

На правах рукописи



Сотников Дмитрий Васильевич

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ
МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ:
КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ
И ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ**

Специальность 03.01.04 Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории иммунобиохимии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Научные руководители: доктор химических наук, профессор
Дзантиев Борис Борисович,

кандидат биологических наук
Жердев Анатолий Виталиевич

Официальные оппоненты: **Горячева Ирина Юрьевна**
доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», химический факультет, профессор кафедры общей и неорганической химии

Ярков Сергей Петрович

доктор биологических наук, Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения", начальник отдела спектральных методов анализа

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Защита состоится «13» декабря 2016 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «___» октября 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Иммунохимические тест-системы широко используются в медицине и ветеринарии, позволяя достоверно установить наличие в биоматериале как антигенов инфекционного агента, так и специфических антител к ним. В современной медицинской практике преобладающей тенденцией является опережающее расширение сектора point-of-care (POC) диагностики – при первичном обследовании поступившего больного, визите врача на дом, самодиагностике. За последние 7 лет доля средств POC диагностики на мировом рынке выросла в три раза за счет снижения доли анализов, выполняемых лабораториями. Внедрение в массовую практику экспрессных диагностических тест-систем и организация их импортозамещающего производства рассматриваются как приоритетные задачи развития отечественного здравоохранения.

Для ряда болезней основой постановки диагноза является серодиагностика – выявление в организме специфических антител к возбудителю заболевания. Особенно перспективна для массового использования серодиагностика в формате иммунохроматографического анализа (ИХА), который не требует оборудования, высокой квалификации персонала, может проводиться во внелабораторных условиях и позволяет получать результат за 10-15 мин. Экспрессность и методическая простота ИХА определили широкое распространение данного метода.

Следует отметить, однако, сложность применения ИХА для серодиагностики. Одним из главных ограничивающих факторов является необходимость определения специфических антител в присутствии избытка (два порядка и более) неспецифических иммуноглобулинов. При этом требования экспрессности и простоты обуславливают одностадийное проведение ИХА без разделения реагентов. По этой причине серодиагностика многих заболеваний методом ИХА остается малоэффективной.

Высокая степень востребованности в медицине и ветеринарии систем экспрессного определения специфических антител, а также необходимость совершенствования существующих методов иммунохроматографической серодиагностики определяют актуальность диссертационной работы.

Используемые сокращения и обозначения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ИФА – иммуноферментный анализ; ИХ – иммунохроматографический(ая); ИХА – иммунохроматографический анализ; КЗ – коллоидное золото; КРС – крупный рогатый скот; ЛПС – липополисахарид; СИТ – соевый ингибитор трипсина; IgG – иммуноглобулин G; hlgG – иммуноглобулины G человека; slgG – иммуноглобулины G овцы; RAHlss – кроличьи антитела против иммуноглобулинов G человека; P-MAHlss – меченные пероксидазой антитела мыши против иммуноглобулинов G человека.

Степень разработанности темы исследования

Иммунохроматографический анализ, несмотря на отмеченные выше достоинства, по чувствительности и диагностической эффективности часто уступает альтернативным методам. Это обуславливает потребность в новых подходах, позволяющих улучшить характеристики ИХА и, таким образом, повысить достоверность серодиагностики. Существующие протоколы оптимизации ИХА предполагают проведение большого количества экспериментов для выбора оптимального состава тест-систем. Общие теоретические представления о функционировании таких систем, которые позволили бы унифицировать их разработку, на сегодняшний день отсутствуют.

Целью диссертационной работы являлось изучение факторов, влияющих на параметры систем иммунохроматографической серодиагностики, математическое описание данных систем и применение установленных закономерностей для повышения чувствительности серодиагностики.

Достижение поставленной цели включало решение следующих **задач**:

- разработку методики определения состава используемых в иммунохроматографической серодиагностике конъюгатов маркера, коллоидного золота, с белковыми молекулами;
- определение состава конъюгатов, обеспечивающего связывание максимально возможного количества иммуноглобулинов;
- разработку методики определения функциональной активности рецепторных молекул в составе конъюгатов с коллоидным золотом;
- математическое описание кинетики формирования иммунных комплексов в иммунохроматографических (ИХ) системах;
- разработку математических моделей функционирования систем ИХ-серодиагностики;
- разработку рекомендаций по улучшению чувствительности ИХ-серодиагностики на основании анализа предложенных моделей;
- разработку и апробацию систем ИХ-серодиагностики на примерах определения антител против антигенов двух возбудителей экономически и социально значимых заболеваний: бруцеллеза крупного рогатого скота и легочного туберкулеза людей;
- создание тест-систем ИХ-серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и легочного туберкулеза людей с использованием рекомендаций, полученных при анализе разработанных моделей.

Научная новизна работы

Впервые предложены математические модели иммунохроматографической серодиагностики и новые методические решения для улучшения аналитических параметров тест-систем.

Разработаны методики определения состава конъюгатов коллоидного золота с рецепторными молекулами и определения степени сохранения

функциональных свойств рецепторных молекул после иммобилизации на поверхность коллоидного золота. С использованием разработанных методик получены новые данные о механизме формирования белковых оболочек вокруг частиц коллоидного золота.

Предложены оригинальные схемы ИХА, позволяющие улучшить чувствительность серодиагностики. Экспериментально подтверждена эффективность этих подходов для определения специфических антител.

Практическая значимость работы

Разработаны системы иммунохроматографической серодиагностики легочного туберкулеза людей и бруцеллеза крупного рогатого скота. Рекомендации по повышению диагностической эффективности тест-систем имеют общий характер и могут применяться при разработке других систем иммунохроматографической серодиагностики.

Разработаны новые подходы к определению состава и связывающей способности конъюгатов коллоидного золота с рецепторными молекулами. Установленные закономерности иммобилизации белков на коллоидном золоте позволяют повысить аналитическую эффективность получаемых конъюгатов.

Предложенные математические модели дают возможность оценить влияние различных факторов на характеристики тест-систем и дать общие рекомендации для разработки иммунохроматографического анализа специфических антител.

Положения, выносимые на защиту

- Определение состава конъюгатов коллоидного золота с белками, основанное на измерении флуоресценции триптофановых остатков.
- Определение степени сохранения функциональной активности антител после сорбции на коллоидном золоте.
- Закономерности влияния рН иммобилизации белка на коллоидном золоте на процесс сорбции и количество сорбируемых молекул.
- Математические модели функционирования иммунохроматографических систем для серодиагностики в неравновесных условиях протекания иммунохимических реакций.
- Новые методики иммунохроматографического определения специфических антител.
- Иммунохроматографические тест-системы для определения специфических антител против антигена Rv0934 *Mycobacterium tuberculosis* и липополисахарида *Brucella abortus*.

Связь работы с государственными программами

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение о предоставлении субсидии № 14.613.21.0040).

Личный вклад диссертанта заключался в проведении научных экспериментов, разработке и анализе моделей, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных мероприятиях: II Международная научная конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (8–10 октября 2008 г., Ростов-на-Дону); II Международная конференция «Астана Биотех 2011» (10–11 октября 2011 г., Астана, Казахстан); VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (18–20 марта 2014 г.), Москва; VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (17–20 марта 2015 г., Москва); V Съезд биофизиков России (4–10 октября 2015 г., Ростов-на-Дону).

Диссертационная работа представлена 27 сентября 2016 г. на межлабораторном семинаре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Публикации по материалам диссертационной работы включают 11 статей в российских и иностранных журналах и 5 тезисов конференций; получено 7 российских и иностранных патентов на изобретения.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы (190 источников). Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 56 рисунков и 8 таблиц.

В первой главе представлен анализ литературных данных, описывающих общие закономерности иммунохроматографии; способы получения и характеристики основного маркера в ИХА – коллоидного золота; измерения констант иммунохимических взаимодействий; математическое моделирование взаимодействий иммунореагентов в ИХ-тестах; средства диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и туберкулеза людей.

Во второй главе приведены сведения о реагентах и материалах, используемых в работе. Изложены методики иммуноферментного анализа (ИФА) специфических антител в сыворотках, синтеза КЗ и его конъюгатов с белками, определения состава конъюгатов КЗ–белок методом флуоресцентной спектроскопии, определения связывающей способности иммобилизованных на КЗ антител, определения кинетических и равновесных параметров иммунного взаимодействия, изготовления иммунохроматографических тест-систем и проведения ИХА специфических антител.

