

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА**

*На правах рукописи*



**Сотников Дмитрий Васильевич**

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

03.01.04 Биохимия

**Диссертация**  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:

доктор химических наук,  
профессор Б.Б. Дзантиев

кандидат биологических наук  
А.В. Жердев

МОСКВА 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>3</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>10</b>
1.1. Иммунохроматография .....	10
1.2. Коллоидное золото .....	12
1.3. Измерение констант иммунного взаимодействия методом ППР .....	21
1.4. Моделирование иммунохроматографии .....	30
1.5. Диагностика туберкулеза и бруцеллеза.....	33
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>45</b>
2.1. Реагенты .....	45
2.2. Буферные и вспомогательные растворы .....	46
2.3. Материалы .....	46
2.4. Методики .....	47
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>56</b>
3.1. Синтез и определение размерных характеристик коллоидного золота.....	56
3.2. Получение и характеристика конъюгатов коллоидного золота с белками .....	57
3.3. Характеристика состава и функциональной активности коллоидных конъюгатов методом ИФА .....	73
3.4. Определение кинетических и равновесных параметров взаимодействий антиген-антитело .....	80
3.5. Разрабатываемые схемы ИХА .....	85
3.6. Моделирование систем определения специфических антител .....	89
3.7. Разработка иммунохроматографических тест-систем для определения специфических антител .....	114
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>131</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>133</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ЗХВК – золотохлористоводородная кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХ – иммунохроматографический(ая)

ИХА – иммунохроматографический анализ

КЗ – коллоидное золото

КРС – крупный рогатый скот

ЛПС – липополисахарид

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЧ – плазмонная частота

СИТ – соевый ингибитор трипсина

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

тгБСА – Трис-НСl буфер, содержащий 1% БСА, 1% сахарозы и 0,1% азида натрия

DMSO – диметилсульфоксид

IgG – иммуноглобулин G

hIgG – иммуноглобулины G человека

sIgG – иммуноглобулины G овцы против иммуноглобулинов G человека

LAM – липоарабиноманнан

PBS – калий-фосфатный буфер солевой (50 mM, pH 7,4, с 0,1 M NaCl)

PBST – PBS с 0,05% Тритона X-100

P-RABIss – конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов крупного рогатого скота с пероксидазой

RABIss – кроличьи антитела против иммуноглобулинов крупного рогатого скота

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Иммунохимические тест-системы широко используются в медицинской и ветеринарной диагностике, позволяя достоверно установить наличие в биоматериале как антигена инфекционного агента, так и специфических антител к нему. Для ряда болезней контроль специфических антигенов и антител является основным средством диагностики [1].

Серодиагностический метод основан на определении в крови специфических антител к антигенам возбудителя заболевания. В ответ на присутствие в организме инфекционного агента иммунная система вырабатывает специфические иммуноглобулины, обнаружение которых часто более предпочтительно, чем непосредственное определение возбудителя или его антигенов [2].

Особенно перспективной для массового использования представляется серодиагностика в формате иммунохроматографического анализа (ИХА), который может проводиться во внелабораторных условиях, не требует оборудования, высокой квалификации персонала и позволяет получать результат обследования за 10-15 мин [3-6]. Высокая экспрессность и методическая простота ИХА определили широкое распространение данного метода для решения различных диагностических задач. Однако по аналитическим характеристикам ИХА зачастую уступает альтернативным методам. Существующие ограничения ИХА определяют потребность в создании новых подходов, позволяющих улучшить аналитические характеристики метода и, таким образом, повысить достоверность ИХ-серодиагностики.

**Степень разработанности проблемы.** Несмотря на множество публикаций, посвященных иммунохроматографической серодиагностике (см. для примера [7-11]), и широкий круг коммерчески доступных тест-систем, основанных на данном методе, теоретические описания иммунохроматографических серодиагностических тест-систем не разработаны. Существующие комментарии о закономерностях их функционирования базируются исключительно на эмпирических закономерностях. Отрытыми остаются такие принципиальные для иммунохроматографии вопросы, как состав используемых в анализе конъюгатов рецептор-маркер и степень сохранения функциональной активности рецепторными молекулами в составе конъюгата.

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

Достижение поставленной цели включало решение ряда **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 системах;
- Разработку математических моделей функционирования -систем иммунохроматографической серодиагностики;
- Разработку рекомендаций по улучшению чувствительности иммунохроматографической серодиагностики на основании анализа предложенной модели;
- Разработку и апробацию систем иммунохроматографической 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 иммунохроматографической серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и легочного туберкулеза людей с использованием рекомендаций, полученных при анализе разработанных моделей.

**Научная новизна.** В рамках диссертационной работы впервые предложены математические модели иммунохроматографической серодиагностики и разработаны 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 проведения ИХА, позволяющие улучшить чувствительность серодиагностики. Экспериментально подтверждена эффективность этих подходов для определения специфических антител.

**Научно-практическая ценность.** Разработаны системы иммунохроматографической серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и легочного туберкулеза людей. 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. Полученные данные об иммобилизации белков на коллоидном золоте позволяют повысить аналитическую эффективность данных конъюгатов.

Предложенная математическая модель дает возможность оценить влияние различных факторов на характеристики тест-систем, и, таким образом, упростить разработку иммунохроматографических методов анализа.

**Методология и методы исследования.** Метод иммунохроматографии являлся как объектом исследования, так и средством получения экспериментальных результатов. Количественную обработку результатов иммунохроматографического тестирования проводили с использованием видеоцифровой регистрации.

Для получения нанодисперсных маркеров – препаратов коллоидного золота разного размера, использовали метод химического синтеза Френса, основанный на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Размерную характеристику полученных препаратов коллоидного золота проводили методом просвечивающей электронной микроскопии. Коллоидное золото конъюгировало с иммунореагентами посредством физической адсорбции. Стабильность полученных конъюгатов определяли на основании оптической регистрации их флокуляции в

растворах с высокой ионной силой. Состав и функциональную активность конъюгатов характеризовали методами флуоресцентной спектроскопии и иммуноферментного анализа.

Изучение иммунохимических взаимодействий (определение равновесных и кинетических констант образования комплекса антиген-антитело) проводили с использованием биосенсорной системы Biosore X, основанной на регистрации поверхностного плазмонного резонанса.

**Степень достоверности работы.** Достоверность представленных в диссертации данных определяется использованием современных физико-химических методов исследования и статистической обработки результатов. Заключение о диагностических результатах, полученных с использованием разработанных тест-систем, подтверждалось данными видеодигитальной регистрации и анализа изображений, что исключает субъективность их интерпретации. Препараты сывороток, использованные в ходе апробации тест-систем, были предварительно охарактеризованы альтернативными аналитическими методами.

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

#### **Положения диссертации, выносимые на защиту:**

- Определение состава конъюгатов коллоидного золота с белками, основанное на измерении флуоресценции триптофановых аминокислотных 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 *Mycobacterim tuberculosis* и липополисахарида *Brucella abortus*.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных мероприятиях: Международная научная конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», 8-10 октября 2008 г., Ростов-на-Дону; Московская международная научно-практическая конференция «Биотехнология: экология крупных городов» в рамках Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 15-17 марта 2010 г., Москва; VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010», 24-26 ноября 2010 г., Москва; Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития", 21–25 марта 2011 г. Москва; Международная научно-практическая конференция «Инновационные биотехнологии в странах ЕврАзЭС», 11-13 октября 2012 г., Санкт-Петербург; 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.

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 11 статей в российских и иностранных журналах, 5 тезисов конференций, получено 7 российских и иностранных патентов на изобретения.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Решение задач исследования требовало анализа научной литературы по следующим вопросам, рассмотренным в настоящем обзоре: 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 легочного туберкулеза людей.

## 1.1. Иммунохроматография

Иммунохимический анализ может быть реализован в различных форматах, однако в последние два десятилетия наиболее активно развиваются иммунохроматографические тесты, что обусловлено их низкой стоимостью, возможностью проведения экспрессного (10-15 мин) анализа без специализированного оборудования [12].

Принцип работы ИХ-систем основан на движении жидкой пробы вдоль мембран (формирующих ИХ-тест-полоску) под действием капиллярных сил, которое приводит к последовательному взаимодействию реагентов на разных участках мембран и окрашиванию определенных участков тест-полоски [13-15]. В ИХ-тестах используется ряд меток (ферменты, окрашенные латексы и др.), но чаще всего применяется коллоидное золото [12; 16].

Тест-полоска представляет собой мультимембранный композит, который состоит из:

- мембраны, адсорбирующей образец, на которую наносится анализируемая проба;
- подложки под конъюгат, на которую наносится конъюгат маркера с рецепторными молекулами (антителами, аптамерами, белками A/G и пр.);
- рабочей мембраны с иммобилизованными специфическими реагентами, взаимодействующими с аналитом, или конъюгатом маркера (в зависимости от формата анализа);
- конечной адсорбирующей мембраны, впитывающей жидкость, протекающую через рабочую мембрану.

Общая схема иммунохроматографической серодиагностики (рис. 1) заключается в следующем: Тестируемая проба крови или сыворотки впитывается мембранами тест-

полоски. Протекая через различные участки мультимембранного композита, она сначала смешивается с частицами маркера, на поверхности которого иммобилизован иммуноглобулин-связывающий реагент (антивидовые антитела, белок А *Staphylococcus aureus*, белок G *Streptococcus* spp. и др.). Этот маркерный конъюгат связывается с иммуноглобулинами пробы. Образовавшийся окрашенный комплекс вместе с жидкостью достигает участка мембраны с иммобилизованным антигеном патогена (аналитическая зона) и, связываясь с антигеном, окрашивает этот участок. Интенсивность окрашивания отражает концентрацию в пробе специфических антител (антител к используемому антигену) и их аффинность. Для проверки работоспособности используемого конъюгата и сохранения функциональности тест-системы используется расположенная далее контрольная зона, в которой реагент, сорбированный на частице коллоидного золота, связывается с иммобилизованным на мембране реагентом, как правило, антивидовыми антителами.

Маркерный конъюгат, не связавшийся с антигеном в аналитической зоне полоски, протекает далее и в контрольной зоне взаимодействует с антивидовыми антителами. Окрашивание контрольной зоны подтверждает правильность проведения тестирования и сохранение конъюгатом реакционной способности.



Рис. 1. Принцип иммунохроматографической серодиагностики и компоненты иммунохроматографической тест-полоски.

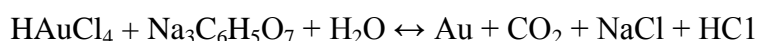
## 1.2. Коллоидное золото

Крайне важным компонентом ИХ-систем является маркер, в качестве которого чаще всего используются частицы коллоидного золота. Благодаря уникальным физическим и химическим свойствам наночастицы золота нашли широкое применение в различных областях биохимии, медицины, аналитической химии и др. [17-22]. Золотые наночастицы обладают высокой поверхностной энергией, определяющей возможность их модификации для придания нужных физических и химических свойств [23].

### *1.2.1. Синтез коллоидного золота с использованием низкомолекулярных восстановителей*

Методы получения коллоидного золота можно разделить на два основных направления: дезинтеграция металлического золота и конденсация атомов золота в частицы. Второй подход получил большее распространение благодаря большей гомогенности по размерам и форме получаемых таким методом частиц. Данный подход основывается на восстановлении золота из галогенидов, как правило, золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК;  $\text{HAuCl}_4$ ) [24]. Описано использование более ста восстановителей для получения коллоидного золота таким способом, среди которых: формальдегид, этиловый спирт, белый фосфор, аскорбиновая кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота, боргидрид натрия и др. Наибольшее распространение в качестве восстановителя получил цитрат натрия. Метод восстановления ЗХВК цитратом натрия, предложенный Туркевичем в 1951 г. [25] и доработанный Френсом в 1973 г. [26], обладает рядом преимуществ: простая и воспроизводимая процедура синтеза, возможность получения частиц в широком диапазоне размеров (10-150 нм), устойчивость коллоида благодаря стабилизации частиц цитрат-ионами. Цитрат-ионы могут быть легко замещены другими молекулами, поэтому такая стабилизация не ограничивает возможность поверхностной модификации частиц.

Реакция цитратного восстановления может быть представлена в виде следующей схемы:



Выделяют два ключевых процесса в образовании частиц КЗ при восстановлении ЗХВК: формирование зародышей (центров кристаллизации) и их рост [27]. Соотношение

между скоростями данных процессов определяет размер получаемых частиц. При быстром формировании зародышей образуется большое количество мелких частиц, тогда как при низкой скорости зародышеобразования получается относительно небольшое количество крупных частиц. Снижение реакционной способности восстановителя в целом приводит к получению более крупных частиц. Аналогично, повышение концентрации восстановителя влечет за собой снижение среднего диаметра частиц [24].

Согласно схеме восстановления ЗХВК цитратом, представленной на рис. 2, на первой стадии происходит образование интермедиата – ацетондикарбоксилата. Ионы  $\text{Au}^{3+}$  при этом восстанавливаются до  $\text{Au}^+$ . Затем образуются полимолекулярные комплексы между ацетондикарбоксилатом и  $\text{Au}^+$ , что приводит к локальному повышению концентрации ионов золота (см. рис. 2Б). В дальнейшем происходит диспропорционирование  $\text{Au}^+$  до  $\text{Au}^0$  и  $\text{Au}^{3+}$ . Восстановление золота до нулевой степени окисления вызывает образование и рост зародышей и формирование конечных частиц [28].

На размерные характеристики получаемого препарата также влияют порядок добавления реагентов, интенсивность перемешивания, температура, длительность реакции и рН среды.

Низкая скорость образования зародышей приводит к более широкому распределению частиц по размерам. Полученные частицы могут частично агрегировать, повышая гетерогенность препарата. Поэтому для высокой гомогенности важна также стабилизация частиц в растворе.

Поскольку на размерные характеристики продукта синтеза влияет рН реакционной среды, который меняется в ходе реакции, Schulz и соавт. [28] предложили проводить восстановление ЗХВК в цитратном буфере вместо обычного раствора цитрата натрия. Это позволило значительно сузить распределение синтезированных частиц по размерам (коэффициент вариации диаметра частиц уменьшился до 6% по сравнению с 12,5% для немодифицированной методики). Однако, поскольку для получения более крупных частиц необходимо использовать более низкие концентрации цитрат-ионов, а значит, понижать молярность буфера и его буферную ёмкость, то данный подход эффективен только при получении коллоидного золота диаметром не более 17 нм.

## Механизм

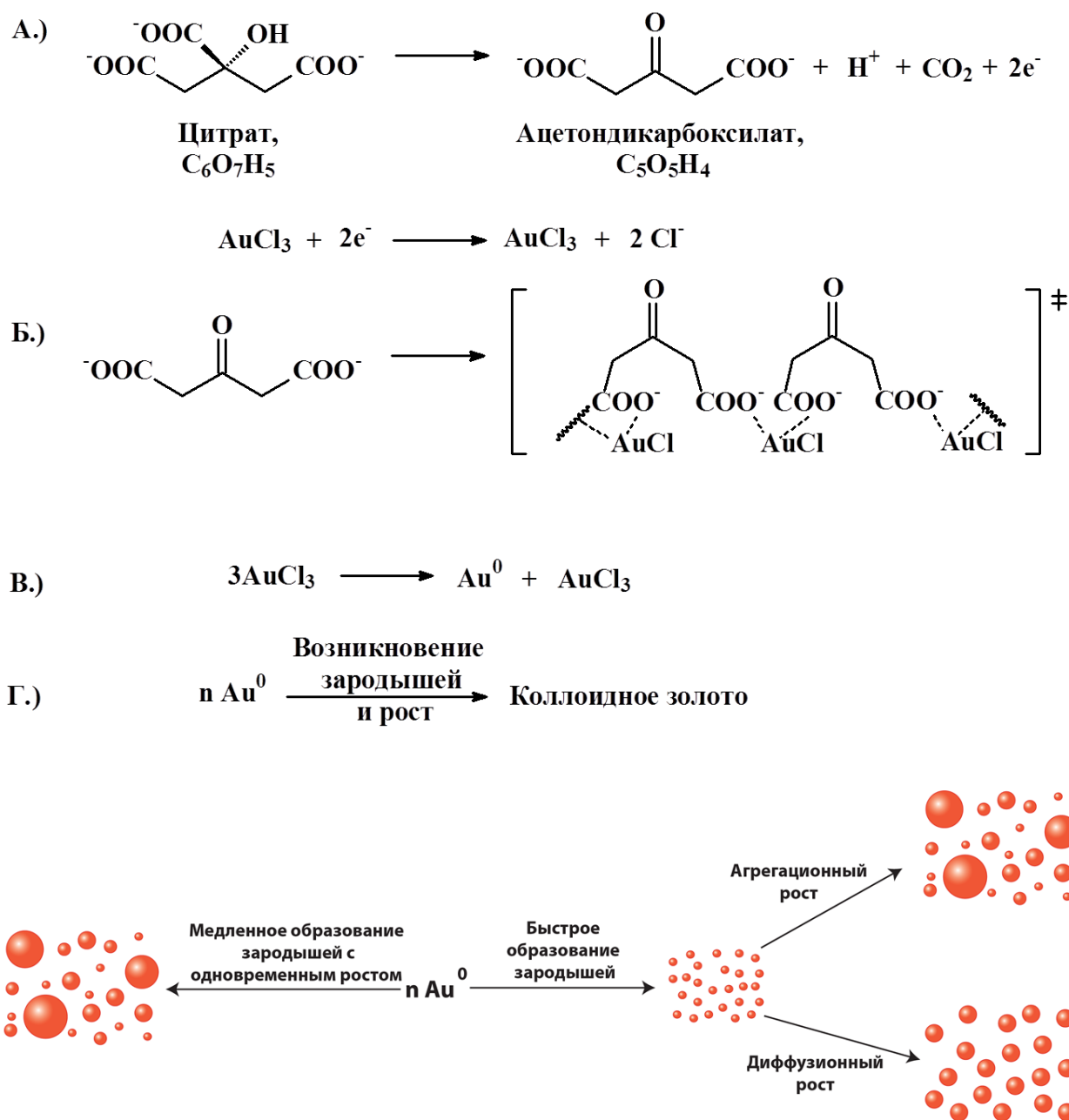


Рис. 2. Механизм синтеза КЗ методом Туркевича-Френса (согласно [28]).

Методом Туркевича-Френса можно получать частицы диаметром до 150 нм. Однако данный барьер можно преодолеть, если использовать последовательное (многостадийное) наращивание. При этом наряду с увеличением диаметра (до нескольких сотен нанометров) повышается и однородность частиц по размерам [29]. Суть метода заключается в том, что сначала реакция проводится в условиях быстрого зародышеобразования для получения монодисперсного препарата с небольшим диаметром частиц. Переход от образования

зародышей и их росту обеспечивается изменением условий. Так, например, интенсивное образование зародышей и их рост наблюдается в кипящем растворе. Однако если повысить температуру примерно до 90%, то образование новых центров кристаллизации подавляется, тогда как рост имеющихся центров продолжается. Таким образом, если предварительно синтезированный затравочный препарат поместить в смесь ЗХВК и цитрата, не доводя до кипения, наночастицы будут постепенно увеличиваться в размерах до израсходования ЗХВК. Чем медленнее идет наращивание, тем уже распределение полученных частиц по размерам. При этом концентрация затравок должна превышать  $2 \cdot 10^{11}$  частиц в мл, иначе образования новых центров кристаллизации не избежать.

Согласно механизму Ламера [30, 31] рост наночастиц включает два периода:

1. фокусировка, во время которой размер частиц быстро увеличивается, а распределение по размерам сужается;
2. дефокусировка, когда скорость роста частиц резко снижается, а распределение по размерам расширяется.

