1): 83–89.

114. *Bobrow M.N., Harris T.D., Shaughnessy K.J., Litt G.J.* Catalyzed reporter deposition. A novel method of signal amplification: I. Application to immunoassay // *J. Immunol. Meth.*, 1989, 125: 279–286.

115. *Bobrow M.N., Shaughnessy K.J., Litt G.J.* Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification: II. Application to membrane immunoassays // *J. Immunol. Meth.*, 1991, 137: 103–111.

116. *Bonroy K., Frederix F., Reekmans G. et al.* Comparison of random and oriented immobilisation of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers // *J. Immunol. Meth.*, 2006, 312: 167–181. DOI:10.1016/j.jim.2006.03.007
117. *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, 268: 171–177.
118. *Bosqui L., Corral M., Levy D., Paulo S. et al.* Evaluation of the Dot-ELISA as a diagnostic test for human strongyloidiasis based on the detection of IgA in saliva // *Acta Tropica*, 2020, 203: 105305. DOI:10.1016/j.actatropica.2019.105305.
119. *Bostrom M., Markland K., Sanden A.M. et al.* Effect of substrate feed rate on recombinant protein secretion, degradation and inclusion body formation in *Escherichia coli* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 68: 82–90.
120. *Bouche F., Ammerlaan W., Berthet F. et al.*, Immunosorbent assay based on recombinant hemagglutinin protein produced in a high-efficiency mammalian expression system for surveillance of measles immunity // *J. Clin. Microbiol.*, 1998; 36: 721–6.
121. *Branson B. Brenan M., Bath M.L.* Indoxyl-tetranitro blue tetrazolium method for detection of alkaline phosphatase in immunohistochemistry // *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, 37: 1299–1306.
122. *Bussow K., Cahill D., Nietfeld W. et al.* A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library // *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26 (21): 5007–5008.
123. *Butler J.E.* Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays // *Methods.*, 2000, 22 (1). P. 4–23.
124. *Cahill D. J.* Protein and antibody arrays and their medical applications // *J. Immunol. Meth.*, 2001, 250: 81–91.
125. *Camarero, J.A.* Review article, recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports // *Peptide Science*, 2007, 90: 450. DOI: 10.4236/ojpcchem.2013.31002
126. *Cantarero L.A., Butler J.E., Osborn J.W.* The adsorptive characteristics of protein for polystyrene and their significance in solid phase immunoassays // *Anal. Biochem.*, 1980, 105: 375–382.
127. *Carney J., Braven H., Seal J., Whitworth E.* Present and future applications of gold in rapid assays // *IVDT.*, 2006, №3: 41–50.

128. *Carville D.* Microparticle technology in clinical diagnostics // IVD Technology, 2007, №3: 38–35.
129. *Chan K.C.* Convergence of quantum dot barcodes with microfluidics and signal processing for multiplexed high-throughput infectious disease diagnostics // Nano Lett., 2007, 7: 2812–2818. DOI: 10.1021/nl071415m
130. *Chaudhuri B., Raychaudhuri S.* Manufacturing high-quality gold sol // IVD Technol., 2001, 7: 46–54.
131. *Chandler J., Gurmin T., Robinson N.* The Place of Gold in Rapid Tests // IVD Technology, 2000, № 2: 37–49.
132. *Chandler J., Robinson N., Whiting K.* Handling false signals in gold-based rapid tests // IVD Technology., 2001, №2: 34–45
133. *Chen G.Y., Uttamchandani M., Zhu Q. et al.* Developing a strategy for activity-based detection of enzymes in a protein microarray // Chembiochemistry, 2003, 4: 336–341.
134. *Chiari M., Cretich M., Corti A. et al.* Peptide microarrays for the characterization of antigenic regions of human chromogranin A // Proteomics, 2005, 5 (14): 3600–3603.
135. *Chu X., Xiang Z., Fu X. et al.* Silver-enhanced colloidal gold metalloimmunoassay for *Schistosoma japonicum* antibody detection // J. Immunol. Meth., 2005, 301: 77–88.
136. *Clausmeyer J., Schuhmann W., Plumere N.* Review. Electrochemical patterning as a tool for fabricating biomolecule microarrays // Trends in Analytical Chemistry, 2014, 58: 23–30. DOI: 10.1016/j.trac.2014.03.004
137. *Collett J.R., Cho E.J., Ellington A.D.* Production and processing of aptamer microarrays // Methods, 2005, 37 (1): 4–15.
138. *Combarete V., Bergeron C., Brejon S. et al.* Protein chip array profiling analysis of sera from neuroblastoma patients // Cancer Lett., 2005, 228 (1): 91–96.
139. *Constantine N.T., Fox E., Abbatte E.A., et al.* Diagnostic usefulness of five screening assays for HIV in an east African city where prevalence of infection is low // AIDS., 1989, 3: 313–317.
140. *Conroy J.* Developing biodefense IVDs is still a priority // IVD Technology, 2006, №4: 23–25.
141. *Czerny C., Meyer H., Mahnel H.* Establishment of an ELISA for the detection of orthopoxviruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies // Zentralbl Veterinarmed B, 1989, 36 (7): 537–46.