В третьей главе представлены результаты и обсуждение экспериментов по получению и характеристике КЗ и его конъюгатов

с белками, количественному описанию взаимодействий антиген–антитело, разработке и апробации различных форматов ИХ определения специфических антител. Также представлены результаты разработки и анализа математических моделей ИХ серодиагностики.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез и определение размерных характеристик коллоидного золота

С использованием различных концентраций восстановителя, цитрата натрия, синтезированы три препарата коллоидного золота. Их размерные характеристики оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Установлено (табл. 1), что средние диаметры частиц в синтезированных препаратах КЗ составляли около 20, 24 и 48 нм.

Таблица 1. Характеристика размеров и гомогенности препаратов коллоидного золота.

Препарат	Длина большей оси, нм	Длина меньшей оси, нм	Средний диаметр	Соотношение осей	Размер выборки, шт.
№1	22,4±4,1	18,5±2,9	20,4±3,5	0,81	112
№2	26,3±3,2	21,6±2,7	23,9±3,0	0,83	57
№3	54,0±7,1	40,1±5,5	47,6±6,3	0,74	117

Получение конъюгатов коллоидного золота с белками

В качестве объектов исследования были выбраны четыре белка: иммуноглобулин G человека (hIgG), бычий сывороточный альбумин (БСА), белок G из *Streptococcus* spp. (белок G) (рекомбинантный мутант, состоящий из трех IgG-связывающих фрагментов) и соевый ингибитор трипсина Kunitz-типа (СИТ). Этот выбор обусловлен структурным разнообразием данного ряда белков и их частым использованием в иммунохимии. Белки конъюгировали с КЗ со средним диаметром частиц 24 нм.

Разработка методики определения состава конъюгатов белок–коллоидное золото по собственной флуоресценции белка

Предлагаемая методика определения состава конъюгатов основана на сравнении исходной флуоресценции калибровочных растворов белков (F_0) и остаточной флуоресценции реакционных растворов после отделения синтезированных конъюгатов (F). Разность этих двух величин (ΔF) пропорциональна количеству белка в составе конъюгата:

$$C_k = C_0 \cdot \Delta F / F_0, \quad (1)$$

где C_0 – добавленная концентрация белка, C_k – концентрация белка, связанного с КЗ, в растворе.

Схема опыта, приведенная на рис. 1, позволяет в максимально близких условиях измерять флуоресценцию белка в калибровочных растворах и в надосадочной жидкости. Поскольку флуоресценция триптофана зависит от большого числа факторов, в том числе от состава ближайшего окружения, на ее величину могут существенно повлиять даже небольшие изменения ионного состава раствора и конформации белка.

После синтеза конъюгатов и отделения конъюгированного КЗ центрифугированием отбирали аликвоты надосадочной жидкости и помещали их в лунки микропланшета. В лунки того же микропланшета помещали калибровочные растворы и измеряли спектры флуоресценции. На основании полученных спектров строили зависимости между концентрацией добавленного белка и интенсивностями флуоресценции при 350 нм исследуемых проб и калибровочных растворов.

Экспериментально показано, что для низких концентраций белка при синтезе (до 8 мкг/мл) концентрация несвязанных с КЗ белковых молекул ниже предела обнаружения метода (0,5 мкг/мл), то есть практически весь добавленный белок сорбируется на поверхности частиц. При увеличении концентраций добавленных белков зависимости флуоресценции для проб и калибровочных растворов становятся параллельны друг другу, что свидетельствует о достижении насыщения сайтов сорбции.

Исходя из разности флуоресценции при 350 нм в калибровочных растворах и пробах и данных о содержании частиц КЗ в реакционной среде, вычисляли количество молекул белка на одной частице согласно формуле:

$$RL = \frac{(F_0 - F) \times [L_0]}{F_0 \times [R_0]}, \quad (2)$$

где RL – количество молекул белка, связанного с частицей золота, F_0 – флуоресценция калибровочного раствора, F – флуоресценция надосадочной жидкости после центрифугирования синтезированного конъюгата, $[L_0]$ – молярная концентрация добавленного белка, $[R_0]$ – молярная концентрация частиц золота.

Полученные зависимости количества молекул белков, сорбированных на одной частице КЗ, от исходных концентраций белков представлены на рис. 2.

Константы взаимодействия белков с КЗ определяли, используя уравнение Скетчарда:

$$\frac{RL}{[L]} = \frac{1}{K_D} \times N - \frac{1}{K_D} \times RL, \quad (3)$$

где $[L]$ – молярная концентрация свободного белка, RL – количество молекул белка, связанных с частицей КЗ, K_D – равновесная константа диссоциации комплекса белок–КЗ, N – количество центров связывания на одной частице КЗ.

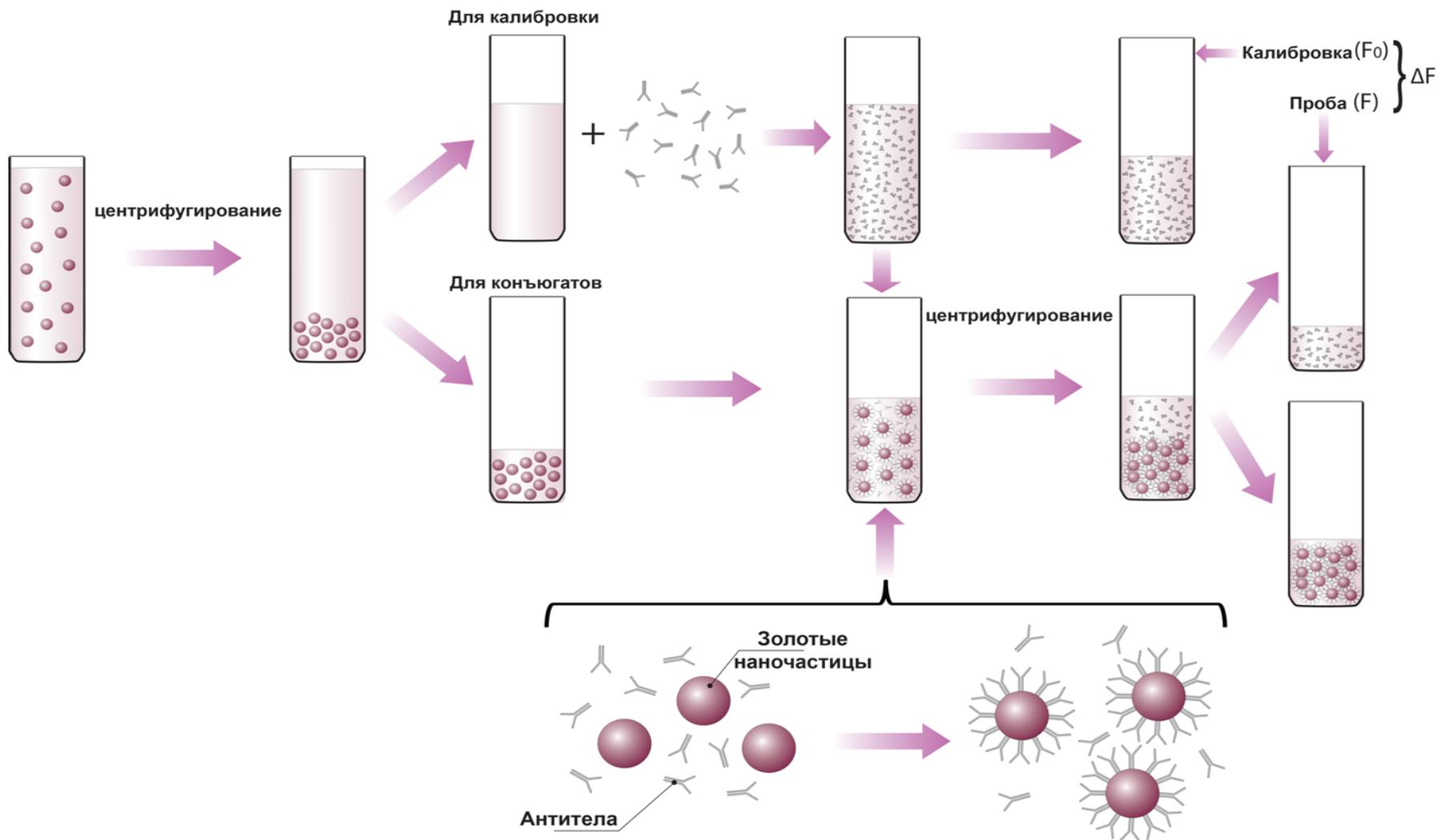


Рис. 1. Схема определения состава конъюгатов КЗ с белком (на примере IgG). F_0 – флуоресценция калибровочных растворов, F – флуоресценция надосадочной жидкости после центрифугирования синтезированных конъюгатов, $\Delta F = F_0 - F$.