Второй период, во время которого мелкие частицы растворяются, а крупные увеличиваются за счет высвободившегося золота, носит название созревания Оствальда. Именно из-за этого созревания частицы диаметром меньше 10 нм сложно получить методом Туркевича-Френса. Время перехода между двумя процессами зависит от температуры реакции и концентрации прекурсора (ЗХВК) [32]. При высокой концентрации прекурсора период фокусировки увеличивается и, как следствие, гомогенность препарата повышается. Однако с ростом концентрации прекурсора возрастает и вероятность образования дополнительных центров кристаллизации, приводящего к появлению частиц более мелкого размера. Данный факт является еще одним подтверждением важности выбора при синтезе оптимальной концентрации ЗХВК. Увеличить период фокусировки можно также посредством снижения температуры.

Важность получения гомогенных препаратов коллоидного золота связана, например, с тем, что более мелкие золотые частицы обладают меньшей константой связывания по отношению к биомолекулам [33], а крупные (более 40 нм) склонны к агглютинации. Поэтому наличие слишком мелких или слишком крупных частиц негативно влияет на стабильность препарата. Для ИХА оптимально использование золотых наночастиц с диаметром в диапазоне 20-40 нм [34-35].

### 1.2.2. Конъюгация коллоидного золота с макромолекулами

Как правило, золотые частицы подвергают модификациям с помощью белков, нуклеиновых кислот и др. для придания им большей стабильности и различных функциональных свойств [20; 36]. В комплексах с биорецепторными молекулами (антитела, аптамеры и т.д.) КЗ используются в качестве маркеров для решения аналитических задач [37].

Стабилизация коллоидного золота макромолекулами для защиты от агрегирующих реагентов обусловлена структурой золотой поверхности и ее ближайшего окружения. Поверхность золотой частицы заряжена отрицательно (поверхностный потенциал около  $-50$  мВ) благодаря слою анионов хлоридов золота, не до конца восстановившихся при синтезе (рис. 3). В зависимости от методики синтеза и состава реакционной среды на поверхности могут присутствовать и другие анионы. Например, как уже отмечалось, на поверхности золотых частиц, синтезированных цитратным методом, присутствуют цитрат-ионы. Противоионы (протоны, катионы металлов и т.д.) располагаются следующим слоем вокруг анионного слоя. Так происходит формирование двойной ионной оболочки вокруг наночастиц, которая порождает силы отталкивания между ними. Вследствие описанных процессов коллоидное золото стабильно только в растворах с низкой ионной силой, так как добавление электролитов компенсирует избыточный заряд ионных оболочек и понижает энергетический барьер отталкивания, что приводит к контакту поверхностей и слипанию частиц.

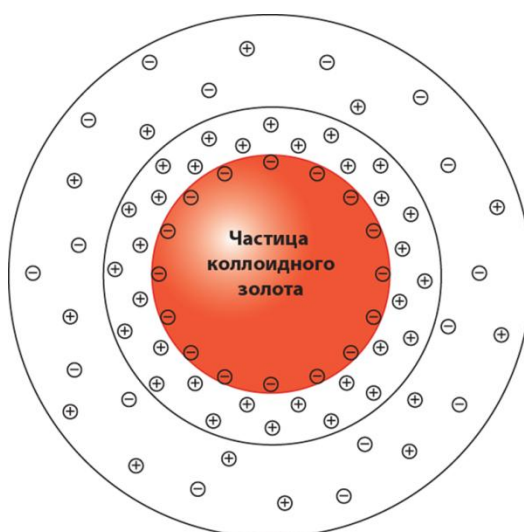


Рис. 3. Схематическое изображение частицы коллоидного золота и ионных слоев ближайшего окружения [39].



Покрытие полимером поверхности частицы позволяет сохранить прослойку, разделяющую золотые поверхности. В результате коллоид становится менее чувствителен к ионной силе раствора и другим факторам, способным вызывать агрегацию.

Взаимодействие макромолекул с КЗ зависит от химической природы сорбируемого вещества, состава среды и других факторов. В данный процесс могут вносить вклад электростатические, гидрофобные, ван-дер-ваальсовы и донорно-акцепторные взаимодействия [24]. Известно также высокое сродство золота к серосодержащим химическим группам, которое приводит к образованию самоорганизующегося монослоя тиол-содержащих молекул на золотых поверхностях [40]. Эффективными стабилизирующими агентами для коллоидного золота являются белки. Даже простая физическая сорбция белков на поверхность золота характеризуется высокой константой комплексообразования: ( $K_d$  – до  $10^9$  М) [33; 41]. Благодаря наличию у белков множества групп различной химической природы, их взаимодействие с поверхностью частиц происходит по нескольким центрам связывания и нескольким механизмам.

Для получения коллоидных конъюгатов можно использовать и ковалентную иммобилизацию. Однако именно физическая адсорбция получила наибольшее распространение из-за методической простоты и минимального воздействия на структуру и свойства белка [36]. Основной недостаток нековалентной иммобилизации – возможная частичная десорбция белковых молекул с поверхности и, как следствие, снижение функциональной активности конъюгата [42;43].

### ***1.2.3. Характеристика состава конъюгатов коллоидного золота***

К настоящему моменту предложено много методов экспериментального измерения количества молекул, сорбированных на поверхности наночастицы [44]. Этот ряд включает спектроскопические методы (абсорбционные [45], эмиссионные [46], флуоресцентные [47] и др.), масс-спектрометрию [48], регистрацию светорассеяния (рамановское [49], динамическое светорассеяние [50] и др.), методы аналитического разделения (хроматография [51], электрофорез [52], аналитическое ультрацентрифугирование [53], фракционирование в поперечном поле [54] и др.). Рассмотрим возможности применения данных методов для решения задач определения состава конъюгатов КЗ.

### *1.2.3.1. Методы характеристики коллоидных конъюгатов*

Разнообразные спектроскопические методы отличаются друг от друга по энергии используемого излучения (инфракрасные, оптические, рентгеновские и др.), а также по регистрируемому параметру: интенсивность поглощения излучения (абсорбционные методы) или его испускания (эмиссионные методы), либо смещение положения спектральных пиков. Изучение конъюгатов этими методами проводят либо с помощью меченых молекул, либо по собственным спектрам наночастиц и иммобилизуемых молекул. Примером первого подхода является работа De Roe и соавт., которые определяли состав конъюгатов КЗ с белками, меченными радиоактивной меткой [46]. Такая методика позволяет непосредственно регистрировать молекулы белка на поверхности конъюгата, поскольку наночастицы слабо влияют на интенсивность рентгеновского излучения. Второй подход был применен, например, Kang и соавт. [45], которые изучали смещение основного пика поглощения КЗ, вызываемое иммобилизацией белков на поверхности частиц.

Особый интерес представляет флуоресцентная спектроскопия, реализуемая с использованием флуоресцентных свойств как метки, так и самих сорбируемых молекул. Например, McKenzie и соавт. определяли количество меченых антител и нуклеиновых кислот по флуоресценции метки после ее выделения из конъюгата ферментативным гидролизом [55]. При характеристике состава конъюгатов часто используется наличие в белковых молекулах сильно флуоресцирующей аминокислоты – триптофана. Поскольку коллоидные частицы являются сильными модуляторами флуоресценции, иммобилизация на них молекул белка приводит к значительным изменениям ее спектра, регистрация которых и предлагается рядом авторов [33; 56; 57].

Для определения состава конъюгатов КЗ успешно применяется масс-спектрометрия в формате матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным анализатором (MALDI-TOF MS). Этот метод позволяет одновременно характеризовать несколько конъюгированных соединений благодаря отличию образующихся из них ионизированных молекул. Так, Hong и соавт. с помощью MALDI-TOF MS одновременно регистрировали количество бычьего сывороточного альбумина и глутатион-S-трансферазы, конъюгированных с золотыми частицами [48]. Белки в составе конъюгатов с КЗ подвергали ферментативному гидролизу, затем полученные фрагменты белков смешивали со стандартными препаратами, мечеными тяжелым изотопом, и на основании сравнения концентрации меченых и немеченых фрагментов делали вывод об исходном

составе конъюгатов. К недостаткам метода следует отнести высокую стоимость и сложность процедуры анализа.

Методы регистрации светорассеяния позволяют характеризовать функционализированные наночастицы без использования меток [50; 58; 59]. Основные преимущества этих методов: простота, возможность характеристики конъюгатов в исходном растворе, а также возможность регистрировать иммобилизацию в режиме реального времени. Однако точность результатов таких исследований невысока, поскольку на регистрируемые параметры рассеяния влияет не только состав, но и структура конъюгата. В связи с этим препараты с разной нагрузкой иммобилизованных белков могут давать одни и те же регистрируемые характеристики рассеяния, а расчет количества сорбированных молекул основывается на ряде допущений. Следует также учитывать, что измеряемый параметр частиц (например, в динамическом светорассеянии – гидродинамический радиус) является косвенным и отражает свойства не только конъюгата, но и образуемой вокруг него гидратной оболочки. Отличия размерных характеристик, получаемых разными методами, отмечались в ряде работ. Так, Bell и соавт. отмечают, что для одного и того же препарата частиц коллоидного золота средний диаметр составлял 20,1 нм (просвечивающая электронная микроскопия), 25,7 нм (динамическое рассеяние света) и 24,0 нм (анализ траекторий наночастиц) [50].

#### *1.2.3.2. Методы отделения и фракционирования наночастиц в анализе коллоидных конъюгатов*

Методы разделения смесей применяются для анализа коллоидных конъюгатов как самостоятельно, так и в сочетании с другими подходами.

Хроматографические методы часто используются для разделения функционализированных коллоидных частиц [44]. Данные методы характеризуются высокой эффективностью разделения частиц, но их применение зачастую сопряжено с возникновением артефактов, связанных с взаимодействием частиц с неподвижной фазой.

Различные виды электрофореза – капиллярный электрофорез, гель-электрофорез и др. – широко применяются как для разделения коллоидных конъюгатов, так и анализа их состава, в том числе в сложных многокомпонентных смесях [44, 52].

Аналитическое центрифугирование, помимо возможности отделения коллоидных частиц, позволяет определять размер, распределение по размерам и форму частиц. Также

данным методом можно получить некоторую информацию о конформации и структурных изменениях биомолекул, иммобилизованных на поверхности частиц [53; 60].

В основе метода фракционирования в поперечном поле лежит применение поля (электрического, гравитационного, центробежного, магнитного, теплового и др.), которое направлено перпендикулярно к потоку жидкости через длинный узкий канал [54]. Благодаря различиям в подвижности частиц, находящихся под действием поля той или иной природы, происходит фракционирование проходящего через канал наноматериала. Метод позволяет проводить разделение частиц в широком диапазоне размеров - от 1 нм до 1 мкм.

#### ***1.2.4. Взаимодействие белков с коллоидным золотом***

Несмотря на интенсивное развитие изучения, взаимодействие белков с КЗ по-прежнему вызывает множество вопросов. Многие работы содержат данные, которые на первый взгляд могут показаться противоречивыми. Так, в работах [59; 61; 62] утверждается, что белки образуют монослой на поверхности коллоидного золота, а в работах [33; 63] утверждается, что имеет место полислойная иммобилизация. В работе De Rое и соавт. [46] показано, что белок А взаимодействует с коллоидным золотом с равновесной константой диссоциации 343,9 нМ, тогда как в работе [42] утверждается, что константа диссоциации при низких концентрациях белка А составляет 2-3 нМ, а при высоких повышается до 500-900 нМ, хотя оба исследования проведены с использованием одного и того же метода – рентгеновской спектроскопии. Значительные различия констант взаимодействия с коллоидным золотом наблюдаются и для других белков – они могут достигать пяти порядков [41; 46; 57; 59; 64]. Например, для конъюгата БСА и КЗ значения константы диссоциации, определенные на основании тушения флуоресценции триптофана, варьируют от  $0,88 \cdot 10^{-4}$  М [65] до  $1 \cdot 10^{-9}$  М [41].

Открытым также остается вопрос о кооперативности сорбции белков на коллоидных частицах. Так, данные, полученные Lacerda и соавт. [33], демонстрируют, что в зависимости от размера золотых частиц сорбция на них белков может характеризоваться как положительной, так и отрицательной кооперативностью. Например, для инсулина на частицах золота диаметром 100 нм наблюдается положительная кооперативность сорбции (коэффициент Хилла  $n=3,64$ ), а на частицах диаметром 20 нм – отрицательная ( $n=0,63$ ).

Эти различия могут быть объяснены недостаточной точностью некоторых методов, возможными изменениями структуры конъюгатов в ходе экспериментов, а также использованием неунифицированных наночастиц, полученных в разных условиях [63].

### **1.3. Измерение констант иммунного взаимодействия методом ППР**

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) – возбуждение коллективных колебаний электронов проводимости на границе раздела сред, одна из которых имеет отрицательную действительную часть диэлектрической проницаемости. Кванты таких колебаний электронного газа получили название поверхностных плазмонов [66]. Условия возникновения ППР чрезвычайно чувствительны к составу среды вблизи границы раздела, что позволяет с помощью ППР детектировать образование межмолекулярных комплексов в режиме реального времени без использования меток с минимальной пробоподготовкой [67-70].

ППР-биосенсоры чаще всего классифицируют по используемым в них методам возбуждения поверхностных плазмонов. Основные типы схем для этого возбуждения – схемы на основе призм с высоким показателем преломления (метод Отто-Кречманна), волноводов и дифракционных решеток. Реже используют другие приспособления, например, фотонные кристаллы. Возможно также комбинирование нескольких схем возбуждения в одном устройстве [71]. Отдельно следует упомянуть методы, основанные на использовании явления локального поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР) и методы, использующие влияние эффекта ППР/ЛППР на такие оптические процессы, как адсорбция, флуоресценция или рамановское рассеяние [72].

#### ***1.3.1. Принцип работы ППР-сенсоров***

В основе ППР-методов лежит взаимодействие электромагнитной волны на поверхности раздела двух с электронным газом в тонкой пленке проводящего материала, помещенного между ними. В подавляющем большинстве случаев в качестве проводящего материала используется металл, так как для металлов выполнимо требование отрицательной действительной части диэлектрической проницаемости, необходимое для возникновения поверхностных электромагнитных волн в диапазоне длин волн от ультрафиолетового до инфракрасного [73]. ППР возможен только при определенном соотношении диэлектрических проницаемостей контактирующих сред. В видимом и ближнем ИК-диапазоне спектра подходящими для формирования металлической подложки характеристиками обладают золото, серебро, алюминий и медь [74]. В дополнение к ярко выраженному ППР золото химически инертно, поэтому изготовленные из него сенсорные поверхности характеризуются высокой стабильностью и низким уровнем неспецифических взаимодействий [75]. Эти факторы определили преимущественное использование золота при изготовлении чувствительных поверхностей

ППР-сенсоров. В качестве диэлектрической среды используются прозрачные материалы с высоким показателем преломления, например, кварц [76].

Для возникновения ППР необходимо, чтобы возбуждающий луч падал на границу раздела из среды с большим показателем преломления под таким углом, который обеспечивает полное внутреннее отражение [66]. Эффект полного отражения основан на том, что при прохождении света из более оптически плотной среды в менее оптически плотную преломленный луч отклоняется от нормали к поверхности раздела (угол преломления больше угла падения). Если увеличить угол падения настолько, что угол преломления станет больше 90 градусов, то свет не сможет проникнуть вглубь среды с меньшим показателем преломления, и большая часть световой энергии (при низкой экстинкции) отразится от поверхности раздела (рис. 4). Электрическое поле фотонов все же проникает в оптически менее плотную среду, но лишь на расстояние порядка длины волны света.

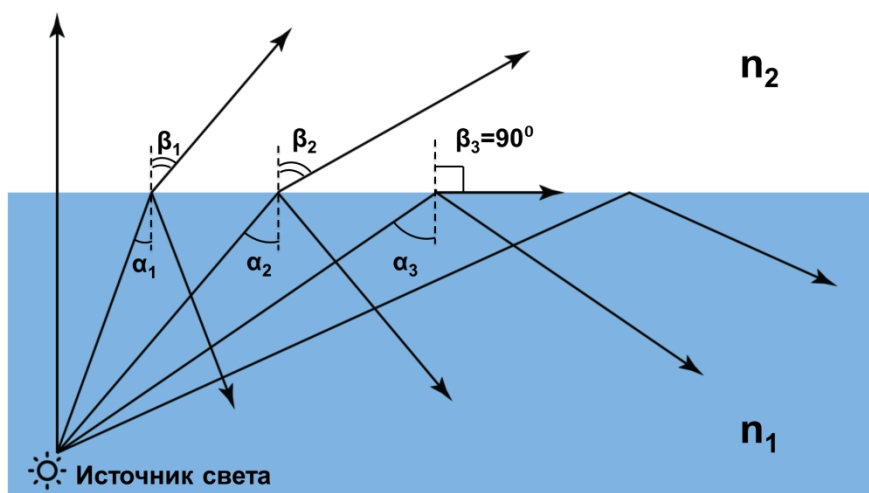


Рис. 4. Эффект полного внутреннего отражения.  $n_1$  и  $n_2$  – показатели преломления двух сред ( $n_1 > n_2$ ).  $\alpha_i$  – углы падения,  $\beta_i$  – углы преломления. Углы со значением  $> \alpha_3$  называются углами полного внутреннего отражения (в данном диапазоне преломленных лучей не существует).

Если на границу раздела двух сред поместить проводящий материал, то электромагнитное поле может возбудить в нем колебания свободных электронов. Энергия электромагнитной волны частично поглощается и рассеивается, частично расходуется на

генерацию отраженного луча и поверхностной электромагнитной волны на проводящей пленке (рис. 5). Рост передачи энергии по одному из этих путей сопровождается падением передачи по другим путям.

Результат взаимодействия электромагнитного излучения с проводником определяется соотношением частоты излучения и плазменной частоты (ПЧ) – собственной частоты колебания плотности электронного газа. ПЧ большинства металлов находится в ультрафиолетовой области спектра, являясь причиной их характерного блеска в видимом диапазоне. Для света с частотой выше ПЧ проводник прозрачен, т.к. электроны не успевают экранировать волну. Свет с частотой ниже ПЧ отражается из-за экранирования электронами. Однако, если толщина слоя проводника меньше длины волны возбуждающего света, часть световой энергии пройдет сквозь него, возбуждая поверхностный плазмон. [77; 78]. Величина проекции импульса фотона на границу сред зависит от его частоты и угла падения, а импульс поверхностного плазмона – от свойств проводника и показателей преломления граничащих с ним сред. Если импульс поверхностного плазмона и проекция вектора импульса фотона на границу раздела сред равны, часть фотонов поглотится поверхностными волнами электронных осцилляций (поверхностный плазмонный резонанс), вызвав уменьшение интенсивности отраженного света (рис. 5) [72].

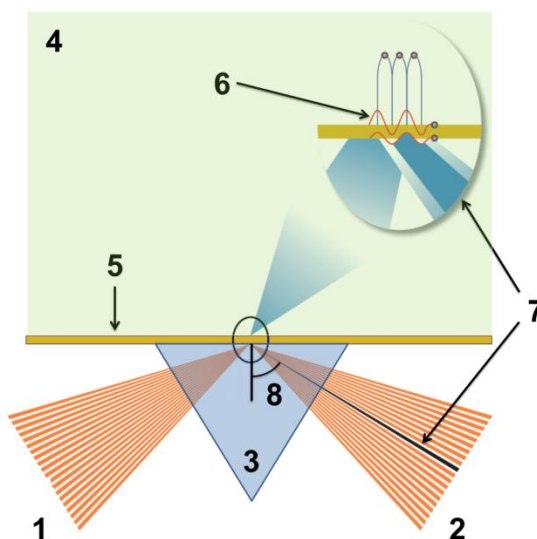


Рис. 5. Принцип возбуждения ППР. 1 – возбуждающий свет; 2 – отраженный свет; 3 – призма из диэлектрика с высоким показателем преломления; 4 – анализируемая среда; 5 – металлическая пленка; 6 – поверхностный плазмон; 7 – падение интенсивности отраженного света; 8 – угол ППР.