142. *Van Gool A., Corrales F., Čolović M. et al.* Analytical techniques for multiplex analysis of protein biomarkers // *Exp. review. proteom.*, 2020, 17(4): 257–273. DOI:10.1080/14789450.2020.1763174.
143. *Cretich M., Damin F., Pirri G., Chiari M.* Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions // *Biomolecular Engineering*, 2006, 23: 77–88. DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.02.001.
144. *Cretich M., Damin F., Longhi R. et al.* Peptide microarrays on coated silicon slides for highly sensitive antibody detection. *Small Molecule Microarrays // Methods and Protocols*, 2010, 669: 147–160. DOI: 10.1007/978-1-60761-845-4_12.
145. *Dai J., Baker G.L., Bruening M.L.* Use of porous membranes modified with polyelectrolyte multilayers as substrates for protein arrays with low nonspecific adsorption // *Anal. Chem.*, 2006, 78 (1): 135–140. DOI: 10.1021/ac0513966.
146. *Delehanty J.B., Ligler, F.S.* A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria // *Anal. Chem.*, 2002, 74: 5681–5687.
147. *De Roe, C.; Courtoy, P.J.; Baudhuin, P.A.* Model of Protein-Colloidal Gold Interactions. *J. Histochem. Cytochem.* 1987, 35 (11), 1191–1198.
148. *Dietrich H.R., Knoll J., van den Doel L.R. et al.* Nanoarrays: a method for performing enzymatic assays // *Anal. Chem.*, 2004, 76 (14): 4112–4117.
149. *Duarte J.G., Blackburn J.M.* Advances in the development of human protein microarrays. Review // *Expert Review of Proteomics*, 2017, 14 (7): 627–641 DOI: 10.1080/14789450.2017.1347042.
150. *Ekins R. P.* Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays // *Clin. Chem.*, 1998, 44: 2015–2030.
151. *Ekins R.P., Chu F.W.* Multianalytical microspot immunoassay–microanalytical «compact disk» of the future // *Clin Chem.*, 1991, 37: 1955–1967.
152. *Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG.* Antibody-based protein multiplex platforms: Technical and operational challenges // *Clinical Chemistry*. 2010, 56 (2):186–193. DOI: 10.1373/clinchem.2009.127514.
153. *Engin ED.* The use of multiplexing technology in the immuno-diagnosis of infectious agents // *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 2019, 40:109–122. DOI: 10.1080/15321819.2018.1563551.

154. *Ersh A.V., Poltavchenko A.G., Nikonov A.M.* Multiplex malattie infettive immunodiagnostiche // *Italian Science Review.*, 2014, 9 (18): 12–17 [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.ias-journal.org/archive/2014/september/Ersh.pdf>

155. *Espina V., Woodhouse E.C., Wulfschuhle J. et al.* Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies // *J. Immunol. Meth.*, 2004, 290: 121–133.

156. *Esser P.* Principles in Adsorption to Polystyrene // *Nunc Laboratories.*, 1997, Bulletin №6 [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.nuncbrand.com>

157. *Evans J.* Point Of Care Diagnostic – HLC043E // *BCC Research*, 2016, 239 p. [Electronic resource]. – Access mode: www.bccresearch.com

158. *Falsey J.R., Renil M., Park S., Li S., Lam K.S.* Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays // *Bioconjug. Chem.*, 2001, 12 (3): 346–353.

159. *Faulk W., Taylor G.* An immunocolloid method for the electron microscope // *Immunochem.*, 1971, 8: 1081–1087.

160. *Faulstich K., Gruler R., Eberhard M., Haberstroh K.* Developing rapid mobile POC systems. Part 1: Devices and applications for lateral-flow immunodiagnostics // *IVD Technology*, 2007, №7: 47–53.

161. *Fici D.A., McCormick W., Brown D.W. et al.* A protein multiplex microarray substrate with high sensitivity and specificity // *J. Immunol. Meth.*, 2010, 363: 60–66. DOI: 10.1016/j.jim.2010.10.005.

162. *Foubert A., Beloglazova N.V., De Saeger S.* Comparative study of colloidal gold and quantum dots as labels for multiplex screening tests for multi-mycotoxin detection // *Analytica Chimica Acta*, 2016, 955: 48–57. DOI: 10.1016/j.aca.2016.11.042.

163. *Fowler S.J.* The detection of proteins on blots using gold or immunogold // *Methods Mol. Biol.*, 1994, 32: 239–255.

164. *Frank R.* The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports – principles and applications // *J. Immunol. Meth.*, 2002, 267 (1): 13–26.

165. *Frens G.* Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nat. Phys. Sci.*, 1973, 241: 20–31.

166. *Fukushima K., Ikehara Y., Kanai M. et al.* A β -N-acetylglucosaminyl phosphate diester residue is attached to the glycosylphosphatidylinositol anchor of human placental alkaline phosphatase // *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 36296–36302.
167. *Gaster R.S., Hall D.A., Wang S.X.* Autoassembly protein arrays for analyzing antibody cross-reactivity // *Nano Lett.*, 2011, 11 (7): 2579–2583. DOI: 10.1021/nl1026056.
168. *Ge H.* UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein–protein, protein–DNA, protein–RNA and protein–ligand interactions // *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28 (2): 3–9.
169. *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, 16(3): 559–566.
170. *Genevieve, M., Vieu, C., Carles, R. et al.* Biofunctionalization of gold nanoparticles and their spectral properties // *Microelectron. Eng.*, 2007, 84: 1710. DOI: 10.1016/j.mee.2007.01.247.
171. *Gibbs J., Root D.M.* Evaluation of protein binding to 96 well plates by enhanced colloidal gold labeling // *Costar Research Newsletter*, 1988, 1 (2): 42–57.
172. *Gilchuk, P. Gilchuk, G. Sapparapu, R. et al.* Crowe Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections // *Cell*, 2016, 167: 684–694. DOI:10.1016/j.cell.2016.09.049.
173. *González-González M., Bartolome R., Jara-Acevedo R.* Evaluation of homo- and hetero-functionally activated glass surfaces for optimized antibody arrays // *Analytical Biochemistry*, 2014, 450: 37–45. DOI: 10.1016/j.ab.2014.01.002.
174. *Granoff, M., Shackelford, P.G., Suarez, B.K. et al.* Hemophilus influenzae type B disease in children vaccinated with type B polysaccharide vaccine // *New Engl. J. Med.*, 1986, 315: 1584–90.
175. *Guesdon J.L., Ternynck T., Avrameas S.* The use of avidin–biotin interaction in immunoenzymatic techniques // *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, 27: 1131–1143.
176. *Guire P.E.* Stability issues for protein-based in vitro diagnostic products // *IVD Technology.*, 1999, 5 (2): 50–57.
177. *Guo C., Zhou Z., Wen Z. et al.* Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, 7:317. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00317.