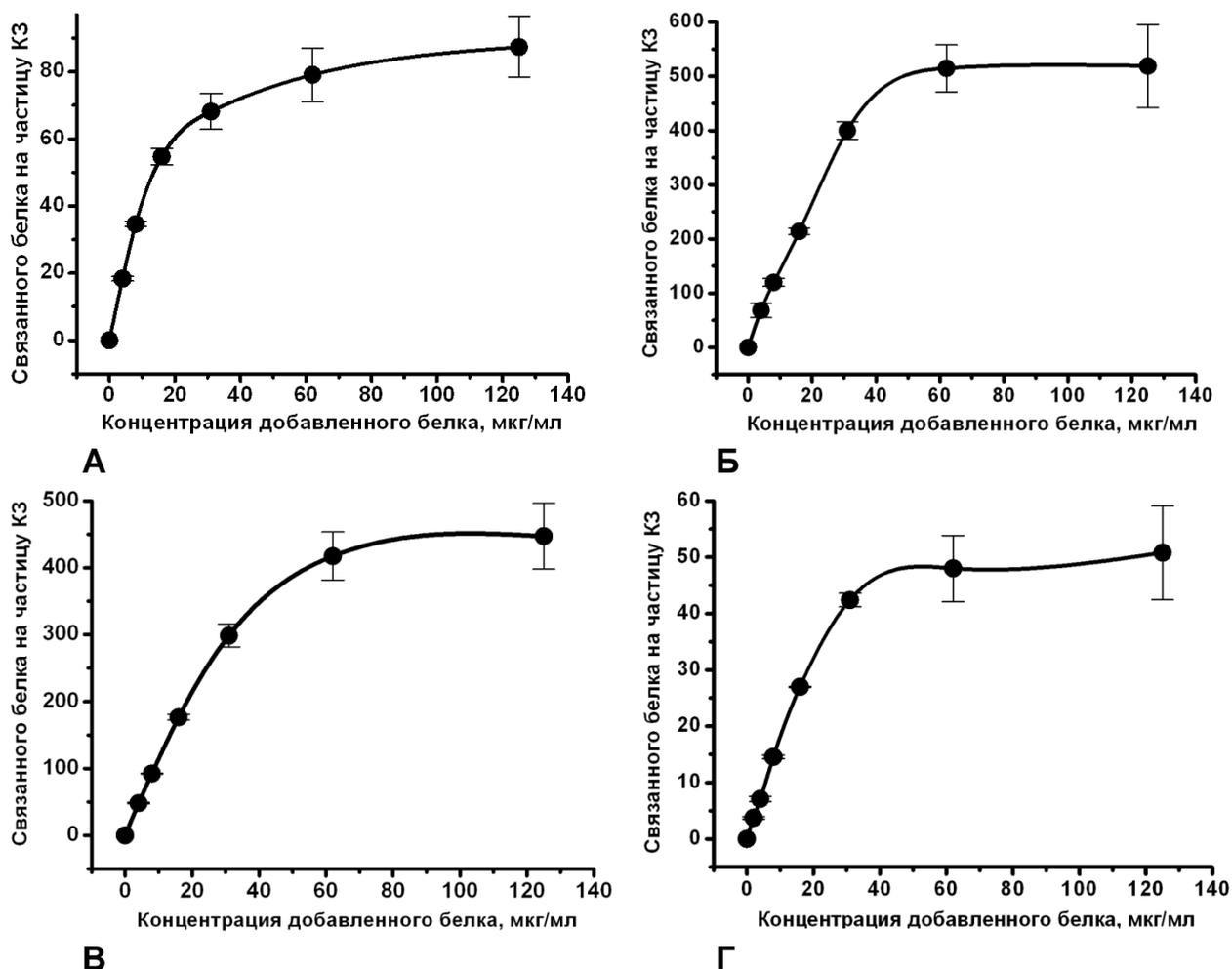


Рис. 2. Зависимости количества молекул белков, сорбированных на одной частице КЗ, от концентрации белков при синтезе: А – для БСА; Б – для СИТ; В – для белка G; Г – для IgG.

Для численной характеристики прочности связывания вычисляли значения усредненной равновесной константы диссоциации: 1) для концентраций, значительно ниже насыщающих ($K_d^{(1)}$), и 2) для концентраций, близких к насыщающим ($K_d^{(2)}$). Также было рассчитано максимальное количество центров связывания (N). Все полученные величины суммированы в табл. 2.

Таблица 2. Параметры сорбции белков на КЗ.

Белок	MW (кДа)	1/MW (кДа ⁻¹)	$K_d^{(1)}$ (нМ)	$K_d^{(2)}$ (нМ)	N
IgG	150	0,0067	4	30	52
БСА	66	0,0151	6	76	90
Белок G	26	0,0384	10	175	500
СИТ	20	0,0498	15	100	550

Результаты определения количества адсорбированных молекул БСА на КЗ со средними диаметрами 20, 24 и 48 нм в зависимости от рН продемонстрировали, что смещение рН среды иммобилизации от кислых значений к щелочным сопровождается изменением механизма сорбции белка на поверхности КЗ. Если при кислых рН эффективное связывание БСА частицами происходит во всем диапазоне концентраций белка, то при щелочных рН – только при концентрациях больше 10 мкг/мл. В диапазонах концентраций БСА ~1–80 мкг/мл (для КЗ 20 нм), ~1–60 мкг/мл (для КЗ 24 нм), ~1–25 мкг/мл (для КЗ 48 нм) в кислых растворах (рН 3,7–5,8) на КЗ сорбируется больше БСА, чем в щелочных, а при более высоких концентрациях белка – наоборот. В щелочных растворах не наблюдается насыщения поверхности даже при концентрации БСА 250 мкг/мл, тогда как для кислых растворов насыщение наступает при концентрациях около 60 мкг/мл (для КЗ 20 и 24 нм) и 16 мкг/мл (для КЗ 48 нм). Исходя из данных о размерах белковых молекул (из базы pdb) можно предположить, что в кислых растворах белки сорбируются на КЗ до заполнения монослоя. Увеличение максимального количества сорбированного белка при повышении рН может означать, что в щелочных растворах на частице КЗ происходит полислойная иммобилизация белка.

Определение методом ИФА степени сохранения связывающей способности антител после конъюгирования с КЗ

Поскольку не все сорбированные белковые молекулы сохраняют функциональные свойства, была предложена методика определения связывающей способности антител после конъюгирования с коллоидным золотом. Разработку методики проводили, исследуя взаимодействия модельной пары: иммуноглобулины G человека и иммуноглобулины G овцы против иммуноглобулинов G человека (hIgG – sIgG).

Схема предложенной методики представлена на рис. 3. Конъюгат КЗ с антителами против иммуноглобулинов человека инкубировали с иммуноглобулинами человека. После этого конъюгат КЗ со связанными антителами человека отделяли центрифугированием, и в надосадочной жидкости методом ИФА определяли концентрацию свободных иммуноглобулинов человека.

ИФА проводили следующим образом. В лунках микропланшета сорбировали кроличьи антитела против иммуноглобулинов G человека (RAH1ss). Микропланшет отмывали и добавляли в часть лунок надосадочную жидкость после центрифугирования конъюгатов, в другую часть – калибровочные растворы hIgG. После инкубации повторно отмывали микропланшет и добавляли меченные пероксидазой антитела мыши против иммуноглобулинов G человека (P-MAH1ss). После инкубации и отмывки в лунках микропланшета определяли содержание тройных

комплексов RANlss – hlgG – P-MAHlss, фотометрически регистрируя каталитическую активность иммобилизованной пероксидазы. Далее вычисляли концентрацию hlgG в надосадочной жидкости, сравнивая окрашивание продукта окисления субстрата в лунках с надосадком и с калибровочными растворами.