ППР чрезвычайно чувствителен к мельчайшим изменениям показателя преломления в приграничной области. Это позволяет детектировать образование на границе различных комплексов по изменению параметров волны, при которых возникает резонанс. Такими параметрами могут быть:

- резонансная частота возбуждающего света при фиксированном угле падения луча,
- резонансный угол падения луча при фиксированной частоте,
- амплитуда световой волны,
- фаза света.

Соответственно различают четыре типа регистрирующих устройств, основанных на измерении: угла отражения, частоты, интенсивности и фазового сдвига света. Методы ППР-анализа, основанные на измерении первых двух параметров, также носят название спектроскопии поверхностных плазмонов соответственно с частотными и угловыми спектрами [79]. Наибольшее распространение на сегодняшний день получили сенсоры с измерением резонансного угла благодаря простоте реализации, высокой чувствительности и широкому рабочему диапазону.

Электромагнитное поле поверхностной волны проникает в обе среды, причем амплитуда поля плазмонной волны экспоненциально уменьшается по мере удаления от поверхности. Поэтому к изменениям непосредственно на границе раздела сред метод наиболее чувствителен. С увеличением длины волны возрастает глубина проникновения поля – расстояние от поверхности, на котором амплитуда поля уменьшается в  $e$  (основание натурального логарифма) раз. Так, для системы золото-(диэлектрик с показателем преломления 1,32) глубина проникновения поля увеличивается со 100 нм для длины волны 600 нм до 600 нм для длины волны 1000 нм. [80].

Выделяют два варианта плоскополяризованной световой волны: s и p. s-поляризованная волна (s – senkrecht) имеет вектор электрического поля  $E$ , перпендикулярный плоскости падения. s-поляризованную волну также называют  $\sigma$ -поляризованной, сагиттально поляризованной, волной E-типа, ТЕ-волной (Transverse Electric). p-поляризация (p – parallel) означает, что вектор электрического поля волны параллелен плоскости падения. p-поляризованную волну также называют  $\pi$ -поляризованной, волной H-типа, ТМ-волной (Transverse Magnetic). С электронами взаимодействует в основном электрическая составляющая электромагнитной волны. При этом у поверхностного плазмона с вектор напряженности электрического поля



перпендикулярен границе раздела сред, т.е. он является поперечной волной. Следовательно, с поверхностным плазмоном будет сильнее взаимодействовать р-поляризованная волна. Поэтому в ППР-сенсорах чаще всего используются р-поляризованные волны [81]. Однако в последнее время все большую популярность приобретают методики регистрации ППР, основанные на фазовой модуляции отраженного света [82]. В таких методиках используются как р-, так и s-компоненты световой волны и именно различия в их взаимодействии с плазмонами обеспечивают аналитические измерения.

### ***1.3.2. Функционализация сенсорной поверхности***

Чтобы сделать связывание с сенсорной поверхностью специфическим, ее модифицируют рецепторами – антителами, ферментами, пептидами, нуклеиновыми кислотами (например, в виде аптамеров), молекулярно импринтированными полимерами [80]. Выбор метода иммобилизации зависит от химической природы рецептора [83-86]. Если определяемым соединением являются сами антитела (в серодиагностике), сенсорную поверхность модифицируют антигеном или его производным.

По типу связи, которая образуется при функционализации, выделяют ковалентные и нековалентные методы иммобилизации.

#### ***1.3.2.1. Ковалентное связывание***

С учетом того, что подавляющее большинство ППР-чипов изготавливают из золота, для которого характерно высокое сродство к сере, поверхность золотых чипов может быть напрямую модифицирована серосодержащими соединениями. Чаще всего для этого применяют N-алкилтиолы и дисульфиды, которые образуют на поверхности золота самоорганизованный монослой [87]. Такая модификация может быть первой стадией функционализации чипа, обеспечивающей возможность дальнейшего присоединения различных химических групп.

Для ковалентной пришивки amino-содержащих лигандов обычно используют чипы, покрытые слоем карбоксилированного декстрана, которые активируют смесью N-гидроксисукцинимидом и этил-(диметиламинопропил)карбодиимида (карбодиимидная реакция). В результате образуются короткоживущие эфирные группы, которые далее реагируют с аминогруппами лиганда с образованием амидной связи. В случае белковых лигандов реакционно способными могут быть аминогруппы лизина или N-концевые аминогруппы. В ряде случаев используются модификации этой реакции с

иммобилизацией лигандов за тиольные и альдегидные группы [83; 88]. Данный подход пригоден также для ковалентной иммобилизации нуклеиновых кислот и их производных (например, с использованием, дитиобис(N-сукцинимидилпропионата)) [89; 90].

Используя ковалентную пришивку сахаридных фрагментов, можно проводить и сайт-направленную иммобилизацию антител, поскольку большинство из них гликозилировано. Олигосахаридные цепи антитела окисляются и затем связываются с аминами, гидразинными, семикарбазидными и другими группами на поверхности сенсора. Недостатком окислительного способа пришивки является возможность нарушения структуры антитела во время окисления [91]. Для ковалентного связывания сахаридов можно также использовать 3-аминофенилборную кислоту. Сначала аминогруппа кислоты ковалентно связывается на поверхности карбоксилированного чипа посредством описанной выше карбодиимидной реакции. Затем свободные  $-B(OH)_2$  группы 3-аминофенилборновой кислоты взаимодействуют с сахаридными фрагментами, формируя циклический эфир через цис-1.2 или 1,3-диоловые группы. [92]. Недостатком данной методики являются значительные отличия в связывающей способности борных кислот по отношению к различным сахаридам. Поскольку гликозилированные фрагменты разных антител различаются по составу, то и эффективность иммобилизации сильно варьирует для разных препаратов антител [93].

#### 1.3.2.2. Нековалентное связывание

Ряд методов нековалентной иммобилизации базируется на использовании дополнительных высокоаффинных взаимодействий. При этом на поверхности чипа ковалентно закрепляется один из двух взаимодействующих реагентов, а с ним нековалентно связывается второй. Наиболее распространенные из таких пар: антитела – антивидовые антитела; авидин (или стрептавидин, нейтравидин, траптавидин) – биотинилированные лиганды; IgG – IgG-связывающие белки (например, белок A *Staphylococcus aureus*, белок G *Streptococcus* spp.); комплементарные фрагменты ДНК и др. [94-98].

Широко применяется иммобилизация белков, содержащих так называемый Histag (последовательность из шести гистидиновых аминокислотных остатков) [99]. При этом поверхность чипа модифицируют ионообменным соединением NTA (нитрилотриацетатом). При взаимодействии с Histag-содержащим белком образуются три хелатных комплекса из двух остатков гистидина, одного иона бивалентного металла и одной молекулы NTA. Эти комплексы могут быть разрушены добавлением

конкурирующего лиганда (например, имидазола) или хелатного реагента (например, этилендиаминтетрауксусной кислоты).

Отдельную группу нековалентной иммобилизации представляют методы иммобилизации на основе гидрофобных взаимодействий. С их помощью на чипе с гидрофобными ацильными «якорями» проводят иммобилизацию липидных моно- и бислоев, липидных мицелл и липосом [88].

### ***1.3.3. Серийные ППР-сенсоры***

Первый коммерчески доступный ППР-биосенсор был представлен шведской компанией Pharmacia Biosensor AB в 1990 г. В 1996 г. компания изменила название на Biacore AB Corporation и является абсолютным лидером на рынке ППР-биосенсоров [100]. Со времени представления первого ППР-биосенсора компания разработала более 10 модификаций, повышая чувствительность и точность анализа, степень его автоматизации и реализуя высокопроизводительные мультиплексные технологии измерений.

Несмотря на доминирование Biacore на рынке ППР-биосенсоров, в последнее время все большее количество компаний представляют свои разработки в данном направлении. Описан ряд альтернативных ППР-платформ, которые находятся на разных стадиях разработки и коммерциализации [66; 101].

### ***1.3.4. Принцип работы системы Biacore***

Система Biacore использует схему возбуждения ППР в призмной конфигурации Отто-Кречманна. Прибор работает в режиме углового сканирования, то есть измеряемым параметром является резонансный угол.

Предел детекции прибора Biacore X сопоставим с изменением сигнала на одну резонансную единицу (resonance units – RU), что соответствует поверхностной плотности связанного с чипом белка около  $1 \text{ пг/мм}^2$ . [66].

#### ***1.3.4.1. Проточная микроячейка***

Сенсорная поверхность формирует одну из стенок проточной ячейки, в которую через систему микроканалов подается исследуемая проба (рис. 6).



Рис. 6. Схема микрожидкостной проточной ячейки [75].

Сенсорный чип *Biacore* имеет два основных компонента:

- 1) Стекло, покрытая тонким (примерно 50 нм) слоем золота, обеспечивает отражение света и возможность генерации ППР сигнала. Этот компонент является неизменным для всех типов чипов *Biacore*.
- 2) Контактная с проточной ячейкой золотая поверхность, которая может быть дополнительно модифицирована теми или иными реакционноспособными группами. Покрытие поверх слоя золота обеспечивает одновременно условия для присоединения лиганда и окружение, в котором будут происходить изучаемые взаимодействия. Покрытие не влияет на ППР эффект и варьирует для различных типов чипов. Для иммобилизации гидрофобных молекул используют матрикс из тиаолканов (НРА чипы), а для других случаев – карбоксиметилированный декстран (СМ чипы). На карбоксиметилированный декстран можно иммобилизовать молекулы посредством их пришивки через амино-, тиольные или альдегидные группы. Гибкость декстранового матрикса толщиной 100 нм позволяет иммобилизованным лигандам почти свободно колебаться на поверхности чипа. Существуют также чипы без покрытия, рабочую поверхность которых можно модифицировать самостоятельно.

#### 1.3.4.2. Проведение измерений и расчет констант

Экспериментальная характеристика межмолекулярных взаимодействий в системе *Biacore* включает:

1. иммобилизацию одного из компонентов взаимодействующей пары на сенсорной поверхности чипа;

2. пропускание раствора, содержащего второй компонент взаимодействующей пары, над поверхностью чипа с одновременной регистрацией их взаимодействия ;
3. регистрацию диссоциации образовавшегося комплекса, когда второй компонент пары прекращает поступать в ячейку;
4. регенерацию сенсорной поверхности специальными растворами, разрушающими образовавшийся комплекс, но не повреждающими иммобилизованный компонент;
5. повторение стадий 2-4 с другими препаратами, реагирующими с иммобилизованным компонентом.

Показания прибора, представленные в виде зависимости сигнала от времени, носят название сенсограммы – см. ее пример на рис. 7.

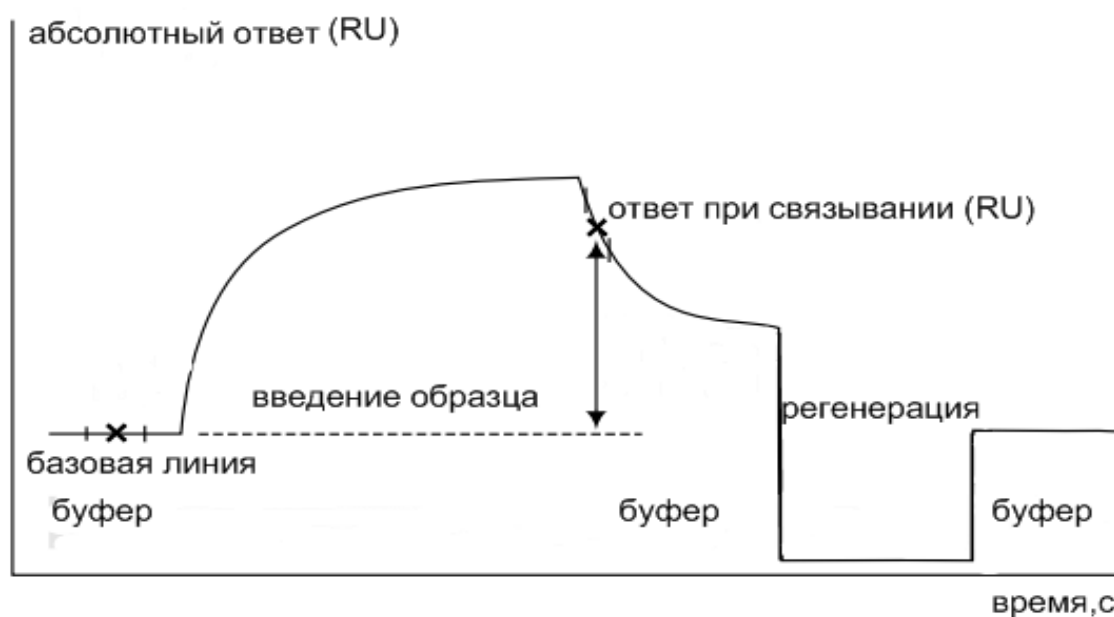


Рис. 7. Пример сенсограммы BIAcore™.

Чтобы иметь возможность рассчитать кинетические и равновесные константы исследуемого взаимодействия, может потребоваться получение нескольких сенсограмм при разных концентрациях пропускаемого через ячейку компонента пары. Расчет параметров можно проводить программными средствами Biacore (BIAevaluation) или с помощью других средств по формулам:

$$R_{eq} = (K_a \cdot C \cdot R_{max}) / (1 + K_a \cdot n \cdot C),$$

где  $R_{eq}$  – уровень связывания,  $R_{max}$  – максимальный наблюдаемый уровень связывания,  $C$  – концентрация аналита,  $n=1$  – стерический фактор.

$$R=R_0 e^{-kd(t-t_0)} + \text{Offset},$$

где  $R$  – значение сигнала при значении времени  $t$ ,  $R_0$  – значение сигнала в начале участка диссоциации (при значении времени  $t_0$ ),  $\text{Offset}$  – фоновый уровень сигнала.

$$K_A (1/M) = k_a/k_d;$$

$$K_D (M) = k_d/k_a.$$

$K_A$  и  $K_D$  – равновесные константы ассоциации и диссоциации соответственно,  $k_a$  и  $k_d$  – кинетические константы ассоциации и диссоциации соответственно.

Метод ППР дает информацию о кинетических и равновесных параметрах формирования специфичных комплексов, необходимую для понимания и моделирования соответствующих процессов в других системах. Система *Viascore* является проточной, поэтому полученные закономерности кинетики формирования специфичных комплексов дают представления об аналогичных процессах в ИХА.

#### **1.4. Моделирование иммунохроматографии**

Для построения теории функционирования аналитической системы и описания ее возможностей необходимо создание математической модели проходящих в ней процессов.

Построение аналитической (нечисленной) модели иммунохроматографических систем в неравновесных условиях является чрезвычайно сложной задачей. Поэтому описанные в литературе модели, учитывающие неравновесность процессов, используют исключительно численные подходы для расчета кинетики иммунных взаимодействий [102-104].

Qian и Bai в 2003-2004 гг. впервые разработали аналитическую (нечисленную) модели ИХА в «сэндвич» и, позднее, в конкурентном форматах анализа [105; 106]. Их модель в «сэндвич»-формате ИХА была позднее применена Ragavendar и Anmol для расчёта оптимального положения аналитической зоны на мембране тест-полоски [107]. К настоящему моменту данные работы являются единственными примерами аналитического моделирования иммунохроматографии.

Рассмотрим подробнее предложенную Qian и Bai модель «сэндвич»-формата иммунохроматографии, как наиболее близкую к формату иммунохроматографической серодиагностики.

Авторы вводят систему уравнений, учитывающую кинетику реакций комплексообразования, диффузию и поток жидкости в тест-полоске:

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2[A]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[A]}{\partial x} - (F_{PA} + F_{RA}),$$

$$\frac{\partial[PA]}{\partial t} = D_P \frac{\partial^2[PA]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[PA]}{\partial x} + (F_{PA} - F_{RPA}^1),$$

$$\frac{\partial[P]}{\partial t} = D_P \frac{\partial^2[P]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[P]}{\partial x} - (F_{PA} + F_{RPA}^2),$$

где А – определяемое соединение (аналит); Р – центры связывания аналита на маркере; R – рецептор в аналитической зоне для связывания аналита; AP – комплекс аналита с маркером; AR – комплекс аналита с рецептором; APR – комплекс аналита с маркером и рецептором в аналитической зоне; x – координата положения на тест-полоске (система считается одномерной);  $F_n$  – скорости образования n-ого комплекса; U – скорость потока жидкости;  $D_p$  – коэффициент диффузии.

Выражения вида  $U \cdot d[\text{концентрация реагента}]/dx$  – это члены уравнений, учитывающие изменение концентрации соответствующего реагента (А, Р, или AP) в точке с координатой x из-за потока жидкости. Выражения вида  $D_p \cdot d^2[\text{концентрация реагента}]/dx^2$  – это члены уравнений, учитывающие изменение концентрации соответствующего реагента (А, Р, или AP) в точке с координатой x из-за диффузии в соответствии со вторым законом Фика. Комплексы, содержащие R, образуются только в аналитической зоне; поэтому их концентрация не зависит от потока и диффузии.

Принимаемое допущение [105; 108] о том, что распределение компонентов в потоке подчиняется второму закону Фика, не учитывает ряда факторов: неспецифических взаимодействий с мембранами, возможности перемешивания реагентов до введения в аналитическую систему, десорбции реагентов с подложки и др. Поэтому реальные процессы диффузии в иммунохроматографической системе не могут быть учтены в полной мере. Qian и Van [105], вводя в уравнения параметры, отражающие диффузионные процессы, реально анализируют упрощенный вариант для равномерно распределенных по объему реагентов.

Далее Qian и Вau приступают к решению уравнений, описывающих процессы комплексообразования AP, AR и APR:

$$F_{PA} = k_{a1}[A][P] - k_{d1}[PA]$$

$$F_{RA} = k_{a2}[A]([R_0] - [RA] - [RPA]) - k_{d2}[RA] - k_{a4}[RA][P] + k_{d4}[RPA]$$

$$F_{RPA} = F^1_{RPA} + F^2_{RPA}$$

$$F^1_{RPA} = k_{a3}[PA]([R_0] - [RA] - [RPA]) - k_{d3}[RPA]$$

$$F^2_{RPA} = k_{a4}[RA][P] - k_{d4}[RPA]$$

где  $k_{ai}$  – кинетические константы ассоциации  $i$ -ой реакции,  $k_{di}$  – кинетические константы диссоциации  $i$ -ой реакции.

Однако данная система уравнений также аналитически не решается в общем случае. Поэтому авторы дополнительно вводят приближение равновесных условий, что позволяет рассчитать концентрацию окрашенного комплекса в аналитической зоне (пропорциональную регистрируемой интенсивности окрашивания) по уравнению:

$$APR = \frac{K_2 R_0 AP_e}{1 + K_3 AP_e R + K_2 A}, \text{ где}$$

$$AP_e = \frac{1}{2} \left( A_0 + P_0 + \frac{kd_1}{ka_1} - \sqrt{A_0 + P_0 + \frac{kd_1}{ka_1} - 4 P_0 A_0} \right)$$

Индекс «e» обозначает равновесную концентрацию, индекс 0 – начальную.