178. Gutmann O., Niekrawietz R., Kuehlewein R. *et al.* Impact of medium properties on droplet release in a highly parallel nanoliter dispenser // *Sensors and Actuators, A-Physical*, 2004, 116 (2): 187–194.

179. Gutmann O., Kuehlewein R., Reinbold S. *et al.* Fast and reliable protein production by a new drop-in-drop technique // *Lab on a Chip*, 2005, 5(6): 675–681. DOI: 10.1039/b418765b.

180. 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, 2 (2): 4–6.

181. Hadd H., Sinclair J.C. Constructing arrays of proteins // *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2013, 17: 946–951. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.10.004.

182. Hamelinck D., Zhou H., Li L. *et al.* Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling // *Mol. Cell. Proteom.*, 2005, 4 (6): 773–784. DOI: 10.1074/mcp.M400180-MCP200.

183. Hasegawa T., Ushida A., Goda M., Ono Y. Organic compounds generated after the flow of water through micro-orifices: Were they synthesized? // *Heliyon*, 2017, 3 e00376. DOI: 10.1016/j.heliyon.2017.e00376).

184. Healy D.S., Dax E.M. An evaluation of two simple synthetic peptide based anti-HIV assays // *J. Virol. Meth.*, 1992, 38: 305–312.

185. Hermann J.E., Collins M.F. Quantitation of immunoglobulin adsorption to plastic // *J. Immunol. Methods.*, 1976, 10: 363–367.

186. Hermanson, G.T. Preparation of colloidal-gold-labelled-proteins. *Bioconjugate Techniques* // Academic Press: London, 1996: 593–598.

187. Herzog V., Fahimi H. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor // *Anal. Biochem.*, 1973, 55: 554–561.

188. Herzog D.P. Emerging trends in lab automation and instrumentation // *IVD Technology*, 2006, №5: 44–47. DOI: 10.1109/DATE.2007.364607.

189. Hiller R., Laffer S., Harwanegg C. *et al.* Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment // *FASEB J.*, 2002, 16: 414–416.

190. Holgate C.S., Jackson P.I., Cowen P.N., Bird C.C. Immuno-gold – silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity // *J. Histochem. Cytochem.*, 1983, 31: 938–944.

191. *Hultschig C., Kreutzberger J., Seitz H. et al.* Recent advances of protein microarrays // *Current Opinion in Chem. Biol.*, 2006, 10:4–10. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.12.011.
192. *Horisberger, M., Clerr, M.F.* Labelling of colloidal gold with protein A // *Histochemistry*, 1985, 82: P. 219–221.
193. *Hsu S.M., Soban E.* Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry // *J. Histochem. Cytochem.*, 1982, 30: 1079–1086.
194. *Hu S.Q.* A Label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for detection of paraoxon // *Talanta*, 2003, 61 (6): 769–777.
195. *Hu Y., Hirshfield I.* Rapid approach to identify an unrecognized viral agent // *J. Virol. Meth.*, 2005, 127: 80–86.
196. *Huang R-P.* Detection of multiple proteins in an antibody-based protein microarray system // *J. Immunol. Meth.*, 2001, 255: 1–13.
197. *Hueber, W., Kidd, B.A., Tomooka, B.H. et al.* Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.*, 2005, 52 (9): 2645–2655. DOI: 10.1002/art.21269.
198. *Hultschig C., Kreutzberger J., Seitz H. et al.* Recent advances of protein microarrays // *Cur. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10: 4–10. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.12.011.
199. *James T.H.* The reduction of silver ions by hydroquinone // *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, 61: 648–652.
200. *James T.H.* Reduction of silver ions by hydroquinone and p-phenylenediamine in alkaline solution // *J. Phys. Chem.*, 1941, 45: 223–233.
201. *Janzi, M., Odling, J., Pan-Hammarstrom, Q. et al.* Serum microarrays for large scale screening of protein levels // *Mol. Cell. Proteomics.*, 2005, 4 (12): 1942–1947. DOI: 10.1074/mcp.M500213-MCP200.
202. *Johnsson B., Lofas S., Lindquis, G.* Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors // *Anal. Biochem.*, 1991, 198: 268–276.
203. *Jonczyk R., Timurb S., Schepera T., Stahl F.* Development of living cell microarrays using non-contact micropipette printing // *J. Biotechnology*, 2016, 217: 109–111. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.013.
204. *Joos T., Berger H.* The long and difficult road to the diagnostic market: protein microarrays // *Drug Discovery Today*, 2006, 11 (21/22): 959–961.