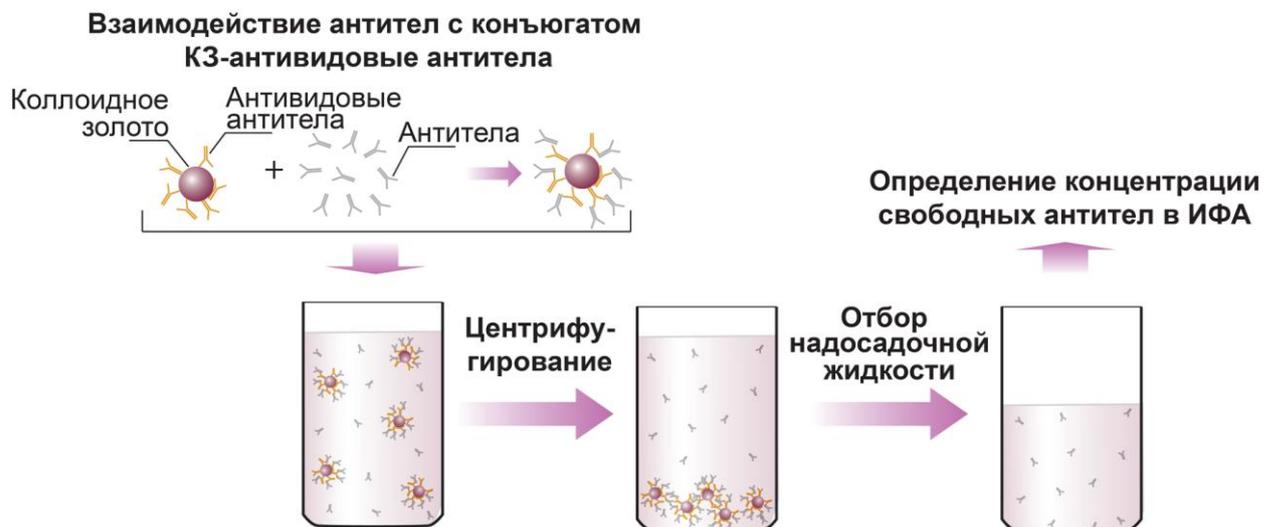


Рис. 3. Схема определения количества активных связывающих центров иммобилизованного белка на маркерном конъюгате.

Полученные результаты для разных исходных концентраций hlgG представлены в табл. 3. В точке насыщения (добавленная концентрация hlgG – 50,0 мкг/мл) соотношение концентраций hlgG, связавшихся с конъюгатом, и slgG, иммобилизованных на КЗ, равно 0,24. При этом, поскольку IgG имеют по 2 валентности, потенциально каждая молекула slgG могла бы связать по 2 молекулы hlgG, то есть заняты лишь 12% валентностей.

Таблица 3. Концентрации hlgG в надосадочных жидкостях после центрифугирования конъюгатов и рассчитанные концентрации hlgG, связавшиеся с конъюгатом slgG–КЗ.

Добавленная концентрация hlgG, мкг/мл	Концентрация hlgG в надосадке, мкг/мл	Рассчитанная концентрация hlgG, связанных с конъюгатом slgG–КЗ, мкг/мл
5,0	0,9	4,1
10,0	5,6	4,4
30,0	20,3	9,7
50,0	40,0	10,0

Определение кинетических и равновесных параметров взаимодействий антиген-антитело

Для определения параметров иммунных взаимодействий был использован метод поверхностного плазменного резонанса, реализованный в биосенсорной системе *Biacore*. Характеристику взаимодействий проводили для пары: антиген Rv0934 *M. tuberculosis* и моноклональные антитела НТМ81 против данного антигена. Антитела НТМ81 использовали в качестве модельного анализатора для калибровки и определения характеристик разрабатываемых иммунохроматографических тест-систем.

Для исследуемой пары антиген–антитело регистрировали приведенные на рис. 4 сенсограммы взаимодействий при концентрациях антигена от 0,5 до 50,0 мкг/мл. На основании данных сенсограмм рассчитывали параметры иммунохимической реакции, представленные в табл. 4.

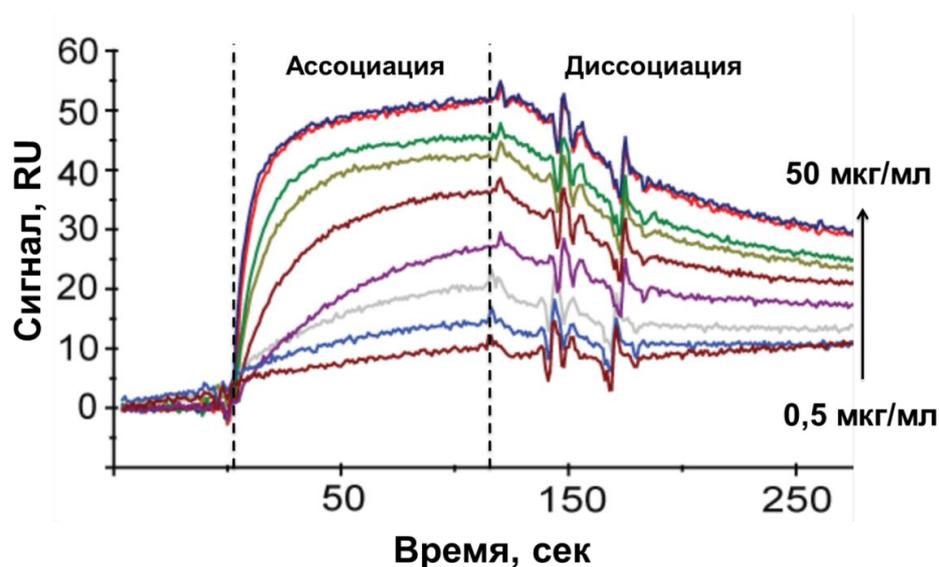


Рис. 4. Сенсограммы взаимодействия антигена Rv0934 *M. tuberculosis* с модифицированной антителами НТМ81 поверхностью чипа CM5. Концентрации антигена 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 мкг/мл. Пунктирными линиями показаны начало и конец временного интервала протекания растворов антигена через сенсорную ячейку.

Таблица 4. Кинетические и равновесные константы взаимодействия антигена Rv0934 *M. tuberculosis* с моноклональными антителами НТМ81

	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_a (1/М)	K_d (М)
Значение	$3,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^{-3}$	$7,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^{-8}$
Стандартное отклонение	$0,3 \times 10^5$	$0,2 \times 10^{-3}$	$0,4 \times 10^7$	$0,1 \times 10^{-8}$

Разрабатываемые схемы иммунохроматографического анализа

ИХА для серодиагностики может быть реализован в различных вариантах, которые отличаются порядком формирования комплексов

на иммунохроматографических мембранах и, соответственно, составом окрашенных комплексов в аналитических зонах тест-систем (рис. 5). В нашей работе были использованы три схемы ИХ-серодиагностики, в том числе две предложенные новые схемы.

При реализации стандартной схемы ИХ-серодиагностики (схема А) на мембране формируются детектируемые комплексы из иммобилизованных молекул антигена, специфических антител из пробы и конъюгата КЗ с иммуноглобулин-связывающим белком (антивидовыми антителами или белками А/Г). В схеме Б порядок формирования детектируемого комплекса инвертируется: КЗ конъюгировано с антигеном, а на мембране сорбирован иммуноглобулин-связывающий белок. В схеме В один и тот же антиген сорбирован на поверхность коллоидного маркера и на мембрану, а детектируемые комплексы формируются благодаря наличию у антител нескольких валентностей.

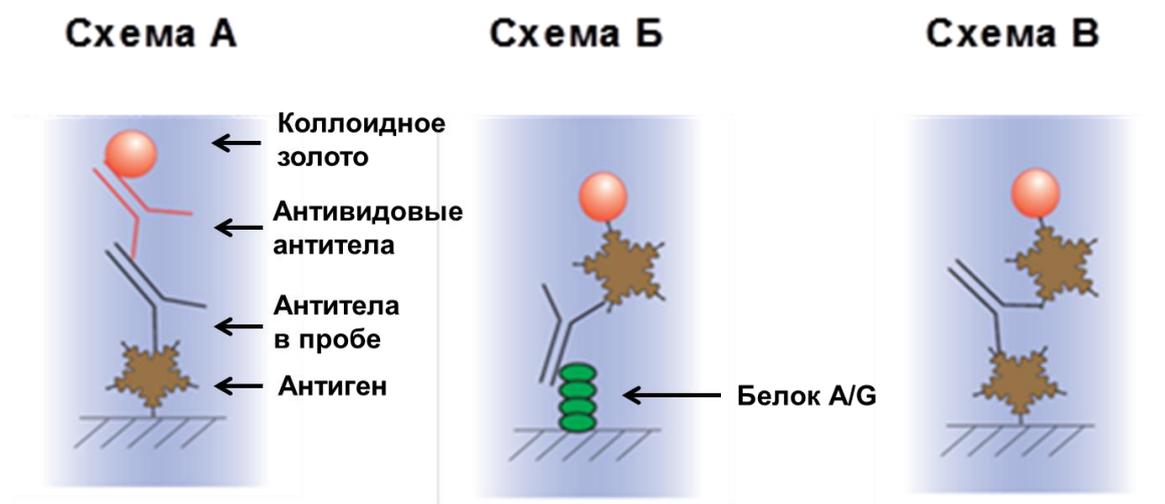


Рис. 5. Состав окрашенных комплексов, формируемых в аналитической зоне для трех схем ИХ-серодиагностики. А – традиционная схема; Б – схема с обратной последовательностью формирования детектируемых комплексов; В – схема с использованием поливалентности антител.