Отметим, что данная зависимость имеет ограниченное применение, так как равновесные условия не всегда достигаются в иммунохроматографии. Например, согласно данным Ragavendar и Anmol [107], при параметрах, адекватных с точки зрения свойств реальных иммунореагентов:  $A_0 = 10^{-8}$ ;  $P_0 = 10^{-8}$ ;  $k_a = 10^6$ ;  $k_d = 10^{-3}$  и скорости потока жидкости 0,5 мм/сек, реакции на тест-полоске приблизятся к равновесным, только если аналитическая зона будет находиться на расстоянии около 12 см от места нанесения



пробы. Данное расстояние значительно больше размеров стандартного иммунохроматографического теста (5-7 см). То есть в реальных ИХ-системах реакции будут протекать как правило в неравновесных условиях, что не позволяет применять для их описания модели, предложенные Qian и Van.

Таким образом, существующие аналитические модели ИХ-систем имеют крайне ограниченную сферу применения, а модели ИХ-систем для определения специфических антител на данный момент не разработаны.

### **1.5. Диагностика туберкулеза и бруцеллеза**

Разработку иммунохроматографических тест-систем для серодиагностики проводили на примере определения специфических антител против антигенов двух возбудителей экономически и социально значимых заболеваний: бруцеллеза крупного рогатого скота и легочного туберкулеза людей. Данные объекты были выбраны по причине повышения востребованности новых методов массовой диагностики данных заболеваний на фоне ухудшения эпидемиологической и эпизоотической ситуации.

#### **1.5.1. Туберкулез**

Несмотря на значительные успехи борьбы с туберкулезом (к 2015 г. смертность от туберкулеза снизилась на 47% по сравнению с 1990 г.), он остается одной из крупнейших угроз здоровью людей в мире. Только за 2014 г. от туберкулеза умерло свыше 1,5 млн человек, из них 140 000 – дети до 15 лет. Всего в 2014 г. зарегистрировано около 9,6 млн новых случаев туберкулеза [109].

В Российской Федерации ситуация с заболеваемостью туберкулезом остается тяжелой: согласно данным ЦНИИ организации и информатизации здравоохранения за 2015 г. заболеваемость активным туберкулезом составила 59,5 человека на 100 тыс. населения (всего более 80 тыс. заболевших за 2015 г.), что в 1,5 раза больше, чем в 1991 г. Ситуация усугубляется распространением ВИЧ-инфекции, которая существенно повышает тяжесть туберкулезного заболевания: в 2015 г. показатель «туберкулез + ВИЧ-инфекция» превысил 12 тыс. человек против 6,2 тыс. человек в 2009 г. [110].

##### **1.5.1.1. Методы диагностики легочного туберкулеза**

Ключевыми требованиями, предъявляемыми к современным средствам массовой диагностики, являются стоимость анализа, время получения результата и его надежность. Надежность результатов тестирования определяется, прежде всего, параметрами

диагностической чувствительности (процентное отношение положительных результатов тестирования к общему количеству положительных проб) и диагностической специфичности (процентное отношение отрицательных результатов тестирования к общему количеству отрицательных проб). Повышение значений данных параметров является одним из приоритетных направлений развития современных диагностических систем.

Несмотря на длительную историю разработок средств диагностики туберкулеза, проблема эффективного и достоверного теста остается нерешенной. Все основные подходы имеют принципиальные ограничения. Лабораторная диагностика туберкулеза традиционно полагается на флюорографические обследования, микроскопию мазков мокроты и культивирование *M. tuberculosis* из клинических проб [111]. Рентгенофлюорография выявляет лишь развившиеся очаги поражения и неэффективна для ранних стадий и вялотекущих заболеваний. Массовое выявление туберкулеза, основанное на флюорографических обследованиях, крайне затруднено вследствие высокой стоимости оборудования и недостаточной результативности анализа.

Для первичного микробиологического анализа используется бактериоскопия образцов (как правило, мокроты), взятых от больного для микроскопического выявления бактерий методом окрашивания по Цилю-Нильсену. Этот объективно быстрый метод обладает высоким пределом обнаружения (минимальная детектируемая концентрация возбудителя – 10.000 клеток на 1 мл). Применение микробиологических методов ограничивает высокая частота заболевания без активного выделения микобактерий с мокротой. Поэтому их чувствительность сильно варьирует (25–80%) в зависимости от стадии и формы заболевания [112]. Кроме того, окрашивание по Цилю-Нильсену не является абсолютно специфичным. Применение магнитных частиц с сорбированными антителами решает проблему специфичности, однако чувствительность остается невысокой. В среднем лишь для половины больных бактериоскопическая диагностика оказывается эффективной [112].

Гораздо более чувствителен бактериологический метод – посев зараженного материала на специфические среды. Однако его существенный недостаток, обусловленный особенностями микобактерий, – длительность (1-1,5 месяца). Для сокращения времени анализа компанией «BD» предложена система ВАСТЕС, позволяющая регистрировать делящиеся клетки на ранних стадиях развития и тем самым ускорить диагностику в два раза [113]. Однако, поскольку детекция бактерий в системе ВАСТЕС производится косвенным образом, метод неспецифичен и дает

ложноположительные результаты. Кроме того, для реализации этого метода необходимы специальное аппаратное обеспечение и расходные материалы.

Для улучшения ситуации предложен ряд альтернативных дорогостоящих методов диагностики туберкулеза: высокоэффективная жидкостная и газо-жидкостная хроматография миколитических кислот, ПЦР [111; 112]. Данные методы высокочувствительны, но дают значительное число ложноположительных диагнозов вследствие наличия в организме человека других микроорганизмов, частично сходных с *M. tuberculosis*. ПЦР-диагностика остается дорогостоящим и не всегда надежным методом. Кроме того, из-за сверхвысокой чувствительности ПЦР очень зависит от квалификации персонала и соблюдения особых требований к лабораторным помещениям [114].

В ряду существующих аналитических методов значительный интерес представляют подходы, относящиеся к иммунодиагностике. Методы иммунодиагностики можно разделить на две группы, основанные на выявлении клеточного или гуморального иммунного ответа.

К первой группе относятся туберкулиновый кожный тест и антиген-специфичная индукция образования гамма-интерферона. Кожные туберкулиновые пробы часто дают ложноположительные результаты вследствие вакцинации детей BCG и/или контакта с непатогенными природными микобактериями. Зачастую положительный результат тестирования связан просто с повышенной чувствительностью кожи обследуемого, вследствие чего возникающее раздражение кожи ошибочно воспринимают как реакцию на туберкулин. Более достоверна диагностика, основанная на антиген-специфичной индукции образования гамма-интерферона, с чем связано повышенное внимание к данному методу в последние годы [115].

Ко второй группе методов иммунодиагностики относят методы выявления специфических антител против антигенов возбудителей заболевания (серодиагностика), реализованные с использованием различных подходов: радиоиммуноанализ, твердофазный иммуноферментный анализ, иммунофлуоресцентный анализ, иммуноагглютинация, иммунохроматографический анализ и др. [111].

### 1.5.1.2. *Mycobacterium tuberculosis* и его антигены

Возбудителями туберкулезной инфекции у людей, как правило, являются бактерии вида *Mycobacterium tuberculosis*. Они не имеют вирулентных факторов, которые являлись бы основной причиной заболевания – таких, как токсины, продуцируемые *Corinebacterium diphtheriae* или *Vibrio cholerae*. Многолетняя практика массовой вакцинации населения в ряде стран с использованием близкородственной бактерии штамма *M. bovis* BCG осложняет диагностику туберкулеза.

Обнаружено несколько десятков иммунодоминантных антигенов *M. tuberculosis* и охарактеризована их диагностическая эффективность [114; 116]. Показана также потенциальная перспективность использования полиантигенных смесей для серодиагностики туберкулеза [117].

Считается, что предок *M. tuberculosis* комплекса, состоящего из *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* и *M. microti*, произошел от почвенной бактерии и что человеческие бациллы стали производными от форм, поражающих крупный рогатый скот, в процессе одомашнивания [118]. Геном *M. tuberculosis* состоит из 4.000 генов. *M. tuberculosis* радикально отличается от других бактерий большим количеством продуцируемых белков, вовлеченных в липогенез и липолиз, и двумя новыми семействами PE и PPE белков, богатых глицином, (PE и PPE), которые являются потенциально пригодными для диагностики туберкулеза антигенами [119-122].

Вакцинный штамм BCG является производной от штамма *M. bovis*. Генетические различия между вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, вирулентным *M. bovis* и ослабленным BCG и хронология изменений, приведших к появлению новых штаммов, были исследованы методом субтрактивной геномной гибридизации [123]. Выявлены три региона генома *M. tuberculosis* (RD1-RD3), отсутствующие в BCG. RD3, 9.3-kb фрагмент генома представлен в вирулентных лабораторных штаммах *M. bovis* и *M. tuberculosis*, отсутствует как в BCG, так и в 84% вирулентных клинических изолятов. RD2, 10.7-kb фрагмент, содержащий уникальный повторяющийся элемент и ранее идентифицированный *mpt-64* ген, сохранился во всех протестированных вирулентных лабораторных и клинических туберкулезных бациллах и отсутствовал только в субштаммах, произошедших от оригинального штамма BCG после 1925 г. Таким образом, RD2 делеция произошла позже, чем возник оригинальный штамм BCG. RD1, 9.5-kb сегмент отсутствовал во всех штаммах BCG и сохранился во всех протестированных вирулентных лабораторных и клинических изолятах *M. bovis* и *M. tuberculosis*. RD1 фрагмент был детально изучен, и несколько антигенов, кодируемых им, охарактеризованы

как кандидаты для диагностики туберкулеза. В частности, ранний секретируемый антиген (ESAT-6) и белок культурального фильтрата 10 кДа (CFP-10), локализованные в этой области, активно применяются для диагностики туберкулеза [122]. На сегодняшний день широкое распространение получили диагностические наборы с использованием данных антигенов: T-Spot Тест (Австралия, с 2001 г), Quanti FERON-TB Gold (США, с 2005 г), anda-tb ELISA (Франция, с 2009 г), ELISA IP-10 (Германия, с 2010 г.).

Полагают, что эффективная диагностика может быть достигнута с использованием “мультиантигенных коктейлей” [117; 124-128]. Недавнее исследование диагностической эффективности применения различных смешанных антигенных препаратов, проведенное Дятловой В.И. [129], показало наибольшую достоверность серодиагностики для двух мультиантигенных смесей: pRv2875+eRv3875Ag+eRv3874 и pRv2875+eRv3875Ag+eRv3425 – чувствительность 92% для обеих смесей и специфичность 93,3% и 90% соответственно.

В течение последних двух десятилетий уделяли пристальное внимание иммунному ответу на следующие выделенные и очищенные антигены: 38 kDa (PhoS), 30/31 kDa (антиген 85), 19 kDa липопротеин, 14 kDa, 16 kDa (ACR) и липоарабиноманнан (LAM) [111; 130-132]. В качестве потенциальных антигенов для серодиагностики логично рассматривать группу секретируемых и окружающих бактерию белков, а также компоненты клеточной поверхности, вызывающих сильный иммунный ответ с высоким титром антител в крови (HspX, ESAT6/CF-10, 19-kDa protein, Glutamine synthase).[133].

К перспективным антигенам относят также: Mtb8.4, Mtb8, Mtb81, PPE55, MPT63, MPT64, MPT51, MTC28, MPT32, KatG [117; 134-137]. Панель из 35 рекомбинантных аналогов натуральных антигенов, ранее идентифицированных протеомными и геномными исследованиями, была охарактеризована Weldingh и соавт.[116]. Из них была выделена группа антигенов, позволяющих с наибольшей эффективностью различать больных и здоровых доноров. В эту группу попали 15 антигенов, среди которых оказались ранее упомянутые ESAT6 и 38-kDa. Далее провели тест на специфичность и отобрали антигены, потенциально эффективные для использования в диагностике: TB7.3, TB9.7, TB.9, CFP10, TB13.4, TB15.3, TB16.3, CFP17, CFP21, 38-kDa антиген, TB51. Наиболее чувствительными среди высокоспецифичных антигенов оказались TB9.7, TB15.3, TB16.3 и TB51 - белки, секретируемые или присутствующие в клеточной стенке *M. tuberculosis*.

Другой группой исследователей [136] была проведена характеристика тринадцати рекомбинантных белков *M. tuberculosis* как средств диагностики туберкулеза по уровню

специфических антител в сыворотке крови. При анализе специфических IgG оптимальным из изученных антигенов для целей диагностики оказался рекомбинантный конъюгат белков CFP10 и ESAT6; несколько худшие характеристики получены для белков MTB48, Rv1636, Rv2430 и белка теплового шока HSP65. В случае IgM сопоставимые характеристики – специфичность и эффективность в диапазоне 60-66% – имели рекомбинантные белки MTB12, MTC28, MTB48, Rv2430, Rv3873, HSP65, HSP70 и CFP10-ESAT6.

#### *1.5.1.3. Rv0934 (TB 38-kDa), общая характеристика и применение в серодиагностике*

Антиген Rv0934 (известный также как антиген 38 кДа, Ag78, antigen 5, PhoS, PstS1) – периплазматический фосфат-связывающий липопротеин молекулярной массой около 38 кДа, представляется одним из наиболее перспективных для серодиагностики туберкулеза [138]. Антиген 38-kDa *M. tuberculosis* с молекулярной массой 37,7 kDa имеет теоретически вычисленное значение  $pI$  5,14 (по данным PDB). Многие коммерческие серодиагностические тесты разработаны на основе применения 38-kDa антигена, который стал самым популярным из индивидуальных антигенов *M. tuberculosis* [139]. В настоящее время, как правило, используют рекомбинантные 38-kDa антигены. Нативный белок, являясь липопротеином, значительно отличается от рекомбинантных аналогов, что приводит к ухудшению чувствительности и специфичности тест-систем при использовании рекомбинантного аналога [140].

При росте микобактерий в культуральной среде происходит накопление свободного липопротеина Rv0934. Идентифицированы два неперекрывающихся антигенных эпитопа, распознаваемые антителами: С-концевой участок белка и домен, локализованный в средней части молекулы [141]. Как установили Andersen и Hansen, часть антител, которая связывается с целым пептидом, теряет такую способность при удалении части аминокислот с С-концевого участка; другая часть антител продолжает связываться с пептидом даже при удалении 91 аминокислоты с С-концевого участка. Но ни одно антитело не связывалось с фрагментом из 117 аминокислот с N-концевого участка пептида [142].

Эффективность применения данного антигена в серодиагностике зависит от множества факторов, в частности этнического происхождения обследуемых, формы и стадии заболевания [111; 143; 144]. Эти факторы определяют значительные расхождения в оценке чувствительности серодиагностики с использованием данного антигена: от 10 до 90%. Чувствительность ИФА-серодиагностики на Rv0934 в российской популяции

достигает 84,7% [141]. Таким образом, антиген Rv0934 (38кДа) представляется очень перспективным для обнаружения специфических антител.

### 1.5.2. Бруцеллёз

Бруцеллёз – зоонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella*. В 1929 г. I. Huddleson предложил классифицировать бруцеллы на основании вида животного – основного хозяина бактерии. Первоначально были выделены три вида бруцелл – *Brucella melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*. Затем род был дополнен другими видами – *B. neotomae*, *B. ovis* и *B. canis*, позже *B. rangiferi* и *B. maris* [145]. В табл. 1 приведены данные о видовом разнообразии и патогенности бруцелл для человека.

Табл. 1. Номенклатура бруцелл (по Хеддльсону) [145]

<b>Вид</b>	<b>Природный хозяин</b>	<b>Патогенность для человека</b>
<i>B. abortus</i>	Крупный рогатый скот	Да
<i>B. melitensis</i>	Овцы, козы	Да
<i>B. suis</i>	Свиньи, зайцы, грызуны	Да
<i>B. canis</i>	Собаки	Да
<i>B. ovis</i>	Овцы	Нет
<i>B. neotomae</i>	Пустынные кустарниковые крысы	Нет
<i>B. rangiferi</i>	Северные олени	Да
<i>B. maris</i>	Морские млекопитающие	?

Бруцеллез относится к наиболее опасным зоонозным заболеваниям из-за огромного экономического ущерба и высокой вероятности передачи инфекции человеку. Хотя бруцеллез относительно редко приводит к летальному исходу, последствия заражения

могут быть крайне тяжелыми. Бруцеллы могут вызывать патологическое изменение костной ткани, часто поражают сердечнососудистую, нервную и половую системы [146; 147]. Медленно протекающее заболевание трудно диагностировать по симптомам, что не позволяет своевременно начать необходимые санитарные и лечебные мероприятия. Поэтому эффективная скрининговая диагностика имеет принципиальное значение для борьбы с бруцеллезом.

#### *1.5.2.1. Современное состояние заболеваемости крупного рогатого скота (КРС) бруцеллёзом в России*

Несмотря на отмеченное в 2015 г. значительное сокращение общих случаев бруцеллеза КРС (по данным Россельхознадзора) – на 24,5% по сравнению с 2014 г., ситуация продолжает оставаться напряженной. По количеству выявленных случаев заражения КРС опасными инфекциями в РФ в 2015 г. бруцеллез находится на втором месте после лейкоза, а по количеству выявленных неблагополучных пунктов – на первом. Согласно докладу информационно-аналитического центра Россельхознадзора за 2015 г. [148], эпизоотическая ситуация по бруцеллезу в нашей стране продолжает ухудшаться с негативным прогнозом. Эти факты свидетельствуют о низкой эффективности противобруцеллезных мероприятий в Российской Федерации, что в значительной степени обусловлено ограниченностью средств ветеринарной диагностики, используемых для массовых обследований.

#### *1.5.2.2. Методы диагностики бруцеллёза КРС*

Существующие в настоящее время способы диагностики бруцеллеза могут быть разделены на следующие четыре основные группы:

1. Бактериологический метод – выращивание бактерий на специфичных питательных средах. Метод отличается высокой чувствительностью и надежностью, а также возможностью классификации выявленного организма до биовара. Основным недостатком метода является длительность получения результата – несколько недель, благодаря чему метод редко применяется на практике.

2. Биологический метод – заражение восприимчивых животных патогенным материалом – обладает высокой чувствительностью, но сохраняет недостатки бактериологического метода.

3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод специфического копирования участков ДНК – чрезвычайно чувствителен и специфичен и позволяет получать результат в течение нескольких часов. Однако данный метод требует использования дорогостоящего



оборудования и расходных материалов, высококвалифицированного персонала и может проводиться только в специальных помещениях, защищенных от контаминации посторонними ДНК. Поэтому он, как и первые два метода, мало пригоден для массовых обследований

4. Серологические методы диагностики – широкий класс методов, основанный на выявлении гуморального иммунного ответа инфицированного организма на присутствие патогена. К серологическим методам относятся агглютинационные тесты (реакция агглютинации – РА), иммунодиффузия, иммуноэритроадсорбционный метод (ИЭАМ), радиоиммуноанализ (РИА), иммунофлуоресцентный метод анализа (РИФ), dot-иммуноанализ (ДИА), иммуноблоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и некоторые другие. Серологические методы в наибольшей степени подходят на роль средств первичной массовой диагностики бруцеллеза из-за высокой производительности, экономичности и чувствительности. К данному классу методов относится и иммунохроматографическая серодиагностика, которая является предметом нашего исследования. Помимо обладания всеми преимуществами других серологических методов иммунохроматография позволяет проводить диагностику во внелабораторных условиях непосредственно на месте отбора проб, что существенно ускоряет процесс получения результата и расширяет возможности мониторинга инфекции.

#### *1.5.2.3. Антигенная структура бруцелл*

Бруцеллы – очень гомогенный род бактерий, исследования ДНК-гибридизации показывают более чем 90%-ную идентичность генома разных видов бруцелл [149]. Как следствие, бактерии разных видов имеют очень сходный набор антигенов, о чем свидетельствуют перекрёстные серологические реакции и сходство спектрограмм протеиновых и полисахаридных фракций. Тем не менее, полной антигенной идентичности между бруцеллами даже в пределах одного вида нет [145].