205. *Kallstrom G., Warfield K.L., Swenson D.L., Mort S. et al.* Analysis of Ebola virus and VLP release using an immunocapture assay // *J. Virol. Meth.*, 2005, 127: 1–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.02.015.
206. *Kamath G.R., Shah D.P., Hwang L.* Immune response to hepatitis B vaccination in drug using populations: A systematic review and meta-regression analysis // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. – P. 2265–2274.
207. *Kamaruzaman M., Asim E.* A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and Western blots // *J. Immunol. Meth.*, 1989, 117(1): 141–145.
208. *Kawasaki E., Eisenbarth G.S.* High-throughput radioassays for autoantibodies to recombinant autoantigens // *Frontiers in Bioscience*, 2000, 5: 181–190.
209. *Kim J. W., Yamagata Y., Takasaki M. et al.* A device for fabricating protein chips by using a surface acoustic wave atomizer and electrostatic deposition. *Sensors and Actuators B-Chemical* 2005; 107 (2): 535–545. DOI: 10.1016/j.snb.2004.11.012.
210. *Kingsmore S.F.* Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays // *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, 5: 310–317. DOI: 10.1038/nrd2006.
211. *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, 4 (3): 267–277. DOI: 10.1074/mcp.M400192-MCP200.
212. *Kodadek T.* Protein microarrays: prospects and problems // *Chem. Biol.*, 2001, № 8: 105–109.
213. *Kohler G., Milstein C.* Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*, 1975, 256: 495–497.
214. *Kopf E., Shnitzer D., Zharhary D.* Panorama Ab microarray cell signaling kit: a unique tool for protein expression analysis // *Proteomics*, 2005, 5 (9): 2412–2416. DOI: 10.1002/pmic.200401305.
215. *Kozarova A., Petrinac S., Ali A., Hudson J.W.* Array of informatics: applications in modern research // *J. Proteome Res.*, 2006, 5 (5): 1051–1059. DOI: 10.1021/pr050432e.
216. *Kricka L.J.* Trends in immunoassay technologies // *J. Clin. Immunoass.*, 1993, 16: 267–271.

217. *Kricka L.J., Master S.R.* Validation and quality control of protein microarray-based analytical methods // *Mol. Biotechnol.*, 2008, 38: 19–23. DOI: 10.1007/s12033-007-0066-5.
218. *Kusnezow W., Jacob A., Walijew A. et al.* Antibody immunoarrays: an evaluation of production parameters // *Proteomics*, 2003, 3: 254–264.
219. *Kusnezow W., Hoheisel J.D.* Solid supports for microarray immunoassays // *J. Mol. Recognit.*, 2003, 16 (4): 165–176.
220. *LaBorde R.T., O'Farrell B.* Paramagnetic-particle detection in lateral-flow assays // *IVD Technology*, 2002, №3: 36–41.
221. *Lechtzier V., Hutoran M., Levy T. et al.* Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA // *J. Immunol. Meth.*, 2002, 270: 19–26.
222. *Lee J.H., Hwang K.S., Park J. et al.* Immunoassay of prostate-specific antigen (PSA) using resonant frequency shift of piezoelectric nanomechanical microcantilever // *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20, №10: 2157–2162. DOI: 10.1016/j.bios.2004.09.024.
223. *Legutki J., Magee D., Stafford P., Johnston S.* A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection // *Vaccine*, 2010, 28: 4529–4537. DOI:10.1016/j.vaccine.2010.04.061.
224. *Lemmo A., Fisher J., Geysen H. et al.* Characterization of an Inkjet Chemical Microdispenser for Combinatorial Library Synthesis // *Anal. Chem.*, 1997, 69: 543–551.
225. *Lechtzier V., Hutoran M., Levy T. et al.* Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA // *J. Immunol. Meth.*, 2002, 270: 19–26.
226. *Ler S. G., Lee F. K., Gopalakrishnakone P.* Trends in detection of warfare agents. Detection methods for ricin, *Staphylococcal enterotoxin B* and T-2 toxin // *J. Chromatography A.*, 2006, 1133: P. 1–12. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.08.078.
227. *Lesaicherre M.L., Uttamchandani M., Chen G.Y., Yao S.Q.* Antibodybased fluorescence detection of kinase activity on a peptide array // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, 12 (6): 2085–2088.
228. *Lewinson G., Twist P.* The reduction of silver ions on nuclei by hydroquinone // *J. Photogr. Sci. Eng.*, 1973, 21: 211–219.
229. *Liang R-Q., Tan C-Y., Ruan K-C.* Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement // *J. Immunol. Meth.*, 2004, 285: 157–163.

230. *Lidgard G.* Simplifying detection technologies// IVD Technology, 2006, № 5: 30-35.

231. *Lingwood D., Ballantyne J.S.* Alkaline phosphatase-immunoglobulin conjugate binds to lipids in vitro, independent of antibody selectivity // J. Immunol. Meth., 2006, 311: 174-177. DOI: 10.1016/j.jim.2006.02.002.

232. *Liotta L., Petricoin E.* Molecular profiling of human cancer // Nat. Rev. Genet., 2000, №1: 48-54.

233. *Liotta L., Kohn E.* The microenvironment of the tumour-host interface // Nature., 2001, 411: 375-383.

234. *Liotta, L.A., Espina, V., Mehta, A.I. et al.* Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications // Cancer Cell, 2003, 3 (4): 317-325.

235. *Liu Y., Li C.* Advanced immobilization and amplification for high performance protein chips // Analytical Letters, 2012, 45: 130-155. DOI: 10.1080/00032719.2011.633187.

236. *Lopez M.F., Pluskal M.G.* Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome. Review // J. Chromatography B., 2003, 787: 19-27.

237. *Lochhead M.J., Todorof K., Delaney M., et al.* Rapid multiplexed immunoassay for simultaneous serodiagnosis of HIV-1 and coinfections // J. Clin. Microbiol., 2011, 49: 3584-3590. DOI: 10.1128/JCM.00970-11.

238. *Lucoeq J.M., Baschong W.* Preparation of protein colloidal gold complexes in the presens of sommonly used buffers // Eur. J. Cell Biol., 1986, 42 (2): 332-337.