Моделирование систем определения специфических антител

Условные обозначения: А – иммуноглобулины в пробе; Р – центры связывания иммуноглобулинов на частицах коллоидного маркера; R – рецептор (антиген) в аналитической зоне для связывания специфических иммуноглобулинов; AP – комплекс иммуноглобулинов с иммуноглобулин-связывающим белком на частице коллоидного маркера; AR – комплекс специфических иммуноглобулинов с рецептором (антигеном) в аналитической зоне; APR – комплекс специфических иммуноглобулинов с частицами коллоидного маркера и рецептором в аналитической зоне; K_{ai} – равновесная константа ассоциации i-й реакции; k_{ai} – кинетическая константа ассоциации i-й реакции; k_{di} – кинетическая константа диссоциации i-й реакции; t – время анализа от начала реакции иммуноглобулинов с колло-

идным конъюгатом; t_1 – время реакции в аналитической зоне; T – разность между t и t_1 ; x – доля специфических иммуноглобулинов в общем пуле иммуноглобулинов тестируемой пробы.

Для построения модели необходимо ввести ряд положений, отраженных на рис. 6:

- 1 В системе выделяются участок до аналитической зоны и собственно аналитическая зона. Вещества равномерно мигрируют вместе с потоком жидкости в направлении аналитической зоны.

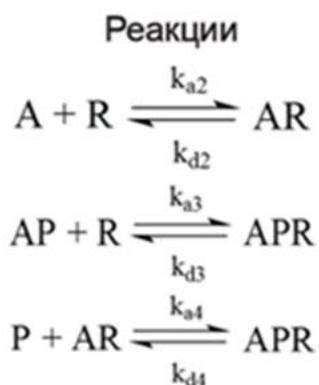
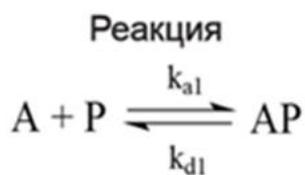
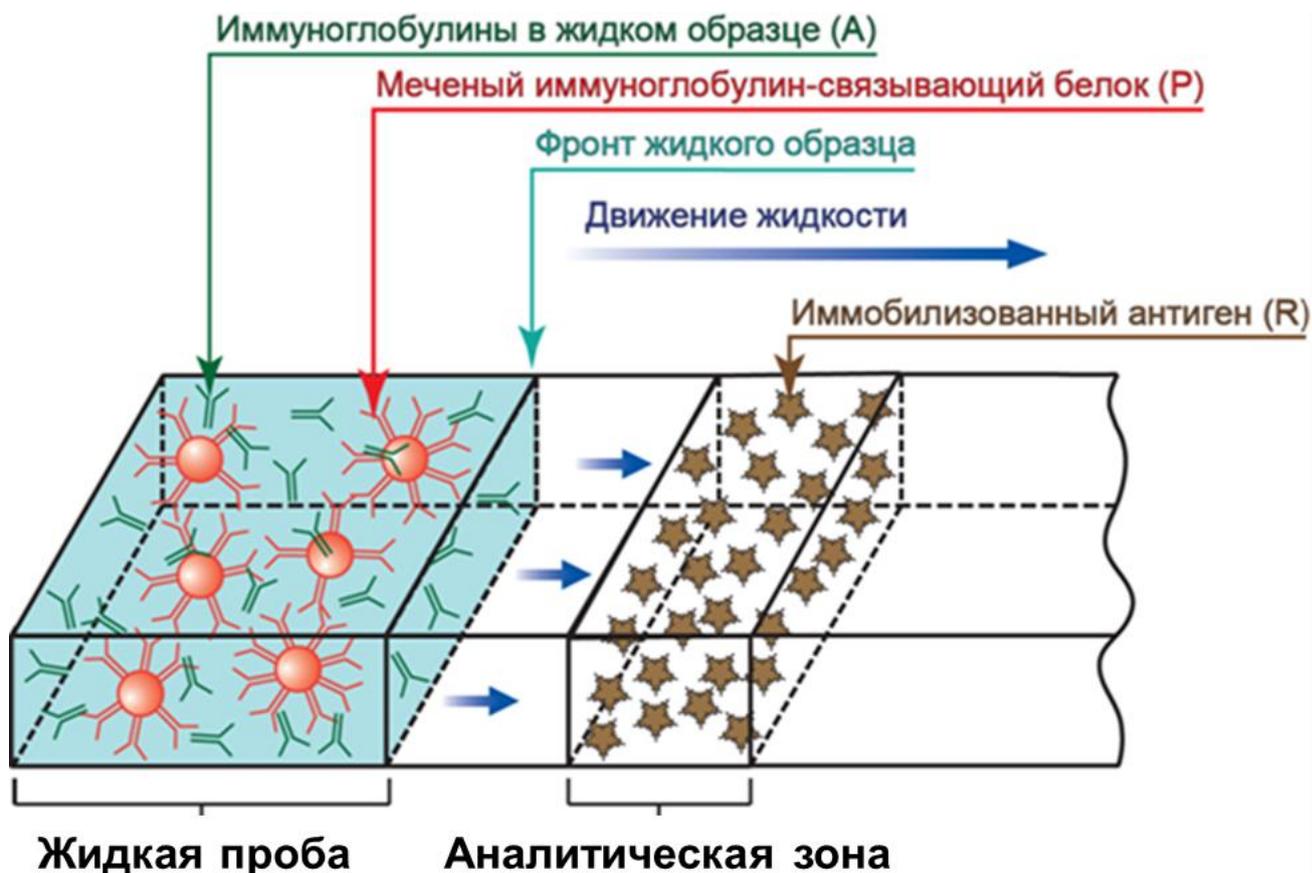
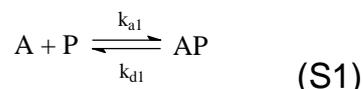


Рис. 6. Упрощенная схема иммунохроматографической системы.

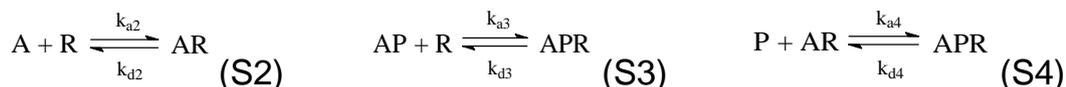
- 2 Анализ подразделяется на три стадии: 1) иммуноглобулины в пробе взаимодействуют с коллоидным конъюгатом, но фронт жидкости еще не достиг аналитической зоны; 2) взаимодействия в аналитической зоне между иммуноглобулинами, антигеном и коллоидным конъюгатом; 3) коллоидный конъюгат полностью протекает через аналитическую зону, образование в ней новых окрашенных комплексов становится невозможным, и происходит только их диссоциация.
- 3 В системе имеются два реакционных объема: объем движущейся жидкой пробы и объем аналитической зоны. Реагенты А и Р равномерно распределены в объеме жидкой пробы, а реагент R равномерно распределен в аналитической зоне. Граница аналитической зоны проницаема для реагентов А и Р и их комплекса AP, но непроницаема для реагента R и его комплексов AR и APR. Равномерное распределение реагентов в пределах реакционных объемов позволяет рассматривать процессы как гомогенные.
- 4 Не учитывается образование комплексов антигенных молекул с двумя и более валентностями антител, а также возможность связывания нескольких частиц маркерного конъюгата с одним антителом (эти процессы минорны вследствие стерических ограничений).
- 5 Все антитела в пробе характеризуются одной усредненной аффинностью по отношению к антигену. Аффинность центров связывания антител на маркерном конъюгате также одинакова.

Реакции, протекающие в ИХ-системе

При движении жидкости вдоль тест-полоски на первой стадии происходит взаимодействие определяемых антител с конъюгатом коллоидного маркера, которое описывается схемой:



После достижения фронтом жидкости аналитической зоны начинаются также реакции с иммобилизованным рецептором, описываемые схемами:



При этом компоненты R, AR, APR иммобилизованы в аналитической зоне, а компоненты А и AP протекают через нее (см. рис. 6).

Сигнал в аналитической зоне пропорционален [APR]. При рассмотрении стандартной схемы ИХ-серодиагностики расчеты дают следующую зависимость для [APR]:

$$[APR] = \frac{k_{a3}[P]_0[R]_0x}{q} \left(\frac{k_{a2}x[A]_0(e^{-qt_1} - e^{-pt_1})}{p - q} - \frac{k_{d2}(e^{-pt_1} - 1)}{p} \right) \quad (4)$$

где $p = k_{d3} + k_{d4}$, $q = k_{a2} \cdot x \cdot [A]_0 + k_{d2}$.