Имеется большое количество клеточных компонентов бруцелл, обладающих антигенными свойствами, но наиболее часто используемый из них – это бактериальный липополисахарид (ЛПС) – один из главных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Основные функции ЛПС – структурная и защитная. ЛПС отвечает за целостность клетки бактерии в агрессивной внешней среде. Схематичное изображение клеточной оболочки бруцелл и структуры их ЛПС представлено на рис. 8 [150]. Выделяют три формы бруцелл: S-, R- и L-, отличающиеся по степени деградации клеточной оболочки, в том числе ЛПС. ЛПС бруцелл в S-форме (smooth) состоит из полного набора структурных элементов: липидного фрагмента (липид А),

олигосахаридного ядра (кор) и так называемого О-полисахарида. Выделенный ЛПС часто бывает ковалентно связан с белками наружной мембраны. О-полисахарид является главной иммунодоминантной частью ЛПС, поэтому часто называется О-антигеном [151]. При потере О-антигена в структуре ЛПС бактерия переходит в R-форму (rough). ЛПС S-форм бруцелл может диссоциировать частично, что приводит к появлению промежуточных SR- или RS- форм. L-формы бруцелл полностью теряют клеточную оболочку вплоть до внутренней мембраны и, соответственно, лишены ЛПС.

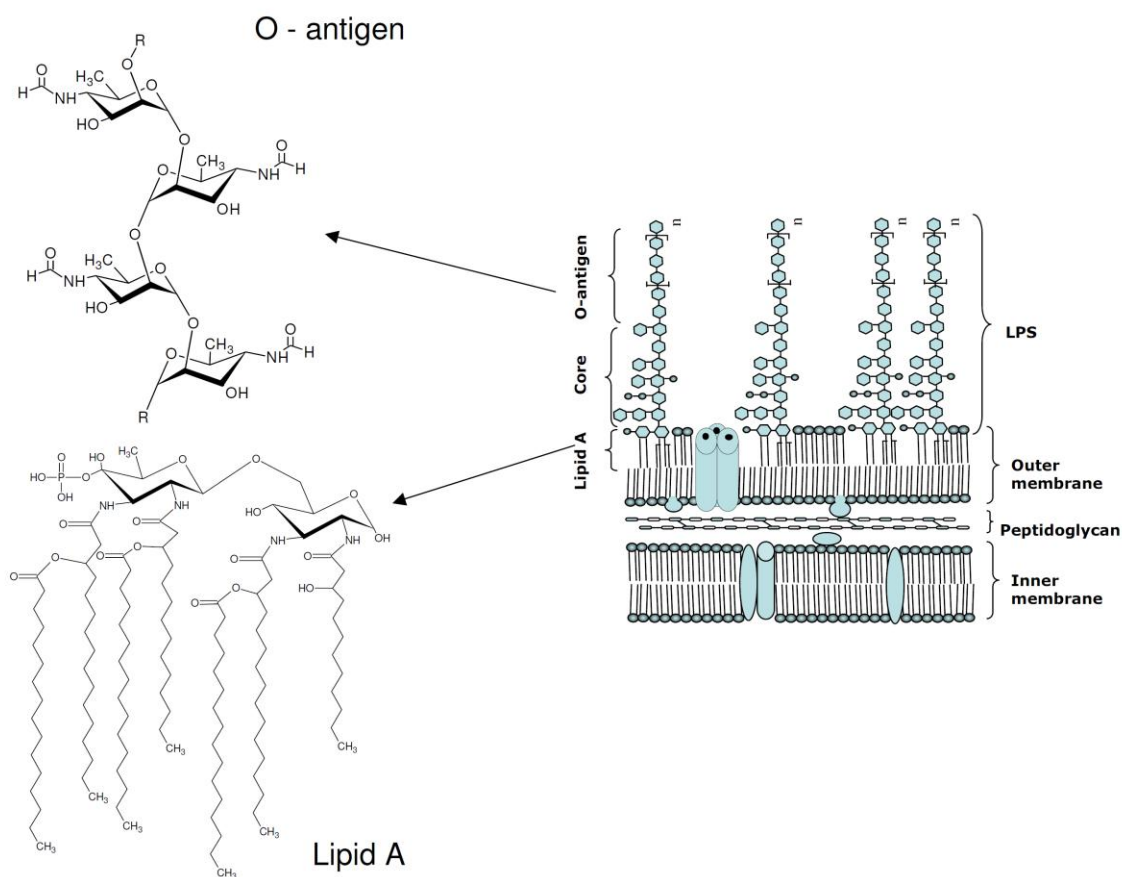


Рис. 8. Структурная организация клеточной оболочки и ЛПС бруцелл [150].

По структуре О-антигена S-бруцеллы подразделяют на тип А- (А – abortus) и тип М (М – melitensis), которые отличаются положением связей между 4,6-дидезокси-4-формами- $\alpha$ -D-маннопиранозильными остатками, представляющими собой элементарные звенья О-полисахарида (обычно 96-100 звеньев) [152]. У разных видов бруцелл сочетание антигенных эпитопов А- и М- типа может сильно отличаться. На основании этих различий сначала были выделены три серотипа бруцелл: А<sup>+</sup>М<sup>-</sup>, А<sup>-</sup>М<sup>+</sup>, А<sup>+</sup>М<sup>+</sup>. Затем, после открытия С-эпитопа (общего для всех S-бруцелл) и его разновидности С/У – на пять типов по эпитопной специфичности: С (М>А), С (М=А), С/У (М>А), С/У

(M=A) и C/Y (A>M). Последний эпитоп C/Y является общим для S-бруцелл и *Yersinia enterocolitica* 0:9 и является причиной частых перекрестных серологических реакций между этими бактериями. Обозначения M>A, M=A и A>M показывают превалирование A- или M-детерминанты или примерно равное их соотношение в ЛПС [151].

Rojas и соавт. при анализе 46 моноклональных антител против ЛПС *B. abortus* обнаружили в составе ЛПС 9 эпитопов: два (A и C/Y) - на O-полисахариде, два (R1 и R2) - в коровом участке, три (LA1, LA2 и LA3) - на липиде A и два (LAOmp3-1 и LAOmp3-2) - на ассоциированном с липидом A белке наружной мембраны [153].

При водно-фенольной экстракции из S-бруцелл, помимо ЛПС, выделяется еще один липополисахарид, названный «нативный гаптен». Гель-фильтрационная хроматография позволяет разделить его и основной ЛПС. «нативного гаптена» полисахаридный фрагмент сходен с O-антигеном ЛПС S-бруцелл, но липид отличается от липида A. «Нативный гаптен», как и основной ЛПС, может использоваться в качестве антигена для серодиагностики бруцеллеза; эти варианты тест-систем существенно не отличаются друг от друга по диагностическим параметрам. Однако в ряде работ показано, что «нативный гаптен» позволяет дифференцировать зараженных животных от вакцинированных [145; 154-155].

Описан еще один антиген бруцелл - полисахарид поли Б, используемый для серодиагностики *B. melitensis* [156; 157]. Данный полисахарид обнаруживается только в растворимых цитоплазматических фракциях R-форм *B. melitensis* и отсутствует у других бруцелл.

Еще одним потенциальным антигеном для серодиагностики бруцеллеза является так называемый бруцеллезный протективный антиген - фактор, препятствующий слиянию фагосом с лизосомами внутри макрофага. Этот гетерогенный по составу комплекс сахаров, блоков, липидов, нуклеиновых кислот и фосфатов вырабатывается в клетках бруцелл при их выращивании в среде, имитирующей условия внутри макрофага [145; 158; 159].

Наличие перекрестных реакций между бруцеллами и другими грамотрицательными бактериями привело к поиску более специфичных антигенов белковой природы [160]. Недавнее исследование белков наружной мембраны бруцелл показало высокую перспективность для обнаружения *B. abortus* и *B. melitensis* белков с молекулярной массой 19 кДа, 15 кДа и 12 кДа [161], которые превосходили по диагностической ценности периплазматический белковый антиген rBP26 (26 кДа), описанный ранее [162]. Показаны серодиагностические возможности белковых антигенов *B. abortus* r10-kDa (10 кДа - иммунодоминантный регион rBP26) [163], 28 кДа (rOmp28) [164].

В целом можно заключить, что белковые антигены бруцелл обладают большей видовой специфичностью, но часто уступают ЛПС по чувствительности и простоте получения.

\* \* \*

Хотя иммунохроматографические средства серодиагностики активно разрабатываются и широко применяются, многие вопросы их создания и функционирования по-прежнему остаются открытыми. С учетом проведенного анализа литературы, к основным таким вопросам следует отнести:

- определение состава конъюгатов коллоидного золота с белковыми молекулами, обеспечивающего их максимальную связывающую способность в иммунохроматографии;
- определение степени сохранения функциональной активности белковых молекул после конъюгации с коллоидным золотом;
- количественное описание процессов образования иммунных комплектов в ходе иммунохроматографической серодиагностики;
- выбор оптимальной комплектации тест-систем и формата проведения анализа.

Решение данных вопросов обеспечивает достижение цели представленной диссертационной работы; поэтому их последовательное рассмотрение и сформировало структуру проведенных исследований.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Реагенты

Иммуноглобулины G овцы против иммуноглобулинов G человека (sIgG), иммуноглобулины G человека (hIgG); меченные пероксидазой из корней хрена антитела мыши против иммуноглобулинов G овцы (P-MASIss); меченные пероксидазой хрена антитела мыши против иммуноглобулинов G человека (P-MAHIss); кроличьи антитела против иммуноглобулинов G человека (RAHIss); кроличьи антитела против иммуноглобулинов крупного рогатого скота (RABIss) и конъюгат данных антител с пероксидазой (P-RABIss) – все - «Имтек» (Россия).

Рекомбинантный антиген Rv0934 *M. tuberculosis* - «Arista Biologicals» (США).

Моноклональные антитела НТМ81 против рекомбинантного антигена Rv0934 *M. tuberculosis* (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва).

Рекомбинантные белки А и G («Имтек», Россия). Используемый в работе белок G является рекомбинантным мутантом с молекулярной массой 26 кД, состоящим из трех IgG-связывающих фрагментов [165].

Твин-20, тритон X-100, азид натрия, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) - («Sigma», США).

Гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этил-карбодиимид (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC), сульфо-N-гидроксисукцинимид натрия (sulfo-N-hydroxysuccinimide, sulfo-NHS), золотохлористоводородная кислота – «Fluka» (Швейцария).

Бычий сывороточный альбумин (БСА), соевый ингибитор трипсина (Kunitz-type) (СИТ) - «MP Biomedicals» (США).

Все соли были аналитической или химической чистоты. Воду для приготовления растворов очищали на установке MilliQ - «Millipore» (США).

Сыворотки крови больных туберкулезом органов дыхания с подтвержденным диагнозом предоставлены ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва. Для всех сывороток было показано наличие противотуберкулезных антител методом иммуноферментного анализа с использованием наборов ИФА-ТУБ-IgG производства «ЮВС-БИО», Москва.

Сыворотки здоровых доноров предоставлены Институтом медико-биологических проблем РАН, Москва.

Стандартные препараты сывороток КРС для определения бруцеллеза: положительный и отрицательный стандарты производства ТОО НПП «Антиген» (Казахстан), сыворотка «cut-off» производства ФГУП «Курская биофабрика» (Россия).

Панель сывороток КРС с положительным диагнозом «бруцеллез КРС» и антиген – ЛПС *Brucella abortus* предоставлены Национальным центром биотехнологии Республики Казахстан.

## **2.2. Буферные и вспомогательные растворы**

В работе использовали следующие основные буферные растворы:

PBS - 50 mM К-фосфатный буфер (), pH 7,4, содержащий 0,1 M NaCl:

PBST – PBST, содержащий 0,05% Тритона X-100 ;

0,1 M Na-карбонатный буфер, pH 9,0;

0,1 M Na-цитратный буфер, pH 6,0;

10 mM Трис-HCl буфер, pH 9.0.

Все буферные растворы хранили при +4°C.

Кроме того, использовали следующие вспомогательные растворы:

Субстратный раствор ТМБ для определения пероксидазной активности:

Стоковый раствор готовили путем растворения 10 мг ТМБ в 1 мл диметилсульфоксида (DMSO) при перемешивании на шейкере и хранили при +4°C в защищенном от света месте. Для приготовления самого субстрата к 10 мл натрий-цитратного буфера (pH 6,0; 100 mM) добавляли 100 мкл стокового раствора ТМБ и 20 мкл пероксида водорода (3% водного раствора) и тщательно перемешивали.

Раствор «тГБСА»:

К 8,0 мл 10 mM Трис-HCl, pH 9.0 добавляли 2,0 мл 10% раствора БСА, 0,2 г сахарозы, 1 мл 2% азиды натрия и 8,95 мл воды.

## **2.3. Материалы**

Микропланшеты 96-луночные прозрачные (тип 9018 Costar, США и Greiner, ФРГ).

Микропланшеты 96-луночные Nunc MaxiSorp white (Roskilde, Дания).

Медные сетки для просвечивающей электронной микроскопии (Pelco International, США).

Для изготовления иммунохроматографических тест-систем использовали набор мембран mdi Easypack («Advanced Microdevices», Индия), включающий рабочие нитроцеллюлозные мембраны на полиэфирной подложке CNPH90, подложки под конъюгат PT-R5, мембраны для нанесения пробы FR1(0.6), конечные адсорбирующие мембраны AP045.

## **2.4. Методики**

### ***2.4.1. Иммуоферментная детекция специфических антител к ЛПС *Br. abortus* в сыворотках крупного рогатого скота***

Сорбцию препарата ЛПС в лунках 96-луночного микропланшета «Greiner» осуществляли в течение ночи при 4°C из 100 мкл раствора с концентрацией 1 мкг/мл в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,6. Микропланшет четырехкратно отмывали 50 мМ К-фосфатным буфером, pH 7,4, с 0,1 М NaCl и 0,05% Тритона X-100 (PBST), после чего в лунки вносили по 100 мкл сывороток, разбавленных PBST от 1:100 до 1:100,000 с шагом 2, и инкубировали 1 час при 37°C. Затем микропланшет повторно отмывали, добавляли по 100 мкл раствора в PBST моноклональных антител против IgG крупного рогатого скота, меченных пероксидазой из корней хрена (160 нг/мл), и инкубировали 1 час при 37°C. После отмывки микропланшета (трижды PBST и один раз – дистиллированной водой) определяли пероксидазную активность связавшейся с носителем ферментной метки. Для этого в лунки вносили по 100 мкл раствора субстрата ТМБ, с 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, инкубировали 15 мин при комнатной температуре и измеряли D<sub>405</sub>.

### ***2.4.2. Получение коллоидного золота***

К 97,5 мл воды добавляли 1,0 мл 1%-ного раствора золотохлористоводородной кислоты. Смесь доводили до кипения и при перемешивании добавляли 2, 1,5 или 1 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Кипятили 30 мин, затем охлаждали до комнатной температуры [26]. Полученный препарат хранили при 4°C.

### ***2.4.3. Иммобилизация белков на частицах коллоидного золота***

Стабилизирующую концентрацию белков определяли по стабилизации конъюгатов в растворе 10% NaCl, измеряя оптическую плотность при 595 нм. К 0,1 мл водного раствора белка в концентрациях от 1 до 30 мкг/мл добавляли по 1,0 мл раствора коллоидного золота (D<sub>520</sub>=1,0), перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробу добавляли 0,1 мл 10% NaCl и перемешивали. Через 10 мин

измеряли  $D_{580}$  и строили флоккуляционную кривую – зависимость  $D_{580}$  от концентрации белка. Стабилизирующая концентрация определялась как концентрация белка, соответствующая точке выхода на плато флоккуляционной кривой плюс 10% значения концентрации согласно существующим рекомендациям [83].

Белки диализовали против 1.000-кратного объема 10 мМ карбонатного буфера, рН 9.0. К коллоидному золоту ( $D_{520}=1,0$ ) добавляли 0,1 М  $K_2CO_3$  до достижения рН 9,0, а затем – белки A/G или антиген Rv0934 *M. tuberculosis*. Смесь инкубировали 10 мин при комнатной температуре и перемешивании, после чего добавляли 10% водный раствор БСА до конечной концентрации 0,25%.

Частицы коллоидного золота отделяли от неиммобилизованного белка 30-минутным центрифугированием при 6.000 g, ресуспендируя осадок в ттБСА. При необходимости длительного хранения добавляли  $NaN_3$  до конечной концентрации 0,05%. Препарат хранили при 4°C.

#### **2.4.4. Приготовление конъюгатов белков с коллоидным золотом для количественного исследования иммобилизации**

Раствор коллоидного золота разливали в 8 пробирок по 2,0 мл и центрифугировали при 12000 g. Затем отбирали надосадочную жидкость. Осадок коллоидных частиц взбалтывали (объем оставшейся в пробирке жидкости довели надосадочной жидкостью строго до 0,2 мл с помощью автоматической пипетки). В отобранной надосадочной жидкости готовили растворы белка (БСА, СИТ, hIgG, белок G) с концентрациями: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31, 16, 8 мкг/мл. Для этого приготовили стоковый раствор 100 мг/мл, далее разводили его надосадочной жидкостью до нужной концентрации. В опытах использовали только свежеприготовленные растворы.

Полученные растворы белка в надосадочной жидкости отбирали по 0.2 мл и добавляли к 0.2 мл полученных после центрифугирования растворов коллоидного золота. Оставшиеся растворы белка использовали как калибровочные растворы. Белок инкубировали с коллоидным золотом 1 час при комнатной температуре, затем центрифугировали при 12000 g, отбирали 0,2 мл надосадочной жидкости и переносили в микропланшет. Калибровочные растворы также переносили в планшет по 0,2 мл и измеряли флуоресценцию.



#### ***2.4.5. Измерение флуоресценции***

Спектры флуоресценции белков снимали на микропланшетном спектрофотометре Perkin Elmer En Spire 2300 (Waltham, MA, США). Спектры измеряли в микропланшетах Nunc MaxiSorp white при длине волны возбуждающего света 280 нм в диапазоне длин волн испускаемого света 290-500 нм.

#### ***2.4.6. Определение методом ИФА количества свободных sIgG после конъюгирования с коллоидным золотом***

В 96-луночных планшетах собирали hIgG 100 мкл с концентрацией 1 мкг/мл, буфер PBS, 2 часа при 37°C. Затем четырехкратно отмывали PBST. Надосадочные жидкости, полученные после центрифугирования конъюгатов K3-sIgG, разводили в лунках планшета 8 раз с шагом 2. Аналогичным образом разводили стандартные растворы sIgG от 1 мкг/мл (в PBST) для построения калибровочной кривой.

Планшеты инкубировали 45 мин при 37°C, отмывали PBST. Вносили во все лунки по 100 мкл раствора антител мыши против sIgG, меченных пероксидазой из корней хрена, разведение 1:3000 в PBST. Инкубировали 45 мин, при 37°C, отмывали PBST. Вносили субстрат ТМБ, 100 мкл в лунку. Инкубировали 10 мин, останавливали реакцию добавлением 100 мкл 1 М раствора серной кислоты. Регистрировали оптическую плотность при 405 нм.