239. *Lueking A., Cahill D.J., Müllner S.* Protein biochips: a new and versatile platform technology for molecular medicine // DDT, 2005, 10(11): 789-793. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03449-5.

240. *Lyashchenko K.P., Singh M., Colangeli R., Gennaro M. L.* A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases // J. Immunol. Meth., 2000, 242: 91-100.

241. *Mac Beath G., Schreiber P.L.* Printing proteins as microarrays for highthroughput function determination // Science., 2000, 289: 1760-1763.

242. *McKinney M.M., Parkinson A.* A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascitic fluid // J. Immunol. Melh., 1987, 96 (2): P. 271-278.

243. *Miller, J.C.* Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers // *Proteomics*, 2003, 3: 56–63.
244. *Moeremans M., Daneels G., Dijck D.V. et al.* Sensitive visualization of antigen– antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining // *J. Immunol. Meth.*, 1984, 74: 353–360.
245. *Morris P., Davies N.W.S., Keir G.* A screening assay to detect antigen-specific antibodies within cerebrospinal fluid // *J. Immunol. Meth.*, 2006, 311: 81–86. DOI: 10.1016/j.jim.2006.01.015
246. *Ngo Y., Advani R., Valentini D. et al.* Identification and testing of control peptides for antigen microarrays // *Journal of Immunological Methods*, 2009, 343: 68–78. DOI: 10.1016/j.jim.2008.12.004.
247. *Nielsen U., Geierstanger B.* Multiplexed sandwich assays in microarray format // *J. Immunol. Meth.*, 2004, 290: 107– 120.
248. *Norde W., Luklema J.* The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces. 1. Adsorption isotherms effects of charge, ionic strength and temperature // *J. Colloid Interface Sci.*, 1978, 66: 257–265.
249. *Norde W.* The adsorption of proteins at solid surfaces // *Adhesion and Adsorption of Polymers.*, 1979, 12: 801–825.
250. *Oberbichler E., Wiesauer M., Schlögl E. et al.* Competitive binding assay for biotin and biotin derivatives, based on avidin and biotin-4-fluorescein // *Methods Enzymol.*, 2020, 633: 1–20. DOI: 10.1016/bs.mie.2019.10.028.
251. *Ofir K., Berdichevsky Y., Benhar I. et al.* Versatile protein microarray based on carbohydrate-binding modules // *Proteomics*, 2005, 7: 1806–1814. DOI: 10.1002/pmic.200401078.
252. *Qin, F., Schoenhoff, F.S., Savage, W.J. et al.* Multiplex assays for biomarker research and clinical application: translational science coming of age // *Proteomics: Clinical Applications*, 2010, 4, 271. DOI: 10.1002/prca.200900217.
253. *Oliver C.* Use of immunogold with silver enhancement // *Meth. Mol. Biol.*, 1994, 34: 211–217.
254. *Opalka D.* Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by multiplexed Luminex assay // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003, 10: 108–115.

255. *Jonczyka R., Timurb S., Schepera T., Stahl F.* Development of living cell microarrays using non-contact micropipette printing // *J. Biotechnology*, 2016, 217: 109–111. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.013.
256. *Page R.N., King R., Googe P.B.* Tissue Microarray in Melanoma // *Journal of Histotechnology*, 2017, 26 (4): 271–274. DOI: 10.1179/his.2003.26.4.271.
257. *Papp K., Szekeres Z., Erdei A., Prechl J.* Two-dimensional immune profiles improve antigen microarray-based characterization of humoral immunity // *Proteomics*, 2008, 8: 2840–2848. DOI: 10.1002/pmic.200800014.
258. *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, 375: 75–83. DOI: 10.1016/j.jim.2011.09.009.
259. *Park R.* Industry joins the battle against bioterrorism // *IVD Technology*, 2002, №1: 5–10.
260. *Park R.* Developing diagnostics for the war on bioterrorism // *IVD Technology*, 2003, №4: 6–8.
261. *Park R.* The evolution of assay development // *IVD Technology*, 2006, №3: 36–38.
262. *Peluso P., Wilson D.S., Do D., Tran H. et al.* Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays // *Anal. Biochem.*, 2003, 312: 113–120.
263. *Petersen K., McMillan W.* IVD systems in bioterrorism response // *IVD Technology*, 2002, №5: 12–16.
264. *Phelan M.L., Nock S.* Generation of bioreagents for protein chips // *Proteomics*, 2003, 3 (11): 2123–2134.
265. *Pla-Roca M., Leulmi R.F., Tourekhanova S. et al.* Antibody colocalization microarray: a scalable technology for multiplex protein analysis in complex samples // *Mol. Cell. Proteomics*, 2012, 11 (4). DOI: 10.1074/mcp.M111.011460.
266. *Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V. et al.* Selection of Substrate Material for Protein Matrices // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, 2016a, 52 (2): 301–307. DOI: 10.1134/S2070205116020234.
267. *Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V. et al.* The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed

dot-immunoassay // J. Immunoassay and Immunochem., 2016b, 37 (5): 540–554. DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.

268. *Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., Ersh A.V.* Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents // J. Virol. Meth., 2016c, 236: P. 231–236. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.08.003.

269. *Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V. et al.* Rapid protocol of dot-immunoassay for orthopoxviruses detection // J. Virol. Meth., 2020, 279: 113859. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113859.

270. *Porstmann B., Porstmann T., Nugel E.* Comparison of chromogens for the determination of horseradish peroxidase as a marker in enzyme immunoassay // J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1981, 19: 435–442.

271. *Powers D.M.* Risk management for IVDs. Part 1: Planning and documenting the risk management process // IVD Technology, 2006a, №3: 30–32.