Уравнение (4) позволяет анализировать влияние различных параметров: констант ассоциации/диссоциации, концентраций исходных

реагентов ($[P]_0$, $[R]_0$, $[A]_0$) и доли специфических иммуноглобулинов (x) на сигнал в ИХА и, как следствие, на характеристики тестов.

Если $k_d < 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, то за время проведения анализа (до 10 мин) диссоциацией можно пренебречь и считать реакцию образования комплекса APR необратимой. Тогда кинетика образования APR будет определяться значением кинетической константы ассоциации, и уравнение (4) упрощается до:

$$[APR] = \frac{k_{a3}[P]_0[R]_0}{k_{a2}[A]_0} (1 - e^{-k_{a2}x[A]_0t_1}) \quad (5)$$

Зависимость (5) можно использовать для оценки функционирования ИХ-тестов при значениях кинетических констант диссоциации комплекса антиген–антитело менее 10^{-4} с^{-1} .

Из уравнений (4) и (5) видно, что сигнал аналитической системы при избыточной концентрации иммуноглобулинов в пробе пропорционален $[P]_0$ и $[R]_0$. Поэтому для достижения высокого сигнала следует использовать максимальные концентрации компонентов, связывающих иммуноглобулины. Рост этих концентраций лимитирован сорбционной емкостью коллоидного маркера, агрегацией частиц маркерного конъюгата при концентрировании, впитывающей способностью подложки под конъюгат (для $[P]_0$) и сорбционной емкостью рабочей мембраны (для $[R]_0$).

Зависимость сигнала от концентрации $[A]_0$, рассчитанная по формуле (4), имеет менее очевидный характер: $[APR]$ экспоненциально уменьшается при увеличении $[A]_0$ в диапазоне от 10^{-5} М и выше (при меньших значениях $[A]_0$ нарушаются допущения, введенные при разработке модели). Причиной уменьшения $[APR]$ с ростом $[A]_0$ является то, что конъюгат маркера (P) способен связать лишь небольшую долю иммуноглобулинов (A) в пробе, если проба предварительно не разбавляется более чем на два порядка. Связанные и несвязанные с маркером молекулы специфических иммуноглобулинов после достижения аналитической зоны конкурируют за взаимодействие с иммобилизованным рецептором. Поэтому уменьшение $[A]_0$ приводит к ослаблению влияния конкурента и увеличению сигнала.

Для проверки данного утверждения был проведен модельный опыт по выявлению специфических антител против ЛПС *Brucella abortus*. В качестве пробы была использована пулированная сыворотка крови зараженных *B. abortus* коров с нормированным содержанием специфических антител, равным 1000 МЕ (национальный стандарт).

Результаты тестирования, представленные на рис. 7, подтверждают выдвинутую гипотезу. Максимальное окрашивание аналитической зоны достигается при разбавлении сыворотки в 100 раз. Большее разбавление сыворотки приводит к отклонению от представленной зависимости и не описывается моделью.

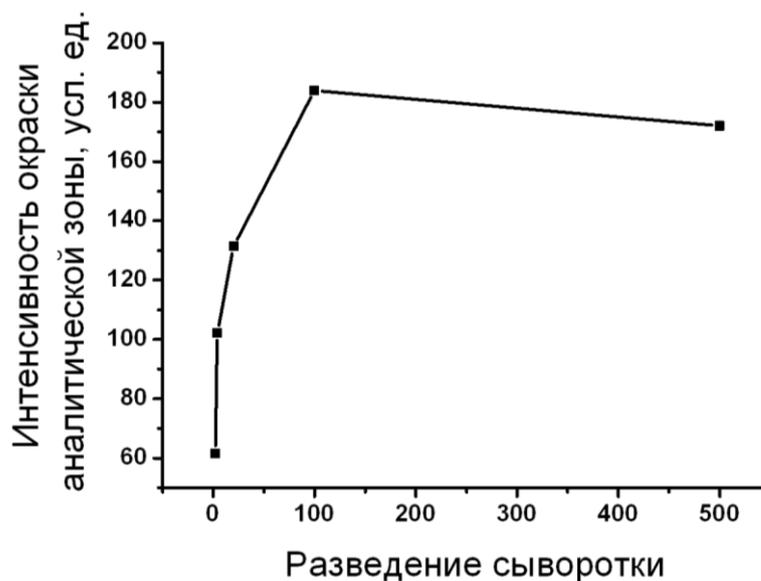


Рис. 7. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны тестов для ИХ-серодиагностики бруцеллеза КРС от разведения стандартной положительной сыворотки.

В «обратной» схеме серодиагностического ИХА (схема Б) протекают те же реакции (1)-(4), что и в стандартной схеме ИХА. (В данном случае Р – активные молекулы антигена, иммобилизованные на коллоидном носителе, а R – активные молекулы иммуноглобулин-связывающего белка, иммобилизованные в аналитической зоне.) Отличие схемы Б заключается в том, что в реакциях с коллоидным конъюгатом ($A+P=AP$ (1) и $P+AR=APR$ (4)) участвуют только специфические антитела, а в реакциях с рецептором в аналитической зоне ($A+R=AR$ (2) и $AP+R=APR$ (3)) – все иммуноглобулины в пробе.

Величина $[APR]$ в ИХА по схеме Б в модели, не учитывающей диссоциацию специфических комплексов за время анализа ($k_d < 10^{-4} \text{ с}^{-1}$), вычисляется по уравнению:

$$[APR] = \frac{x[R_0][AP]}{[A_0]} (1 - e^{-t_2 k_{as}[A_0]}) \quad (6)$$

Схема Б позволяет увеличить концентрацию иммуноглобулин-связывающего белка до уровня, сопоставимого с концентрацией иммуноглобулинов в крови, поскольку иммуноглобулин-связывающий белок иммобилизуется на нитроцеллюлозной мембране, имеющей высокую сорбционную ёмкость – до 15 мг белка на мл. В традиционной схеме анализа повысить концентрацию иммуноглобулин-связывающего белка затруднительно, так как данный белок иммобилизуется на КЗ, сорбционная ёмкость которого на несколько порядков ниже.

Представленное на рис. 8 сопоставление кинетики образования APR в схеме А при $[R]_0 = 10^{-6} \text{ М}$ и в схеме Б с десятикратным повышением

концентрации $[R]_0 = 10^{-5}$ М демонстрирует возможности предлагаемого способа увеличения сигнала тест-системы.

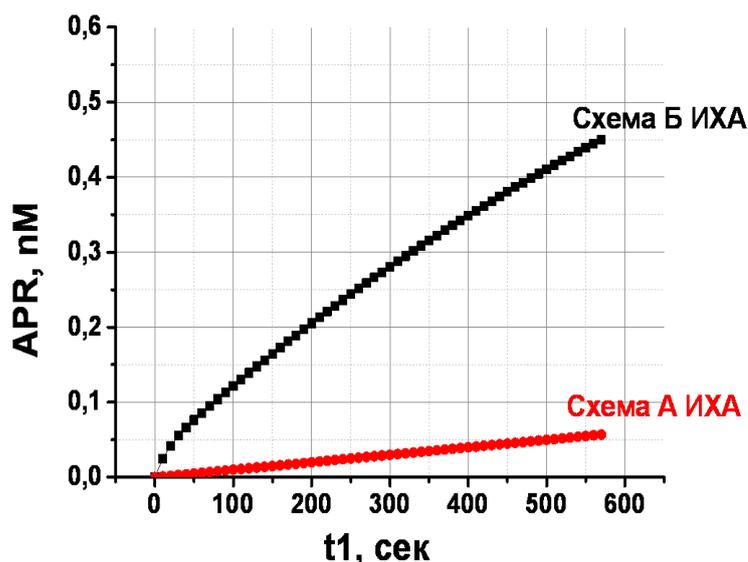


Рис. 8. Кинетика образования APR в ИХА по схемам А и Б. Параметры модели: $[A]_0=10^{-5}$ М, $[P]_0=10^{-7}$ М, $k_{a1-4}=10^4$ 1/(М·с), $\chi=10^{-4}$; $[R]_0=10^{-6}$ М – в схеме А ИХА, $[R]_0=10^{-5}$ М – в схеме Б ИХА.

Разработка иммунохроматографических тест-систем для определения специфических антител

Тест-системы для серодиагностики бруцеллеза КРС

На первой стадии панель из 63 сывороток КРС с поставленным диагнозом «бруцеллез» (63 сыворотки), предоставленная Национальным центром биотехнологии Республики Казахстан, была охарактеризована методом ИФА для определения титров антител и подтверждения диагноза. Также была охарактеризована предоставленная панель из 21 сыворотки КРС без положительных реакций на возбудитель бруцеллеза. По данным проведенного нами ИФА 63 сыворотки были классифицированы как положительные и 21 как отрицательные, что полностью совпало с данными, предоставленными Национальным центром биотехнологии Республики Казахстан. Данные панели охарактеризованных сывороток были использованы для апробации трех схем разрабатываемых ИХ-систем серодиагностики бруцеллеза.