#### ***2.4.7. Определение методом ИФА количества hIgG, не связавшихся с конъюгатом K3- sIgG***

Сорбировали антитела кролика против hIgG в 96-луночных планшетах по 100 мкл с концентрацией 1 мкг/мл, буфер PBS, 2 часа при 37°C. Для построения калибровочной кривой разбавляли hIgG в PBST от 1 мкг/мл с фактором разведения 2. Конъюгат K3-sIgG, (концентрация антител при синтезе 30 мкг/мл), сконцентрированный в 10 раз после синтеза (концентрация частиц 10 нМ), брали по 50 мкл, добавляли 100 мкл PBST (для предотвращения неспецифической сорбции). Затем добавляли 150 мкл раствора IgG человека до конечных концентраций 5, 10, 30, 50 мкг/мл, инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Пробы центрифугировали 20 мин при 10000 g, +4°C. Отбирали надосадочные жидкости и анализировали концентрацию hIgG в как описано предыдущем пункте с использованием антител мыши против иммуноглобулинов G человека, меченных пероксидазой хрена.

#### 2.4.8. *Определение кинетических и равновесных параметров взаимодействий между иммунореагентами*

Для характеристики прочности взаимодействия пар антиген-антитело и определения кинетических и равновесных констант комплексообразования использовали биосенсорный подход, основанный на явлении поверхностного плазмонного резонанса.

Измерения проводили на приборе VIAcore™ X (Pharmacia Biosensor AB, Швеция) с использованием стандартного чипа CM5 с поверхностью, покрытой карбоксилированным декстраном. В системе имеется две ячейки, одну из которых модифицировали антигенным партнером иммунной пары и использовали в качестве аналитической ячейки, а вторую блокировали и использовали в качестве контрольной ячейки сравнения.

Методика измерения параметров комплексообразования включала следующие стадии:

1. *Подбор pH буферного раствора, обеспечивающего наиболее эффективный подход белка к сенсорной поверхности.* Готовили серию растворов иммобилизуемых белковых конъюгатов с концентрацией 10 мкг/мл в буферах с pH 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5. Затем последовательно пропускали растворы через аналитическую ячейку и снимали сенсограммы взаимодействия с поверхностью. На основании сравнения полученных сенсограмм определяли оптимальный pH буферного раствора.

2. *Активация чипа сукцинимид-карбодиимидным методом* проводилась по методике производителя. Первоначально карбоксильные группы декстрана активировали с помощью смеси этилкарбодиимид+гидроксисукцинимид (EDC+NHS), которые образовывали коротко живущие эфирные группы, далее реагирующие с аминогруппами лиганда с образованием амидной связи (рис. 9). Активация производилась пропусканием смеси активаторов из концентраций 0.05 М EDC / 0.2 М NHS через аналитическую ячейку и ячейку сравнения в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин.

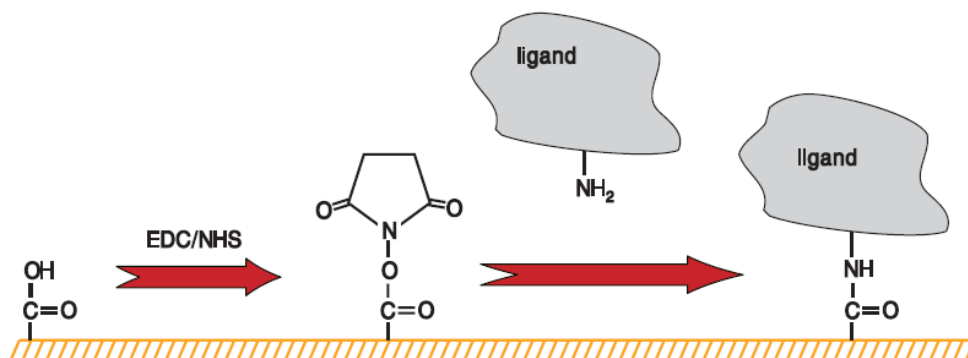


Рис. 9. Способ иммобилизации биомолекул на сенсорной поверхности.

3. *Модификация поверхности аналитической ячейки* белковым конъюгатом в оптимизированном буфере. Моноклональные антитела НТМ81 против рекомбинантного антигена Rv0934 *M. tuberculosis* растворяли в 10 мМ натрий - цитратном буфере с рН 4,0 до концентрации 200 мкг/мл. Раствор пропускали только через аналитическую ячейку, ячейка сравнения оставалась закрытой. Пропускаемый объем раствора – 80 мкл, при скорости потока 10 мкл/мин.

4. *Блокировка непрореагировавших активированных групп.* Непрореагировавшие активированные группы в аналитической ячейке и ячейке сравнения блокировали этаноламином для предотвращения неспецифического взаимодействия, пропуская 1 М раствор через обе ячейки в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин.

5. *Получение сенсограмм взаимодействия антигена с иммобилизованными антителами.* Образцы антигена пропускали над поверхностью модифицированного чипа через аналитическую и контрольную ячейки при скорости потока 10 мкл/мин в концентрациях: 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 30; 40; 50 мкг/мл. В конце каждого цикла регенерировали поверхность раствором 0,1 М глицин-НСl с рН 2. На основании полученных сенсограмм проводили расчет кинетических и равновесных параметров иммунного взаимодействия. Величина сигнала прибора рассчитывалась на основании разности откликов в аналитической ячейке и ячейке сравнения.

6. *Обработка данных, расчет констант иммунного взаимодействия.* Вначале рассчитывали равновесную константу ассоциации в приближении равновесных условий по формуле:  $Req = (Ka \cdot C \cdot Rmax) / (1 + Ka \cdot n \cdot C)$ , где  $Ka$  – равновесная константа связывания,  $Req$  – уровень связывания (значение сигнала на сенсограмме),  $Rmax$  – максимальный возможный уровень связывания,  $C$  – концентрация добавленного антигена,  $n$  – стериический фактор.

Перестраивали зависимость  $Req$  от  $C$  в координатах Скетчарда ( $1/Req$  от  $1/C$ ) Проводили линеаризацию полученных точек на графике Скетарда. Точка пересечения полученной прямой с осью ординат дает величину  $1/Rmax$ , а тангенс наклона линеаризованной зависимости –  $1/(Ka \cdot Rmax)$ . Подставляя полученное значение  $1/Rmax$  в выражение  $1/(Ka \cdot Rmax)$  находили значение равновесной константы ассоциации –  $Ka$ .

Кинетическую константу диссоциации рассчитывали по формуле:

$$R = R_0 e^{-kd(t-t_0)} + \text{Offset},$$

где  $R$  – значение сигнала при значении времени  $t$ ,  $R_0$  – значение сигнала в начале участка диссоциации (при значении времени  $t_0$ ), Offset – фоновый уровень сигнала. Из значений  $R$  и  $R_0$ , полученных из анализа участка диссоциации на сенсограммах, находили значение  $k_d$ .  
Учитывая соотношения  $K_a = k_a/k_d$ ;  $K_d = k_d/k_a$ , находили значения  $k_a$  и  $K_d$ .

#### 2.4.9. Изготовление иммунохроматографических тест-систем

Для нанесения реагентов использовали диспенсер «IsoFlow» фирмы «Imagene Technology» (США).

Конъюгаты коллоидного золота наносили на подложку для конъюгата. Для формирования аналитической зоны на нитроцеллюлозную мембрану 90СNPH наносили препараты антигенов. Для формирования контрольной зоны на нитроцеллюлозную мембрану 90СNPH наносили реагенты для связывания соответствующего конъюгата. Всего было изготовлено 6 типов тест-систем, описание которых приводится в табл. 2.

После нанесения реагентов мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Собирали мультимембранный композит (рис. 10), из которого получали полоски шириной 3.5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 («A-Point Technologies», США). Тест-полоски с силикагелем в качестве осушителя герметично упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 («Wenzhou dingli packing machinery», Китай). Нарезку и упаковку проводили при 20–22°C в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%. Упакованные тест-полоски хранили при 20–22°C. [167; 168].

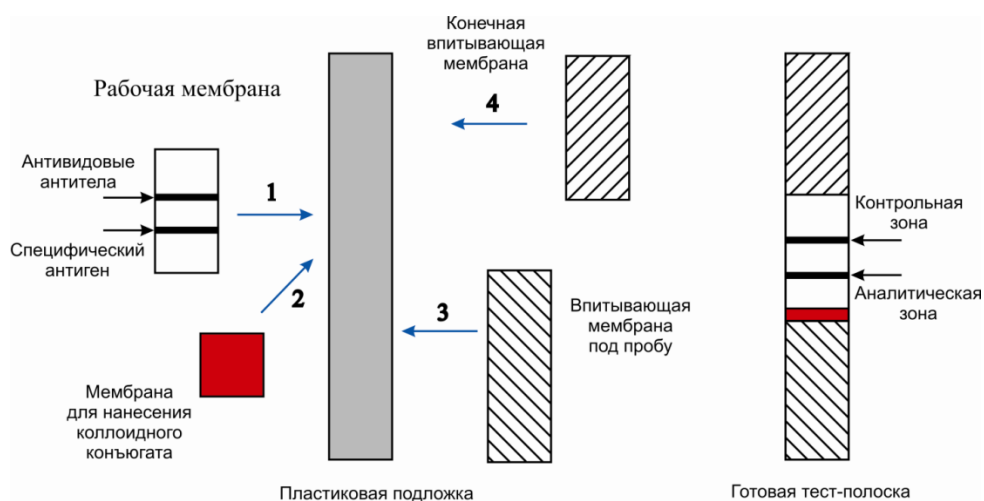


Рис. 10. Состав и порядок сборки (1-4) мультимембранного композита для иммунохроматографии.

Табл. 2. Условия нанесения реагентов при изготовлении иммунохроматографических тест-систем.

Параметр		Вид иммунохроматографической тест-системы					
		Тест-система для серодиагностики бруцеллеза КРС			Тест-система для серодиагностики легочного туберкулеза		
		Стандартная схема	Схема с двумя антигенами	«Обратная» схема	Стандартная схема	Схема с двумя антигенами	«Обратная» схема
Конъюгат маркера	Состав	КЗ-белок G	КЗ-ЛПС <i>B. abortus</i>	КЗ-ЛПС <i>B. abortus</i>	КЗ-белок А	КЗ - Rv0934 <i>M. tuberculosis</i>	КЗ - Rv0934 <i>M. tuberculosis</i>
	Оптическая плотность	20	5	5	20	2	2
	Расход при нанесении, мкл/см	15	10	10	15	20	20
Реагент в аналитической зоне	Состав	ЛПС <i>B. abortus</i>	ЛПС <i>B. abortus</i>	Белок А	Антиген Rv0934 <i>M. tuberculosis</i>	Антиген Rv0934 <i>M. tuberculosis</i>	Белок А
	Концентрация, мг/мл	1	1	10	1	1	10
	Среда	Дистиллированная вода	Дистиллированная вода	PBS	PBS	PBS	PBS
	Расход при нанесении, мкл/см	1	1	1	1	2	1

Реагент в контрольной зоне	Состав	RABIss	-	-	hIgG	HTM81	HTM81
	Концентрация, мг/мл	0,5	-	-	0,5	0,5	0,5
	Среда	PBS	-	-	PBS	PBS	PBS
	Расход при нанесении, мкл/см	1	-	-	1	2	2

#### ***2.4.10. Иммунохроматографический анализ***

ИХА проводили при комнатной температуре. Одну каплю сыворотки крови наносили в эппендорф, добавляли туда же 3 капли PBS, содержащего 1% твин-20 и вертикально помещали тест-полоску в эппендорф. Через 10 мин визуально контролировали результат ИХА. Количественно связывание коллоида в контрольной и аналитической зонах регистрировали с помощью портативного анализатора «Рефлеком» [169]. Минимальная интенсивность окрашивания, различимая визуально, соответствует значению сигнала анализатора 0,5 отн. ед.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с поставленными задачами структура исследования включала:

- Синтез и характеристику маркера для иммунохроматографического анализа – коллоидного золота;
- Получение конъюгатов КЗ с белками и исследование процесса иммобилизации;
- Изучение степени сохранения функциональной активности белков после иммобилизации на КЗ;
- Определение равновесных и кинетических параметров иммунного взаимодействия с помощью метода ППР;
- Разработку математической модели серодиагностического ИХА;
- Разработку и апробацию различных форматов серодиагностического ИХА.

#### 3.1. Синтез и определение размерных характеристик коллоидного золота

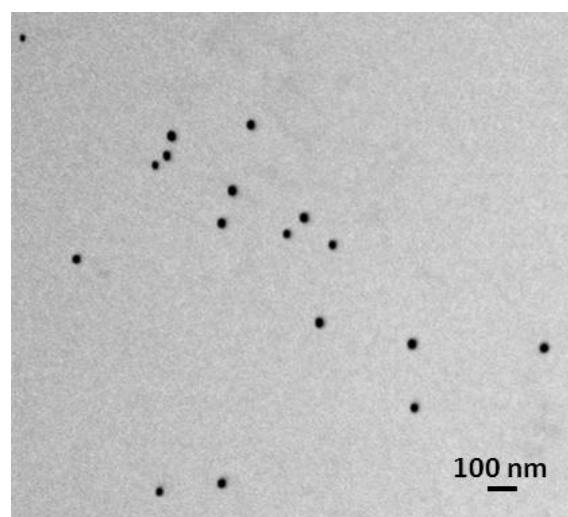
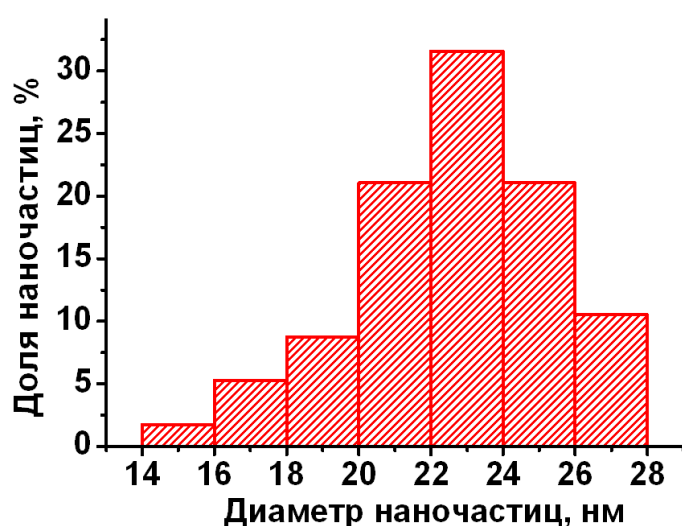
Как отмечалось в литературном обзоре, одним из ключевых факторов, влияющих на чувствительность иммунохроматографической тест-системы, являются свойства маркера – коллоидного золота. Для получения лучших аналитических характеристик необходимо использовать стабильные неагрегирующие частицы с высокой степенью однородности по размерам и форме (см. раздел 1.2.1). Оптимальный размер коллоидного золота для ИХА находится в диапазоне 20-40 нм [34].

Нами были синтезированы три препарата коллоидного золота с использованием различных концентраций восстановителя. Их размерные характеристики оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Согласно полученным данным, синтезированные препараты КЗ обладали средними диаметрами частиц около 20 нм (препарат №1), 24 нм (препарат №2) и 48 нм (препарат №3). В табл. 3 суммированы данные анализа электронных микрофотографий препаратов КЗ, включая средние диаметры частиц, отклонения от среднего диаметра и степень эллиптичности частиц для трех препаратов КЗ. Препараты отличались высокой степенью гомогенности: на рис. 11, А в качестве примера приведена гистограмма распределения по размерам частиц препарата №2. Электронная микрофотография (рис. 11, Б) демонстрирует отсутствие агрегатов частиц, что свидетельствует о стабильности коллоидных растворов.



Табл. 3. Характеристика размера и гомогенности полученных препаратов.

Препарат	Длина большой оси, нм	Длина меньшей оси, нм	Средний диаметр	Соотношени е 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



А

Б

Рис. 11. А – гистограмма распределения частиц по размерам (средний диаметр 24 нм); Б – фрагмент изображения частиц КЗ на электронной микрофотографии.

### 3.2. Получение и характеристика конъюгатов коллоидного золота с белками

Конъюгирование КЗ с белками – сложный многофакторный и не до конца изученный процесс. Существующие исследования содержат ряд противоречивых данных о механизмах иммобилизации белков на поверхности КЗ (см. раздел 1.2.4). По этой причине нами была предпринята попытка разработки новой надежной и нетрудоемкой методики определения состава конъюгатов белок-КЗ, основанной на измерении собственной флуоресценции белков. Данная методика не требует использования каких-

либо меток, что упрощает процедуру анализа, уменьшает погрешность определения состава конъюгатов и позволяет изучать конъюгацию КЗ с нативными белками.

В качестве объектов исследования были выбраны 4 белка: человеческий иммуноглобулин G (hIg G), бычий сывороточный альбумин (БСА), белок G из *Streptococcus* spp. (белок G) (рекомбинантный мутант, состоящий из трех IgG-связывающих фрагментов [165]) и соевый ингибитор трипсина Kunitz-типа (СИТ). Этот выбор обусловлен структурным разнообразием данного ряда белков и их частым использованием в иммунохимических системах: в качестве белков-носителей для низкомолекулярных гаптен (БСА и СИТ), в качестве молекул-рецепторов (IgG и белок G), в качестве стабилизатора для коллоидных частиц и компонента реакционных сред (БСА). Кроме того, сывороточные альбумины и IgG являются основными белковыми компонентами крови [170] и при попадании в кровь наночастицы взаимодействуют в основном с этими белками [33; 171]. Метод был использован для определения состава конъюгатов коллоидного золота со средним диаметром 24 нм.

### ***3.2.1. Разработка методики определения состава конъюгатов белок-коллоидное золото по собственной флуоресценции белка***

подавляющее большинство белков обладают собственной флуоресценцией, обусловленной, преимущественно, триптофановыми аминокислотными остатками. Триптофан имеет максимум поглощения света при 280 нм, а максимум испускания при 340-360 нм [172].

Предлагаемая методика определения состава конъюгатов белков с коллоидным золотом основана на сравнении исходной флуоресценции калибровочных растворов ( $F_0$ ) и остаточной флуоресценции реакционных растворов после отделения центрифугированием синтезированных конъюгатов (F). Разность этих двух величин ( $\Delta F$ ) 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.

Данный подход позволяет избежать влияния КЗ на флуоресценцию триптофана. Поскольку КЗ является сильным модулятором свойств флуорофоров [173], присутствие в растворе частиц золота изменяет величину флуоресценции и не позволяет сравнивать флуоресценцию в пробах и в калибровочных растворах. По этой причине точность

измерений традиционными методами в значительной степени зависит от полноты удаления золотых частиц из раствора.

Предложенная схема опыта, приведенная на рис. 12, позволяет измерять флуоресценцию белка в калибровочных растворах и в надосадочной жидкости после центрифугирования конъюгатов в максимально близких условиях. 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 [172; 174; 175]. Данный эффект наблюдался и в проведенных нами экспериментах. Так, рис. 13 демонстрирует отличия флуоресценции БСА в дистиллированной воде и в надосадочной жидкости после центрифугирования коллоидного золота. Поэтому калибровочные растворы готовятся в надосадочной жидкости после осаждения золота центрифугированием (рН раствора 5.4). Калибровочные растворы готовили в надосадочной жидкости после осаждения золота центрифугированием (рН раствора 5.4), измеряя их и исследуемые пробы одновременно в одном микропланшете. Кроме того, поскольку иммунологические планшеты сорбируют белок, что влияет на флуоресценцию, измерения проводили сразу после перенесения образцов в лунки микропланшета.

#### *3.2.1.1. Определение концентрации коллоидных частиц*

По данным просвечивающей электронной микроскопии частицы имели средний диаметр 24 нм. Следовательно, объём частицы  $V = 7.2 \cdot 10^{-24} \text{ м}^3$ . Учитывая плотность золота, равную  $19300 \text{ кг/м}^3$ , получаем массу одной частицы  $m_{\text{ч}} = 1.4 \cdot 10^{-16} \text{ г}$ . При синтезе в 100 мл воды вносилось 0,2 мл 5%  $\text{HAuCl}_4$ . Соответственно, концентрация золота в растворе составляла 0.05 г/л, а количество частиц в одном миллилитре  $n = 3.6 \cdot 10^{11}$ . Перед конъюгированием КЗ осаждали и перерастворяли осадок в меньшем объеме, в результате чего концентрация КЗ в растворе во время конъюгирования была в пять раз больше, чем после синтеза, то есть  $1,8 \cdot 10^{12}$  частиц/мл.