272. *Powers D.M.* Risk management for IVDs. Part 2: Assessing risks to patients from incorrect test results // IVD Technology, 2006b, №4: 28–31.

273. *Prechl J., Papp K., Erde A.* Antigen microarrays: descriptive chemistry or functional immunomics? // Trends in Immunol., 2010, 31(4): 133–137. DOI: 10.1016/j.it.2010.01.004.

274. *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, 272 (21): 5412–5425. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04971.

275. *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.

276. *Reta D., Tessema T., Ashenef A. et al.* Molecular and Immunological Diagnostic Techniques of Medical Viruses. Review // Hindawi International Journal of Microbiology, 2020, Article ID 8832728, 19 p. DOI: 10.1155/2020/8832728.

277. *Robinson N.* Immunogold conjugation for IVD applications // IVD Technology, 2002, №3: 33–36.

278. *Rosenbloom A.J., Ferris R., Sipe D.M. et al.* In vitro and in vivo protein sampling by combined microdialysis and ultrafiltration // J Immunol. Meth., 2006, 309: 55– 68. DOI: 10.1016/j.jim.2005.11.013.

279. *Roszkopf S., Gyurján I., Soldo R. et al.* The pre-analytical processing of blood samples for detecting biomarkers on protein microarrays // J. Immunol. Meth., 2015, 418: 39–51 DOI: 10.1016/j.jim.2015.01.009

280. *Rousserie G., Sukhanova A., Even-Desrumeaux K. et al.* Semiconductor quantum dots for multiplexed bio-detection on solid-state microarrays // Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2010, 74: 1–15. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2009.04.006.

281. *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, 402: 35–42. DOI: 10.1016/j.jim.2013.11.005.

282. *Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Correlation between the composition of multivalent antibody conjugates with colloidal gold nanoparticles and their affinity // J. Immunol. Meth., 2010, 357: 17–25. DOI: 10.1016/j.jim.2010.03.010.

283. *Sun H., Chen G., Yao S.* Recent Advances in Microarray Technologies for Proteomics // Chemistry & Biology, 2013, 20: 685-699. DOI: 10.1016/j.chembiol.2013.04.009.

284. *Sapsford K. E., Pons T., Medintz I. L., Mattoussi H.* Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots // Sensors, 2006, 6: 925-953. DOI: 10.3390/s6080925.

285. *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, 378: 44-50. DOI: 10.1016/j.jim.2012.02.002.

286. *Schmitt J.* Recombinant Autoantigens for Diagnosis and Therapy of Autoimmune Diseases // Biomedicine and Pharmacotherapy., 2003, 57(7): 261–268.

287. *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, 18: 1455-1459.

288. *Segala D.M., Weinerb G. J., Weinerc L. M.* Introduction: bispecific antibodies // J. Immunol. Meth., 2001, 248: 1–6.

289. *Sehr P., Zumbach K., Pawlita M.* A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology // J. Immunol. Meth., 2001, 253: 153–162.

290. *Seong S.Y., Choi C.Y.* Current status of protein chip development in terms of fabrication and application // *Proteomics*, 2003, 3, №11: 2176–2189.
291. *Sergeeva E.I., Ternovoi V.A., Chausov E.V. et al.* Imported cases of dengue fever in Russia during 2010–2013 // *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2015, 8(2):90–93. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60194-2.
292. *Shreffler W.G., Lencer D.A., Bardina L., Sampson H.A.* IgE and IgG₄ epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2 // *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, 116, № 4: 893–899. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.06.033.
293. *Shchelkunov S.N.* An increasing danger of zoonotic orthopox-virus infections // *PLoS Pathog.*, 2013, 9:e1003756.
294. *Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W.* Orthopox-viruses Pathogenic for Humans. New York: Springer, 2005, 425 p.
295. *Shuman D.C., James T.H.* Kinetics of physical development // *J. Photogr. Sci. Eng.*, 1971, 15: 42–47.
296. *Sinclair J.C.* Constructing arrays of proteins // *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2013, 17: 946–951. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.10.004.
297. *Singh S., Dhawan A., Karhana S. et al.* Quantum Dots: An Emerging Tool for Point-of-Care Testing. Review // *Micromachines*, 2020, 11: 1058–1081. DOI: 10.3390/mi11121058
298. *Snyder J.W., Wolcott M.J.* The role of diagnostics in bioterrorism // *IVD Technology*, 2007, №4: 26–32.
299. *Sola L., Gagni P., Cretich M., Chiari M.* Surface immobilized hydrogels as versatile reagent reservoirs for microarrays // *J. Immunol. Meth.*, 2013, 391: 95–102 DOI: 10.1016/j.jim.2013.02.013.
300. *Soroka S.D.* The use of simple, rapid tests to detect antibodies to human immunodeficiency virus types 1 and 2 in pooled serum specimens // *J. Clin. Virol.*, 2003, 27: 90–96.
301. *Speer R., Wulfkühle J.D., Lotta L.A. Petricoin 3rd, E.F.* Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis // *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2005, 7 (3): 240–245.
302. *Stafford P., Johnston S.* Microarray technology displays the complexities of the humoral immune response // *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2011, 11(1): 5-8. DOI: 10.1586/erm.10.113.
303. *Stark W.J.* Nanoparticles in biological systems // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, 50 (6): 1242–58. DOI: 10.1002/anie.200906684.

304. *Stern D., Pauly D., Zydek M. et al.* Development of a Genus-Specific Antigen Capture ELISA for Orthopoxviruses – Target Selection and Optimized Screening // *PLoS ONE*, 2016a, 11 (3), e0150110. DOI:10.1371/journal.pone.0150110.