Для реализации ИХА по схеме А использовали конъюгат белка G с КЗ (диаметр частиц 24 нм) с оптимизированным составом. Изготовленные экспериментальные образцы тест-систем были протестированы на стандартных препаратах – сильноположительной, слабоположительной, пороговой («cut-off») и отрицательной сыворотках. Количественно связывание коллоида регистрировали с помощью портативного анализатора

«Рефлексом». Минимальная интенсивность окрашивания, различимая визуально, соответствует значению сигнала анализатора 0,5 отн. ед.

Полученные результаты (табл. 5) подтверждают достоверность диагностики с помощью разработанной тест-системы: наличие или отсутствие окрашивания аналитической зоны соответствует содержанию антител в препаратах. Окрашивание аналитической зоны тест-системы при использовании сыворотки «cut-off» соответствует пределу визуальной детекции.

Таблица 5. Интенсивности окрашивания аналитической зоны тест-систем для определения специфических антител против ЛПС *Brucella abortus* после тестирования стандартных препаратов сывороток

	Интенсивность окрашивания аналитической зоны, отн. ед.
Сильноположительная сыворотка	12,7
Слабоположительная сыворотка	2,1
Сыворотка «cut-off»	0,5
Отрицательная сыворотка	0,2

Затем были протестированы 63 положительные и 21 отрицательная (по данным ИФА) сыворотки КРС. Для всего массива проб качественные «да-нет» результаты ИХА полностью совпали с результатами ИФА. Это позволяет заключить, что показатели чувствительности и специфичности разработанного ИХА не уступают соответствующим показателям ИФА. На рис. 9 представлена зависимость между характеристиками содержания в сыворотках специфических антител против ЛПС *B. abortus*, получаемыми методами ИФА и ИХА. Данные результаты свидетельствуют о высокой достоверности диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота с помощью разработанной ИХ-системы определения антител против ЛПС *B. abortus*.

После тестирования в стандартной схеме ИХА та же панель сывороток КРС была протестирована в схеме с обратным порядком формирования комплексов (схема Б). Для реализации данной схемы на частицах КЗ 20 нм иммобилизовали молекулы ЛПС *B. abortus*, а в аналитической зоне тест-полоски сорбировали белок А из концентрации 10 мг/мл. Результаты проведенного тестирования показали полное качественное совпадение результатов ИХА по схемам А и Б.

Для устранения влияния неспецифических иммуноглобулинов на результаты анализа также использовали ИХА специфических антител по схеме В, в которой исключено связывание с окрашенной меткой иммуноглобулинов, не способных взаимодействовать с антигеном.

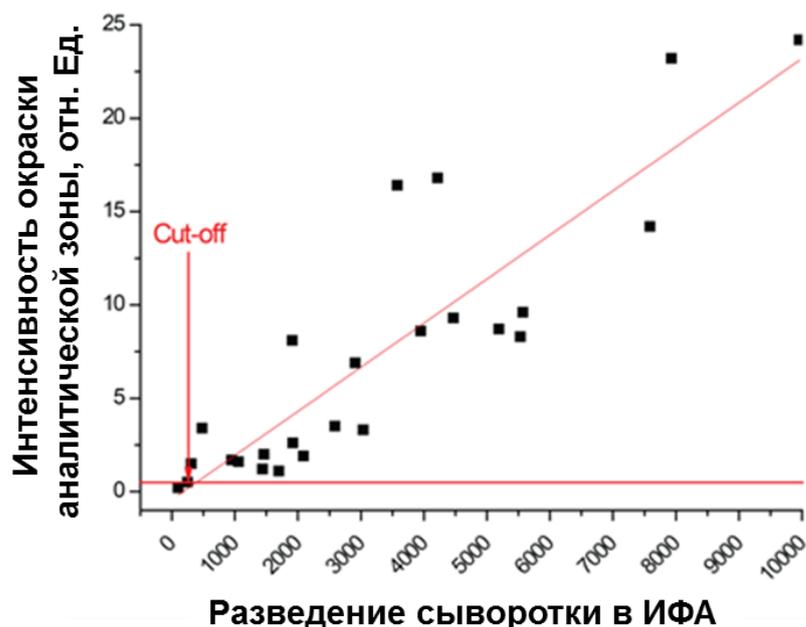


Рис. 9. Корреляция результатов определения уровня специфических IgG к ЛПС *B. abortus* методами ИФА и ИХА. По оси абсцисс – разведение сыворотки, дающее в ИФА оптическую плотность 0,7, по оси ординат – интенсивность окрашивания в аналитической зоне при тестировании этой сыворотки методом ИХА.

По результатам тестирования в схеме В 44 из 63 (70%) сывороток зараженных бруцеллезом коров дали положительный результат. Среди 21 сыворотки здоровых коров положительных результатов тестирования не наблюдалось. Таким образом, специфичность ИХА осталась 100%-ной, однако чувствительность снизилась на 30%.

Проведенное сопоставление трех схем иммунохроматографии позволяет заключить, что для серодиагностики бруцеллеза КРС наиболее эффективны традиционная схема и схема Б.

Тест-системы для серодиагностики легочного туберкулеза людей

Панель из 22 сывороток крови больных с подтвержденным диагнозом «туберкулез органов дыхания», предоставленная ЦНИИ туберкулеза, была протестирована методом ИФА на содержание специфических антител против рекомбинантного антигена Rv0934 *M. tuberculosis*. В качестве отрицательного контроля были использованы 10 сывороток здоровых доноров, предоставленных Институтом медико-биологических проблем РАН. По результатам серодиагностического тестирования в ИФА 13 из 22 сывороток (59%) крови были классифицированы как положительные, ещё 2 сыворотки дали промежуточный результат тестирования.

ИХ-системы (схема А) первоначально тестировали, используя в качестве модельной пробы сыворотку с добавленными в нее моноклональными антителами НТМ81 против рекомбинантного антигена Rv0934 *M. tuberculosis*. Для более эффективного выявления специфических антител

использовали 10-кратный концентрат конъюгата КЗ (диаметр частиц 20 нм) с белком А. Результаты тестирования показали, что данная система позволяет выявлять специфические антитела в сыворотке до концентраций ~12 мкг/мл. Тестирование изготовленных ИХ-систем на пробах сывороток крови больных туберкулезом показало их крайне низкую диагностическую эффективность: только 2 из 22 сывороток дали положительный результат.

20 сывороток крови больных туберкулезом, отрицательных по результатам ИХ-тестирования по схеме А, были протестированы в ИХ-системе по схеме Б. Из 20 проб 10 дали положительные результаты. На рис. 10 представлены примеры внешнего вида тест-полосок после проведения анализа 5 сывороток в двух форматах ИХА.

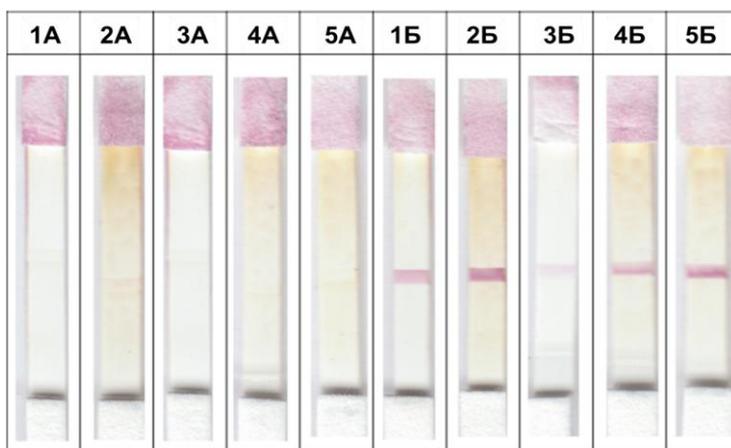


Рис. 10. Тестирование сывороток крови больных туберкулезом (пробы 1–5) по стандартной (А) и альтернативной (Б) схемам иммунохроматографической серодиагностики.

Схема Б позволяет на порядок увеличить сигнал в ИХА специфических антител против Rv0934 *M. tuberculosis* и благодаря этому повысить выявление больных. Этот результат совпадает с предсказаниями, полученными на основании анализа математических моделей схем А и Б.