#### *3.2.1.2. Расчет количества белка, сорбированного на КЗ*

После синтеза конъюгатов и отделения конъюгированного КЗ центрифугированием отбирали пробы (по 200 мкл) надосадочной жидкости и помещали их в лунки микропланшета. В лунки того же микропланшета помещали калибровочные растворы (также по 200 мкл) и измеряли спектры флуоресценции. Полученные спектры флуоресценции БСА в калибровочных растворах (А) и в пробах (Б) представлены на рис. 14. Спектры других белков имеют сходный вид, также с максимумом флуоресценции при 350 нм, отличаясь только величиной флуоресценции.

На основании полученных спектров строили зависимости интенсивности флуоресценции при 350 нм от концентрации добавленного белка в калибровочных растворах и в исследуемых пробах (рис. 15). В диапазоне концентраций белка 0–250 мкг/мл зависимость интенсивности флуоресценции носит практически линейный характер (R-фактор линейаризации больше 0,99 для всех четырех охарактеризованных белков). Поскольку с ростом флуоресценции увеличивается абсолютная погрешность измерения (см. рис. 15), для расчетов состава конъюгатов использовали данные, полученные для концентраций белков не более 125 мкг/мл. При более высоких концентрациях погрешность измерения превышает разницу между величинами флуоресценции в калибровочных растворах и пробах.

Экспериментально показано, что при низких концентрациях белка при синтезе (не более 8 мкг/мл) количество несвязанных с КЗ белковых молекул ниже предела обнаружения метода (0,5 мкг/мл), то есть практически весь добавленный белок сорбируется на поверхности коллоидных частиц (см. рис. 15). При увеличении концентраций добавленных белков концентрационные зависимости флуоресценции в калибровочных растворах и в пробах становятся параллельны друг другу, что свидетельствует о достижении насыщения.

Исходя из разности флуоресценции при 350 нм в пробах и калибровочных растворах и данных о содержании частиц КЗ в растворе во время конъюгирования ( $1,8 \cdot 10^{12}$  частиц/мл), 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 исходной концентрации белка в растворе представлены на рис. 16.

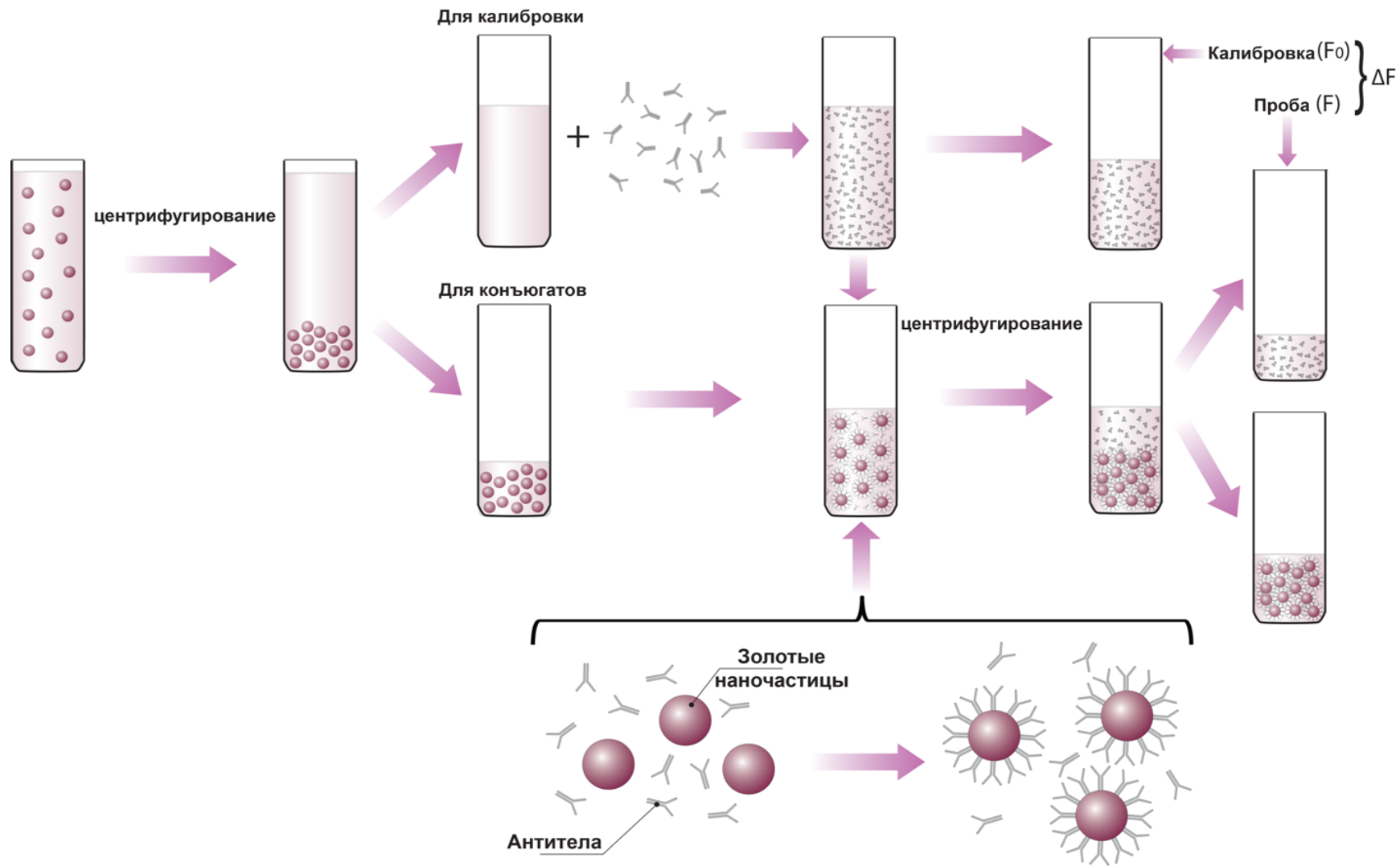


Рис. 12. Схема определения состава конъюгатов КЗ с белком (на примере IgG).  $F_0$  – флуоресценция калибровочных растворов,  $F$  – флуоресценция надосадочной жидкости после центрифугирования синтезированных конъюгатов,  $\Delta F = F_0 - F$ .

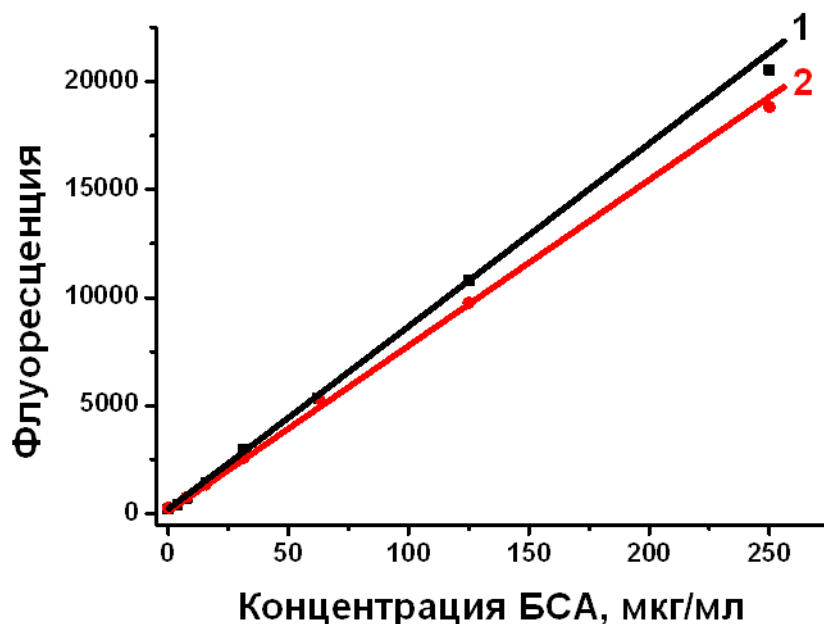


Рис. 13. Флуоресценция БСА при 350 нм: 1 – в дистиллированной воде; 2 – в надосадочной жидкости после центрифугирования коллоидного золота.

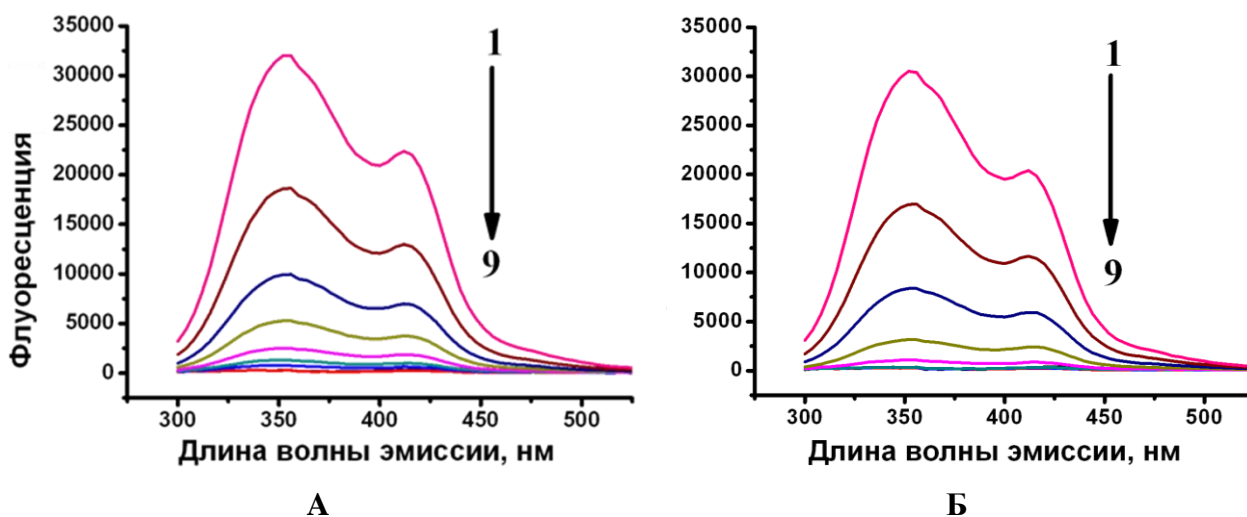


Рис. 14. Спектры флуоресценции БСА: А – в калибровочных растворах (растворы с добавленными известными концентрациями БСА в надосадочной жидкости после центрифугирования КЗ); Б – в надосадочной жидкости после центрифугирования полученных конъюгатов БСА-КЗ. Кривые 1-9 соответствуют концентрациям БСА 500, 250, 125, 63, 31, 16, 8, 4, 0 мкг/мл.

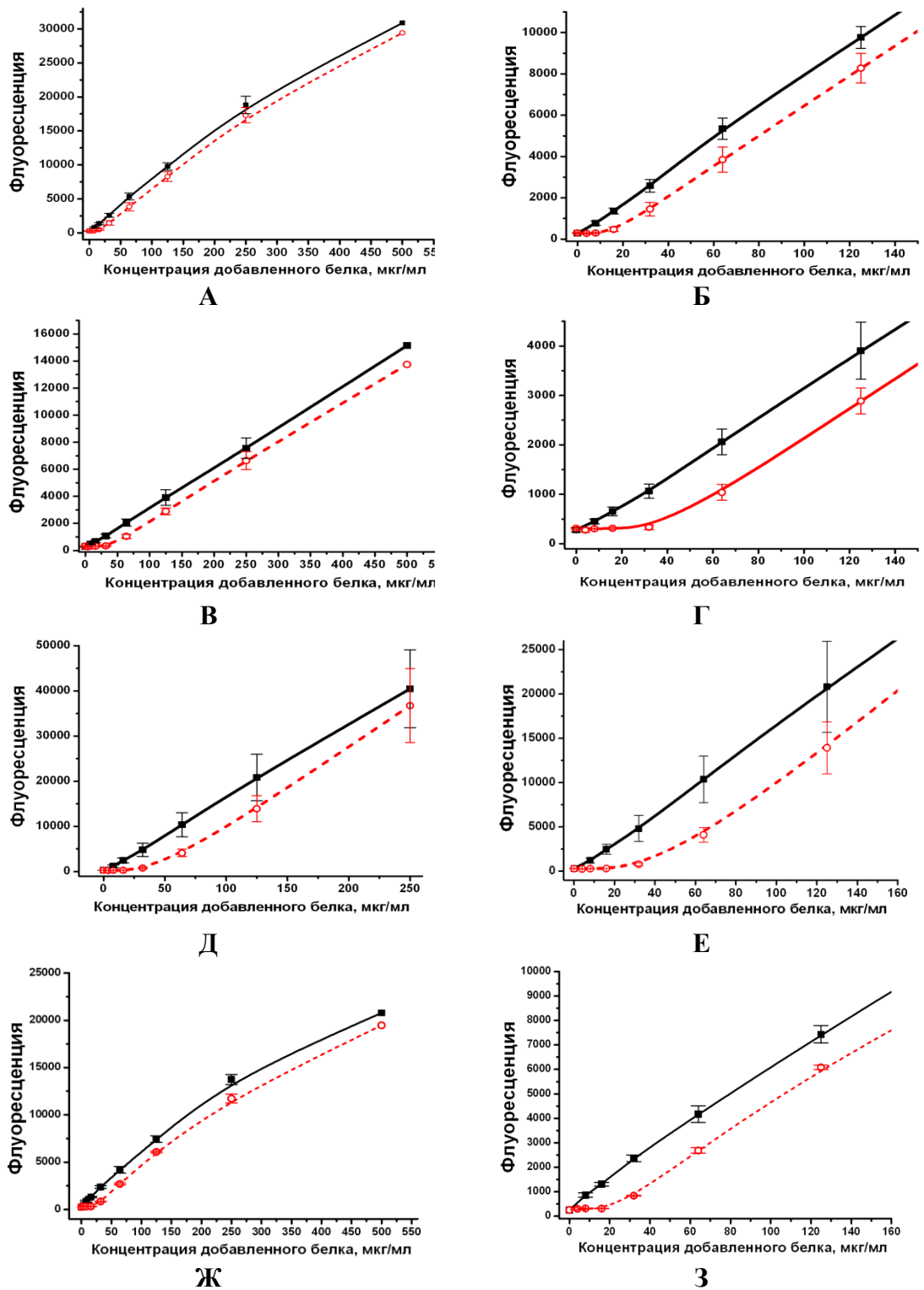


Рис. 15. Зависимости интенсивности флуоресценции белков при 350 нм от их изначально добавленной концентрации в калибровочных растворах (—■—) и в надосадочной жидкости после центрифугирования конъюгатов с коллоидным золотом (.....●.....): А, Б – для БСА (среднее по 6 повторам); В, Г – для СИТ (среднее по 3 повторам); Д, Е – для белка G (среднее по 3 повторам); Ж, З – для IgG (среднее по 3 повторам). На графиках Б, Г, Е, З приведены начальные участки графиков А, В, Д, Ж.

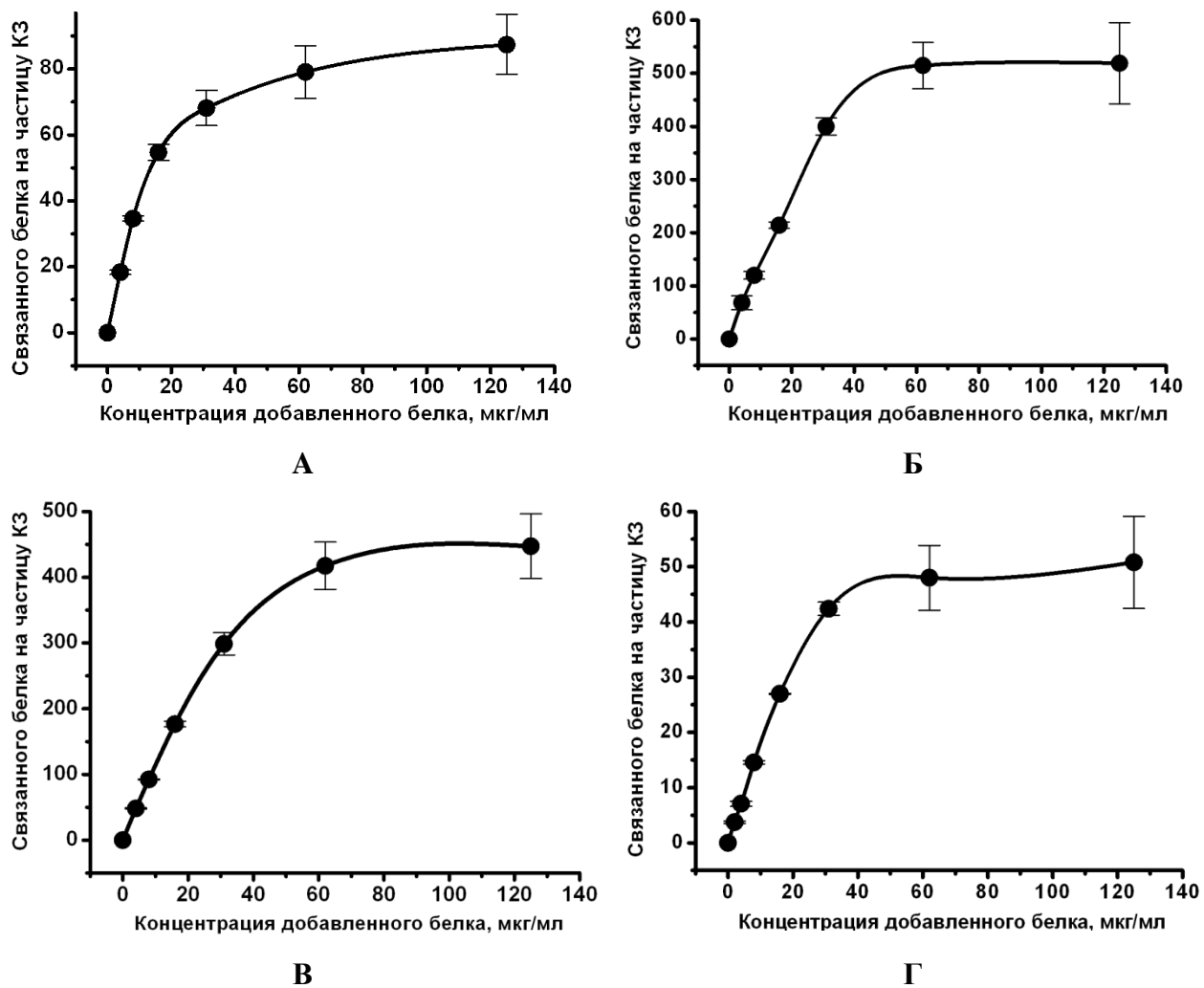


Рис. 16. Зависимости количества молекул белков, сорбированных на одной наночастице, от концентрации белка при синтезе: А – для БСА; Б – для СИТ; В – для белка G; Г – для IgG.

3.2.1.3. *Определение констант взаимодействия белков с наночастицами и количества центров сорбции*

Константы взаимодействия наночастиц с белками определяли по методу Скетчарда [176] в соответствии с уравнением:

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



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

Построив зависимость отношения  $RL/[L]$  от  $RL$  (координаты Скетчарда), определили значения  $K_D$ , численно равные котангенсу угла наклона касательной к графику полученной зависимости. Данные зависимости рассчитывали для концентраций белков, для которых сигнал в надосадочной жидкости достоверно отличается от фона (т.е. от 16 мкг/мл белка при синтезе и выше) и при этом погрешность измерений меньше разности флуоресценции в пробах и в калибровочных растворах (т.е. не более 125 мкг/мл белка при синтезе). Точка пересечения с осью абсцисс линейризованного участка графика при концентрациях белка, близких к насыщающим, дает общее количество центров сорбции на частице.