305. *Stern D., Olson V., Smith S. et al.* Rapid and sensitive point-of-care detection of Orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration // *Virology Journal*, 2016b, 13: 207–214. DOI:10.1186/s12985-016-0665-5.

306. *Stewart B.J., Houghton R.L., Morrow WJW, Raychaudhuri S.* Design considerations for immunodiagnosics // *IVD Technology*, 2006, №4: 40–51.

307. *Sun H., Chen G.Y.J., Yao S. Q.* Recent Advances in Microarray Technologies for Proteomics // *Chemistry & Biology*, 2013, 20: 685–699. DOI: 10.1016/j.chembiol.2013.04.009.

308. *Tabatabai L.B.* Developments in diagnostic technologies for bioterrorism agents // *IVD Technology*, 2005, №8: 36–42.

309. *Takagi F., Kurosawa R., Sawaki D. et al.* Pico liter dispenser with 128 independent nozzles for high throughput biochip fabrication // *Mems 2004: 17th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, Technical Digest, New York, USA, 2004: 276–279

310. *Talha S.M., Saviranta P., Hattara L. et al.* Array-in-well platform-based multiplex assay for the simultaneous detection of anti-HIV- and treponemal-antibodies, and Hepatitis B surface antigen // *J. Immunol. Meth.*, 2016, 429: 21–27. DOI: 10.1016/j.jim.2015.12.007.

311. *Tanase CP, Albulescu R, Neagu M.* Application of 3D hydrogel microarrays in molecular diagnostics: Advantages and limitations. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2011, 11: 461–464. DOI: 10.1586/erm.11.30.

312. *Tannapfel A.* Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays // *J. Pathol.*, 2003, 201: 238–249.

313. *Taton T.A., Mirkin C.A., Letsinger R.L.* Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes // *Science*, 2000, 289: 1757–1760.

314. *Taylor R.F.* A phased approach to the development and commercialization of new immunodiagnostic assays. – *IVD Technology*, 2006, №3: 36–40.

315. *Templin M., Stoll D., Schrenk M. et al.* Protein microarray technology // *Drug Discov. Today*, 2002, №7: 815–820.

316. *Thobhani S., Attree S., Boyd R. et al.* Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins // *J. Immunol. Meth.*, 2010, 356: 60–69. DOI: 10.1016/j.jim.2010.02.007
317. *Tighe P.J., Ryder R.R., Todd I., Fairclough L.C.* ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin. Appl.*, 2015, 9: 406–422. DOI: 10.1002/prca.201400130.
318. *Tisone T. C., Citeau H., McIntosh B.* In-line processing trends for lateral-flow immunoassay manufacturing // *IVD Technology*, 2007, №6: 24–32.
319. *Tomizaki K.Y., Usui K., Mihara H.* Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements // *Chembiochem.*, 2005, 6 (5): 782–799. DOI: 10.1002/cbic.200400232.
320. *Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G. et al.* Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens // *J. Virol. Meth.*, 2013, 187: 37–42. DOI:10.1016/j.jviromet.2012.08.023.
321. *Tseng F. G., Kim C. J., Ho C. M.* A high-resolution high-frequency monolithic top-shooting microinjector free of satellite drops-Part I: Concept, design, and model. *Journal of Microelectromechanical Systems* 2002; 11 (5): 427–436.
322. *Urbanek R., Kemeny D.M., Samuel D.* Use of the enzyme linked immunosorbent assay for measurement of specific antibodies // *J. Immunol. Meth.*, 1985, 79: 123–131.
323. *Urbanowska T., Mangialaio S., Zickler C. et al.* Protein microarray platform for the multiplex analysis of biomarkers in human sera // *J. Immunol. Meth.*, 2006, 316: 1–12. DOI: 10.1016/j.jim.2006.03.019.
324. *Van den Berk G.E.* Evaluation of the rapid immunoassay determine HIV 1/2 for detection of antibodies to Human Immunodeficiency Virus types 1 and 2 // *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41: 3868–3869.
325. *Vidal M., Aguilar R., Campol J., Dobaño C.* Development of quantitative suspension array assays for six immunoglobulin isotypes and subclasses to multiple *Plasmodium falciparum* antigens // *J. Immunol. Meth.*, 2018, 455: 41–54. DOI: 10.1016/j.jim.2018.01.009
326. *Voskuhl J., Brinkmann J., Jonkheijm P.* Advances in contact printing technologies of carbohydrate, peptide and protein arrays // *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014, 18: 1–7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.10.022.
327. *Wallin A., Luksiene Z., Zagminas K., Surkiene G.* Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox. *Medicina (Kaunas)*, 2007, 43 (4), 278–284.

328. *Aslam B., Basit M., Nisar M. et al.* Proteomics: Technologies and Their Applications // *J. Chromatogr. Sci.*, 2017, 55 (2): 182–196. DOI: 10.1093/chromsci/bmw167.

329. WHO. Tekhnical Report Series № 800. Guidelines for the preparation, characterization and establishment of international and other standards and reference reagents for biological substances / In: WHO Expert Commettee on Biological Standardization. Fortieth Report., Zheneva, WHO, 1990, Annex 4.

330. WHO, 2009. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. Available from: <http://www.who.int/bloodsafety/ScreeningTTI>.

331. *Wiese R.* Analysis of several fluorescent detector molecules for protein microarray use // *Luminescence*, 2003, 18 (1): 25–30.

332. *Wilchek M., Bayer E.A.* The avidin-biotin complex in immunology // *Immunol. Today*, 1984, 5: 39–43.

333. *Wilson D.S., Nock S.* Recent developments in protein microarray technology // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2003, 42: 494.