В качестве средства повышения эффективности ИХ-серодиагностики туберкулеза также была охарактеризована схема В. Тестирование сывороток крови больных туберкулезом показало, что схема В характеризуется более высокой диагностической чувствительностью (в 2 раза) по сравнению с традиционной схемой А, однако значительно уступает по чувствительности схеме Б. При этом ни одна из схем не давала ложноположительных результатов при тестировании сывороток крови здоровых доноров.

Таким образом, для серодиагностики легочного туберкулеза людей наиболее эффективной оказалась предложенная схема Б, которая позволила снизить предел обнаружения специфических антител и, тем самым, повысить процент выявления больных туберкулезом в 5 раз по сравнению со стандартной схемой ИХА.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы процессы иммобилизации на коллоидном золоте белков разного размера и молекулярной массы – иммуноглобулина G человека (IgG), бычьего сывороточного альбумина (БСА), рекомбинантного белка G стрептококка (белок G) и соевого ингибитора трипсина (СИТ). С применением разработанного метода, основанного на измерении флуоресценции триптофана в составе белков, определены предельные количества адсорбируемых белков на частице коллоидного золота диаметром 24 нм, составляющие 52, 90, 500, 550 молекул соответственно для IgG, БСА, белка G и СИТ при pH иммобилизации 5,4.
2. Исследовано влияние pH среды иммобилизации на сорбцию белков на коллоидное золото. Показано, что при изменении pH от 5,4 до 8,3 увеличивается максимальное количество сорбируемых молекул БСА на частице коллоидного золота, что может быть связано с переходом от формирования монослоя белка на поверхности частицы к полислоевой иммобилизации.
3. Определена степень сохранения функциональной активности антител, иммобилизованных на поверхности частиц коллоидного золота, с использованием разработанной методики, основанной на иммуноферментном анализе. Установлено, что в конъюгатах коллоидного золота с антивидовыми антителами способность связываться с антигеном сохраняют около 12% антигенсвязывающих центров.
4. Разработана математическая модель определения антител методом иммунохроматографии. Установлена зависимость кинетики образования детектируемого иммунного комплекса от концентраций реагентов и параметров межмолекулярных взаимодействий в ходе анализа. На основании изучения модели предложены рекомендации по оптимизации условий определения специфических антител. Показано, что увеличение регистрируемого сигнала и снижение предела обнаружения антител могут достигаться разбавлением анализируемой пробы сыворотки крови до 100 раз.
5. Предложены две новые методики иммунохроматографического определения специфических антител. В первой схеме на поверхность коллоидного маркера и на мембрану сорбируется антиген, во второй – коллоидное золото конъюгируется с антигеном, а в аналитической зоне сорбируется белок А. Показано, что применение данных схем позволяет снизить предел обнаружения антител и повысить эффективность диагностики легочного туберкулеза.
6. Разработаны иммунохроматографические тест-системы для экспрессной (время анализа 10 минут) серодиагностики легочного туберкулеза людей с применением в качестве антигена белка Rv0934 *Mycobacterium tuberculosis* и бруцеллеза крупного рогатого скота с применением в качестве антигена липополисахарида *Brucella abortus*.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Eskendirova S.Z., Baltin K.K., Mukanov K.K., Ramankulov E.M., Sadykhov E.G., Dzantiev B.B. Express immunochromatographic detection of antibodies against *Brucella abortus* in cattle sera based on quantitative photometric registration and modulated cut-off level. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2015, v. 36, N 1, pp. 80–90.
2. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development and application of a label-free fluorescence method for determining the composition of gold nanoparticle–protein conjugates. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, v. 16, N 1, pp. 907–923.
3. Sotnikov D.V., Radchenko A.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Determination of the composition and functional activity of the conjugates of colloidal gold and antibodies. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2016, v. 11, N 3, pp. 169–179.
4. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Surface plasmon resonance based biosensors. In book: *Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis* (Editor Dr. Pranjal Chandra). Stylus Publishing, Sterling, USA. 2016. ISBN: 978-1-84919-950-6. 624 pp. Chapter 30. P. 497–518.
5. Голубев С.С., Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Киселева Ю.В., Короленко Я.А., Кудеяров Ю.А., Малюченко В.М., Смирнова Н.И., Сотников Д.В. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. Ч. 1. Иммунохроматографические экспресс-тесты с коллоидным золотом. *Метрология*. 2012, № 10, сс. 14–29.
6. Малюченко В.М., Киселева Ю.В., Короленко Я.А., Жердев А.В., Таранова Н.А., Берлина А.Н., Смирнова Н.И., Сотников Д.В. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов. *Законодательная и прикладная метрология*. 2012, Т. 119, № 4, сс. 29–32.
7. Кудеяров Ю.А., Голубев С.С., Малюченко В.М., Жердев А.В., Смирнова Н.И., Сотников Д.В. Разработка метрологического комплекса для аттестации существующих и вновь разрабатываемых экспресс-тестов. Метод градуировочных характеристик для построения калибровочных кривых экспресс-тестов. *Российские нанотехнологии*. 2013, т. 8, № 7–8, сс. 105–109.
8. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Альтернативный способ иммунохроматографической серодиагностики с использованием конъюгата антигена с коллоидным маркером. *Прикладная аналитическая химия*, 2013, т. 4, № 2 (10), сс. 26–33.

9. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Староверова Н.П., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение иммунохроматографического анализа для серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2013, № 3, сс. 15–18.
10. Сотников Д.В., Жердев А.В., Авдиенко В.Г., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото – антиген. Биотехнология, 2015, № 2, сс. 76–81.
11. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Детекция межмолекулярных взаимодействий, основанная на регистрации поверхностного плазмонного резонанса. Успехи биологической химии. 2015, т. 55, сс. 391–420.

Патенты:

1. Жердев А.В., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Дзантиев Б.Б. Способ определения антител к возбудителю туберкулеза. Патент Российской Федерации на изобретение № 2395092 от 17 сентября 2008 г. Дата публикации – 27 марта 2010 г.
2. Ескендинова С.З., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Балтин К.К., Жердев А.В., Раманкулов Е.М., Муканов К.К., Булашев А.К., Шенжанов К.Т., Унышева Г.Б. Экспресс-способ серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота на основе иммунохроматографического анализа. Инновационный патент № 25460 на изобретение. Дата регистрации в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан – 20 января 2012 г. (Заявка на патент № 035510 от 23 декабря 2010 г.).
3. Ескендинова С.З., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Жердев А.В., Балтин К.К., Унышева Г.Б., Булашев А.К., Муканов К.К., Раманкулов Е.М. Способ экспресс-обнаружения и идентификации *Brucella abortus* в биологическом материале на основе иммунохроматографического анализа. Инновационный патент № 25922 на изобретение. Дата регистрации в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан – 29 июня 2012 г. (Заявка на патент № 023098 от 23 августа 2011 г.).
4. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Тест-полоска для высокочувствительного иммунохроматографического анализа. Патент Российской Федерации на изобретение № 2523393 от 19 марта 2013 г. Дата публикации – 23 мая 2014 г.
5. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Метод получения межмолекулярных конъюгатов для иммунохроматографического определения специфических антител. Патент Российской Федерации на изобретение № 2530560 от 28 июня 2012 г. Дата публикации – 14 августа 2014 г.

6. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа для серодиагностики. Патент Российской Федерации на изобретение № 2532352 от 28 июня 2012 г. Дата публикации – 10 ноября 2014 г.
7. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ иммунохроматографического определения специфических антител. Патент Российской Федерации на изобретение № 2545909 от 19 марта 2013 г. Дата публикации – 10 апреля 2015 г.

Материалы научных конференций, конгрессов и симпозиумов:

1. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Экспрессный иммунохроматографический метод серодиагностики туберкулеза. Сборник тезисов II Международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону, 8–10 октября 2008 г., сс. 145–146.
2. Бызова Н.А., Сотников Д.В., Жердев А.В., Ескендинова С.З., Балтин К.К., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографических тестов для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Материалы II Международной конференции «Астана Биотех 2011», 10–11 октября 2011 г., Астана, Казахстан, с. 113.
3. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографические тест-системы для серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014», Москва, 18–20 марта 2014 г., т. 2, сс. 451–452.
4. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Экспрессная серодиагностика туберкулеза на основе конъюгатов наночастиц с антигеном rv0934 *Mycobacterium tuberculosis*. Материалы VIII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 17–20 марта 2015 г., часть 1, с. 144–146.
5. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Флуориметрический метод определения состава конъюгатов золотых наночастиц с белками. V Съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону, Южный Федеральный Университет, 4–10 октября 2015 г. Материалы докладов, том 1, с. 334–335.