334. *Winssinger N., Damoiseaux R., Tully D.C. et al.* PNA-encoded protease substrate microarrays // *Chem. Biol.*, 2004, 11 (10): 1351–1360.

335. *Wicher K., Horowitz H. W., Wicher V.* Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium. Review // *Microbes and Infection*, 1999, 1 (12): 1035–1049.

336. *Whitley R.J.* Smallpox: a potential agent of bioterrorism // *Antiviral Res.*, 2003, 57: 7–12.

337. *Witte K.L., Nock S.* Recent applications of protein arrays in target identification and disease monitoring // *Drug Discovery Today: Technology*, 2004, 1 (1): 35–40.

338. *Wu P., Castner D.G., Grainger D.W.* Diagnostic devices as biomaterials: a review of nucleic acid and protein microarray surface performance issues // *J. Biomaterials Science*, 2008, 19 (6): 725–753. DOI: 10.1163/156856208784522092.

339. *Xia Y.N., Whitesides G.M.* Soft lithography // *Angewandte Chemie-International Edition*, 1998.

340. *Xu R., Gan X., Fang Y., Zheng S., Dong Q.* A simple, rapid, and sensitive integrated protein microarray for simultaneous detection of multiple antigens and antibodies of five human hepatitis viruses (HBV, HCV, HDV, HEV, and HGV) // *Anal. Biochem.*, 2007, 362: 69–75. DOI:10.1016/j.ab.2006.12.008.

341. *Yu Q., Wang Q., Li B. et al.* Technological Development of Antibody Immobilization for Optical Immunoassays: Progress and Prospects // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2015, 45: 62–75. DOI: 10.1080/10408347.2014.881249.
342. *Zhao X. M., Xia Y. N., Whitesides G. M.* Soft lithographic methods for nano-fabrication // *J. Mat. Chem.*, 1997, 7 (7): 1069–1074.
343. *Zhou X., Zhou J.* Protein microarrays on hybrid polymeric thin films prepared by self-assembly of polyelectrolytes for multiple-protein immunoassays // *Proteomics*, 2006, 6 (5): 1415–1426. DOI: 10.1002/pmic.200500138.
344. *Zhu H., Klemic J.F., Chang S. et al.* Analysis of yeast protein kinases using protein chips // *Nat. Genet.*, 2000, 26: 283–288.
345. *Zhu H., Bilgin M., Bangham R. et al.* Global analysis of protein activities using proteome chips // *Science*, 2001, 293: 2101–2105.
346. *Zhu, H., Snyder, M.* Protein chip technology // *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, 7 (1): 55–63.

Обозначения и сокращения

БОЕ	бляшкообразующая единица
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВГВ, HBV	вирус гепатита В
ВГС, HCV	вирус гепатита С
ВИЧ, HIV	вирус иммунодефицита человека
ВНО	вируса натуральной оспы
ВОВ	вирусом осповакцины
ВОЗ (WHO)	Всемирная Организация Здравоохранения
ВОК	вирус оспы коров
ВОО	вирус оспы обезьян
ГТИ	гемотрансмиссивные инфекции
ДАБ (DAB)	диаминобензидин
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБ	иммунный блоттинг
ИФА	иммуноферментный анализ
КТ	квантовые точки
МЕ	международная единица
ОПВ	ортопоксвирусы
ОС	оптический сигнал
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПВХ	поливинилхлорид
ПХ	пероксидаза хрена
ПЭГ	полиэтиленгликоль
РБРК	буферный раствор для разведения конъюгата
РБРО	буферный раствор для разведения образца
РНК	рибонуклеиновая кислота
СПИД	синдром приобретенного иммунодефицита
ФСБ-Т	фосфатно-солевой буферный раствор с твин
ЦМВ, CMV	цитомегаловирус человека
ЦМВИ	цитомегаловирусная инфекция
ШВП	шарико-винтовая пара

ЩФ	щелочная фосфатаза
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
CARD	catalyzed reporter deposition
CN	4-хлор-1-нафтол
Fab	фрагмент антитела, связывающий антиген
Fc	фрагмент антитела константный
HBs-Ag	поверхностный антиген вируса гепатита В
IgA	иммуноглобулины класса А
IgD	иммуноглобулины класса D
IgE	иммуноглобулины класса E
IgG	иммуноглобулины класса G
IgM	иммуноглобулины класса M
NBT	nitroblue tetrazolium chloride
NABP/FR	Naphtol-AS-BI-phosphate/fast red TR
NAMP/ FB	Naphthol-AS-MX-phosphate/fast blue BB
PDMS	полидиметилсилоксан
pI	изоэлектрическая точка
SDS	додecilсульфат натрия
SpA	<i>Staphylococcal protein A</i>
SpG	<i>Streptococcal protein G</i>
SSA	сульфосалициловая кислота

Научное издание

Полтавченко Александр Георгиевич
Ерш Анна Васильевна
Филатов Павел Владимирович
Ушкаленко Никита Дмитриевич

**МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗ
В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Монография

Чебоксары, 2022 г.

Ответственный редактор *А.Г. Полтавченко*
Компьютерная верстка *Е.В. Кузнецова*
Дизайн обложки *ООО «ИМБИАН ЛАБ»*

Подписано в печать 08.09.2022 г.

Дата выхода издания в свет 20.09.2022 г.

Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Гарнитура Times. Усл. печ. л. 13,02. Заказ К-1026. Тираж 500 экз.

Издательский дом «Среда»
428005, Чебоксары, Гражданская, 75, офис 12
+7 (8352) 655-731
info@phsreda.com
<https://phsreda.com>

Отпечатано в Студии печати «Максимум»
428005, Чебоксары, Гражданская, 75
+7 (8352) 655-047
info@maksimum21.ru
www.maksimum21.ru