Полученные зависимости в координатах Скетчарда имеют вид гиперболических кривых (рис. 17). Уменьшение угла наклона кривой при увеличении концентрации белка свидетельствует о снижении усредненной прочности ассоциации белков с поверхностью золота, то есть об антикооперативном механизме их взаимодействия. Для численной характеристики прочности связывания мы вычислили значения усредненной равновесной константы диссоциации для двух линейризуемых участков на графике Скетчарда: для концентраций, значительно ниже насыщающих ( $K_d^{(1)}$ ), и для концентраций, близких к насыщающим ( $K_d^{(2)}$ ). Точка пересечения линейризованного конечного участка графика с осью абсцисс дает максимальное количество центров связывания ( $N$ ). Все полученные величины суммированы в табл. 4.

Табл. 4. Параметры адсорбции белков на КЗ.

Белок	MW (kD)	1/MW (kD <sup>-1</sup> )	$K_d^{(1)}$ (nM)	$K_d^{(2)}$ (nM)	N
Ig G	150	0,00667	4	30	52
БСА	66	0,01515	6	76	90
Белок G	26	0,03846	10	175	500
СИТ	20	0,05	15	100	550

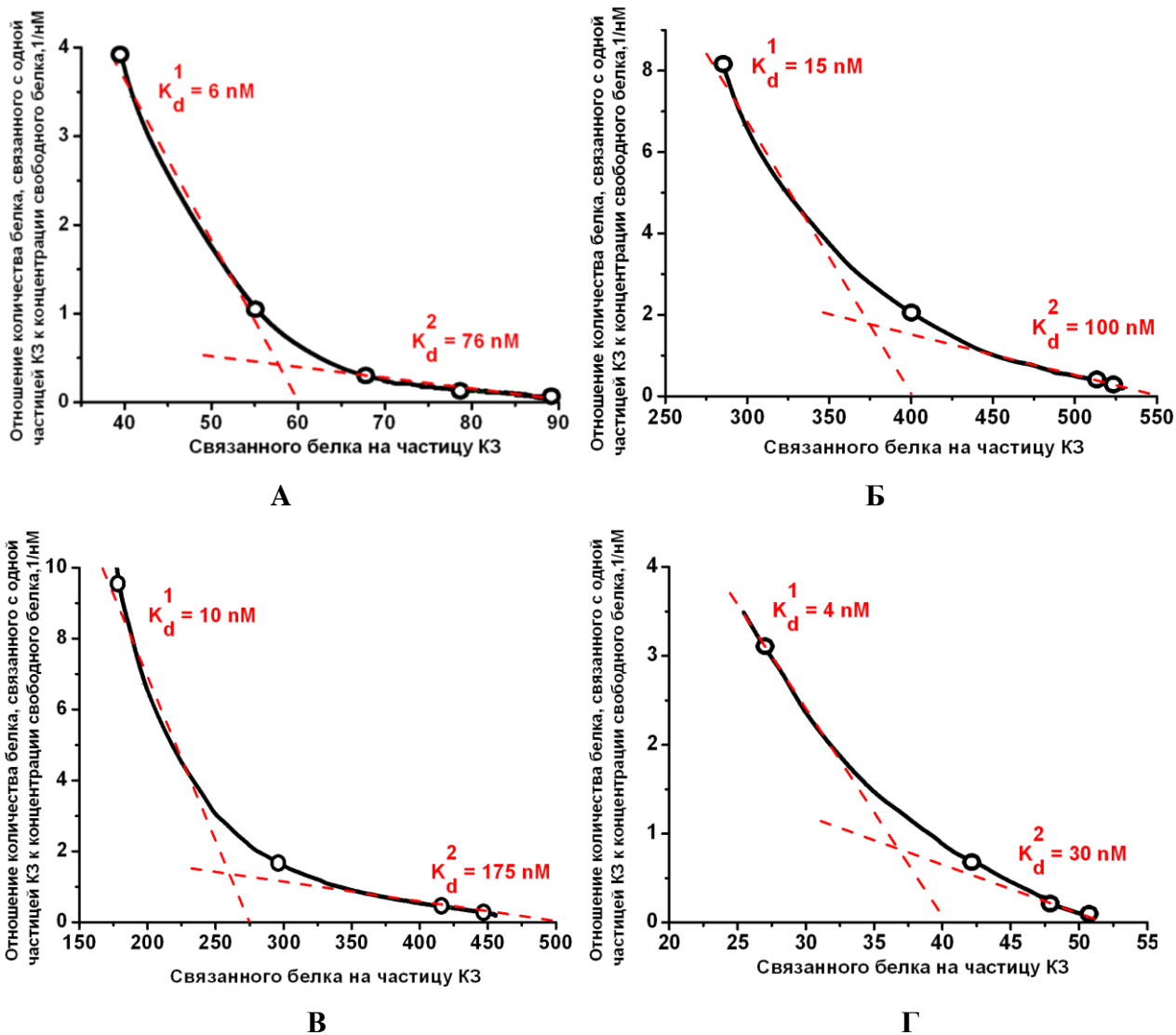


Рис. 17. Связывание белков с коллоидным золотом в координатах Скетчарда: А – для БСА; Б – для СИТ; В – для белка G; Г – для IgG.  $K_d^{(1)}$  – равновесная константа диссоциации конъюгатов при концентрациях белка ниже насыщающих,  $K_d^{(2)}$  – равновесная константа диссоциации конъюгатов при концентрациях белка, близких к насыщающим.

Значения полученных констант диссоциации в целом увеличиваются с ростом молекулярной массы белка, что согласуется с ранее полученными данными [46]. Уменьшение наклона кривых Скетчарда при увеличении концентрации белков можно объяснить стерическими препятствиями, которые создают сорбированные молекулы белков друг для друга при увеличении их плотности на поверхности частицы. Количество центров сорбции ( $N$ ) практически линейно зависит от обратной молекулярной массы в степени  $2/3$  (рис. 18).

Результаты некоторых исследований демонстрируют, что белки могут сорбироваться на поверхности КЗ несколькими слоями [33; 63; 177], в то время как другие исследователи утверждают, что белки образуют монослой на поверхности КЗ [59; 61; 62]. Возможно, эти противоречия связаны с различиями в условиях синтеза конъюгатов (рН, ионная сила, состав реакционной смеси, размер частиц и др.). Исходя из полученных нами данных о количестве сорбированного белка и известных сведений о размерах использованных в экспериментах белков, можно заключить, что для всех четырех белков в наших условиях имеет место монослойная иммобилизация. Для дополнительной проверки этого положения в программе 3DS Max 6 были построены трехмерные модели конъюгатов (Autodesk, San Rafael, США) на основании данных о форме и размерах белков из базы данных RCSB PDB, рассматриваемые в следующем разделе.

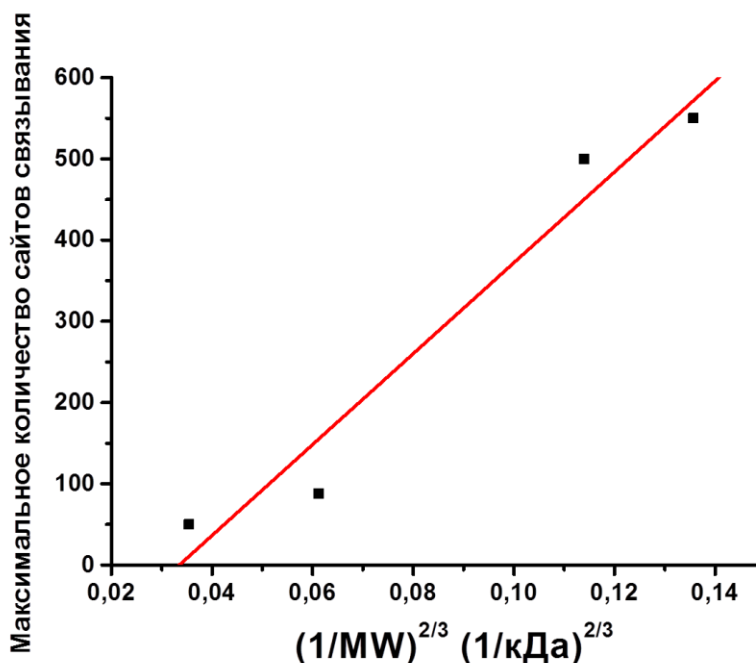


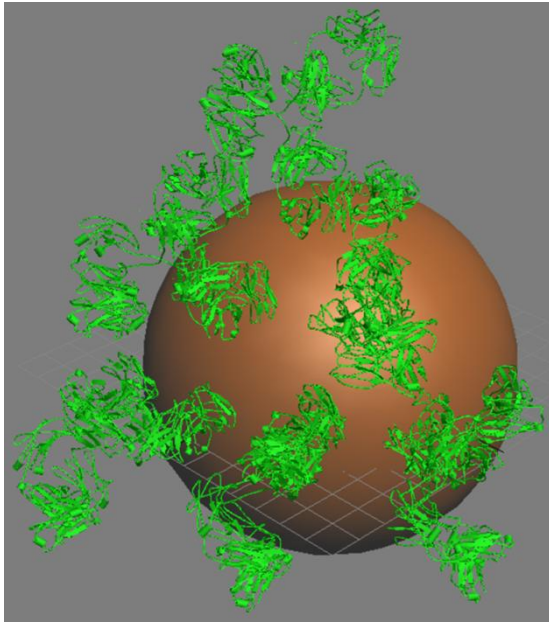
Рис. 18. Зависимость количества сайтов связывания на частице КЗ от обратной молекулярной массы белка в степени 2/3.

#### 3.2.1.4. Построение трехмерных моделей конъюгатов КЗ с белками

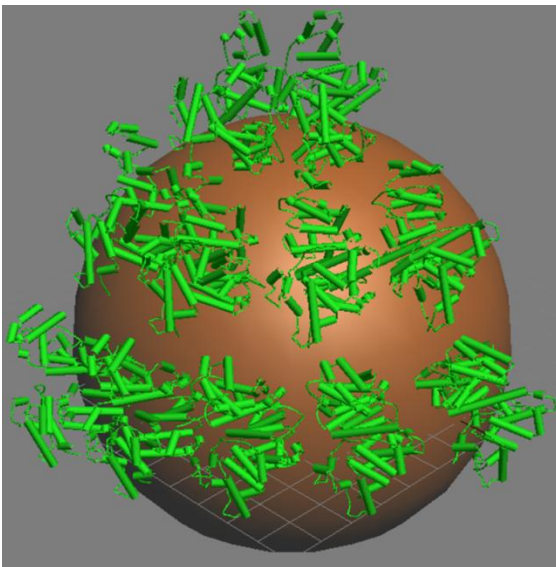
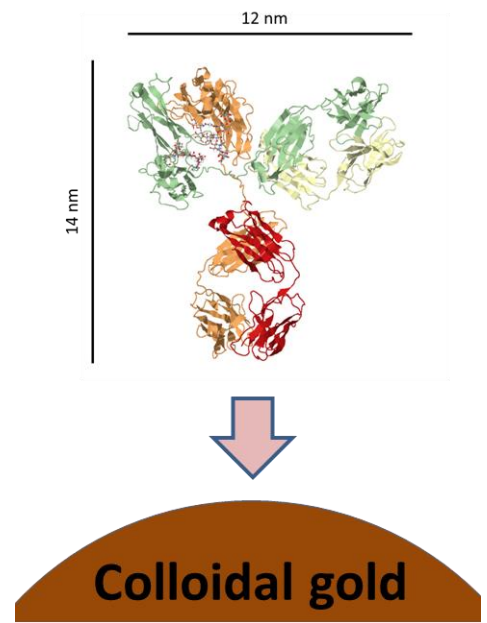
Из базы pdb были взяты трехмерные модели белков: IgG (1IGY), БСА – (4F5S), СИТ – (1AVU), белок G (IgG–связывающий фрагмент) – (1PGB; в работе использовался рекомбинантный мутант белка G, состоящий из трех IgG–связывающих фрагментов). Белковые структуры конвертировали в формат VRML World File (\*.wrl) с помощью программы DS Viewer Pro (Afanche Technologies, Hinsdale, США) и импортировали в

программу 3DS Max 6. Создавали сферу, сохраняя пропорции размеров наночастицы (диаметр 24 нм) и белков. Далее размещали белки в одинаковой ориентации на поверхности сферы так, чтобы они не перекрывались. Ориентации белковых молекул выбирались таким образом, чтобы на поверхности частицы расположилось максимальное количество белка.

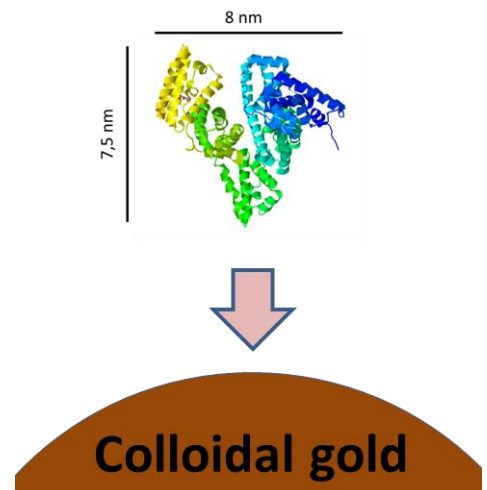
На полученных моделях (рис. 19) рассмотрено заполнение  $1/8$  поверхности частицы КЗ. Установлено, что на этой поверхности может быть размещено следующее количество молекул белков: Ig G – 6, БСА – 11, СИТ – 60, белок G – 63. Соответственно, на всей сфере размещается 48, 88, 480 и 504 молекулы, что сопоставимо с данными из табл. 4 – 55, 90, 550 и 500. Таким образом, результаты моделирования подтверждают возможность монослойного расположения на поверхности частицы экспериментально установленных количеств адсорбированных белков.

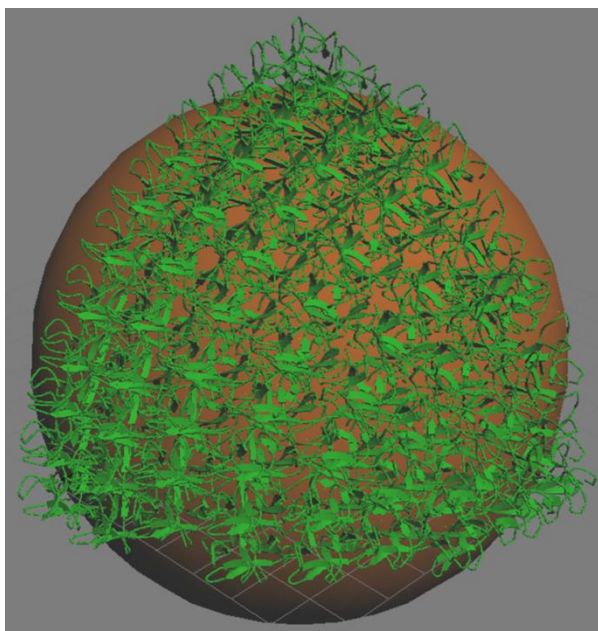


Ig G

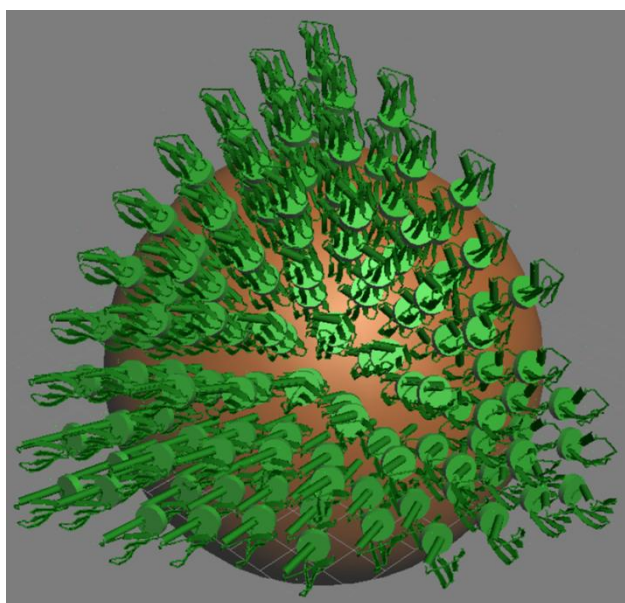
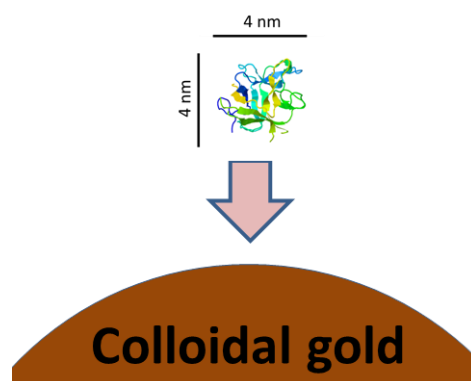


BCA





СИТ



Белок G

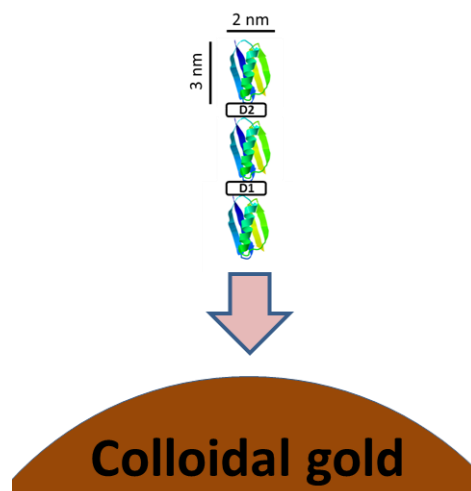


Рис. 19. Изображения использованных в работе белков и результаты моделирования их конъюгатов с коллоидным золотом (диаметр 24 нм).

### ***3.2.2. Исследование влияния рН среды на сорбцию белка на КЗ***

Растворы КЗ, синтезированного цитратным методом, имеют кислую либо слабо кислую реакцию среды: значения рН от 3 до 6 ед. в зависимости от размера частиц. При получении частиц КЗ большего размера рН уменьшается из-за снижения уровня цитрата натрия, смещающего рН в сторону нейтральных значений (рН 1%-ного раствора цитрата натрия – 7,3).

КЗ, имея на поверхности отрицательный заряд (см. раздел 1.2.2.), наиболее устойчиво в щелочной среде. Поэтому в ИХА предпочтительно использование коллоидных конъюгатов, синтезированных в щелочной среде [167; 168]. В связи с этим нами на примере БСА было проведено сравнение сорбции на КЗ при различных рН. Изучение сорбции проводили флуоресцентным методом по схеме, описанной в разделе 3.2.1. с единственным отличием: перед конъюгированием КЗ доводили 0,2 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до нужного значения рН.

Результаты определения количества адсорбированных молекул БСА на КЗ со средним диаметром 20, 24 и 48 нм в зависимости от рН иммобилизации приведены на рис. 20. Эти данные демонстрируют, 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 диапазоне 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. Данные эффекты можно объяснить тем, что в щелочной среде увеличивается отрицательный заряд молекул БСА (рI 4,7 в воде при 25 °С) и, соответственно, усиливается их отталкивание от отрицательно заряженных частиц КЗ. Таким образом, возникает электростатический барьер, преодолеваемый только молекулами белка с достаточной кинетической энергией, количество которых возрастает при повышении концентрации. В щелочных растворах не наблюдается насыщения поверхности даже при концентрациях 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).

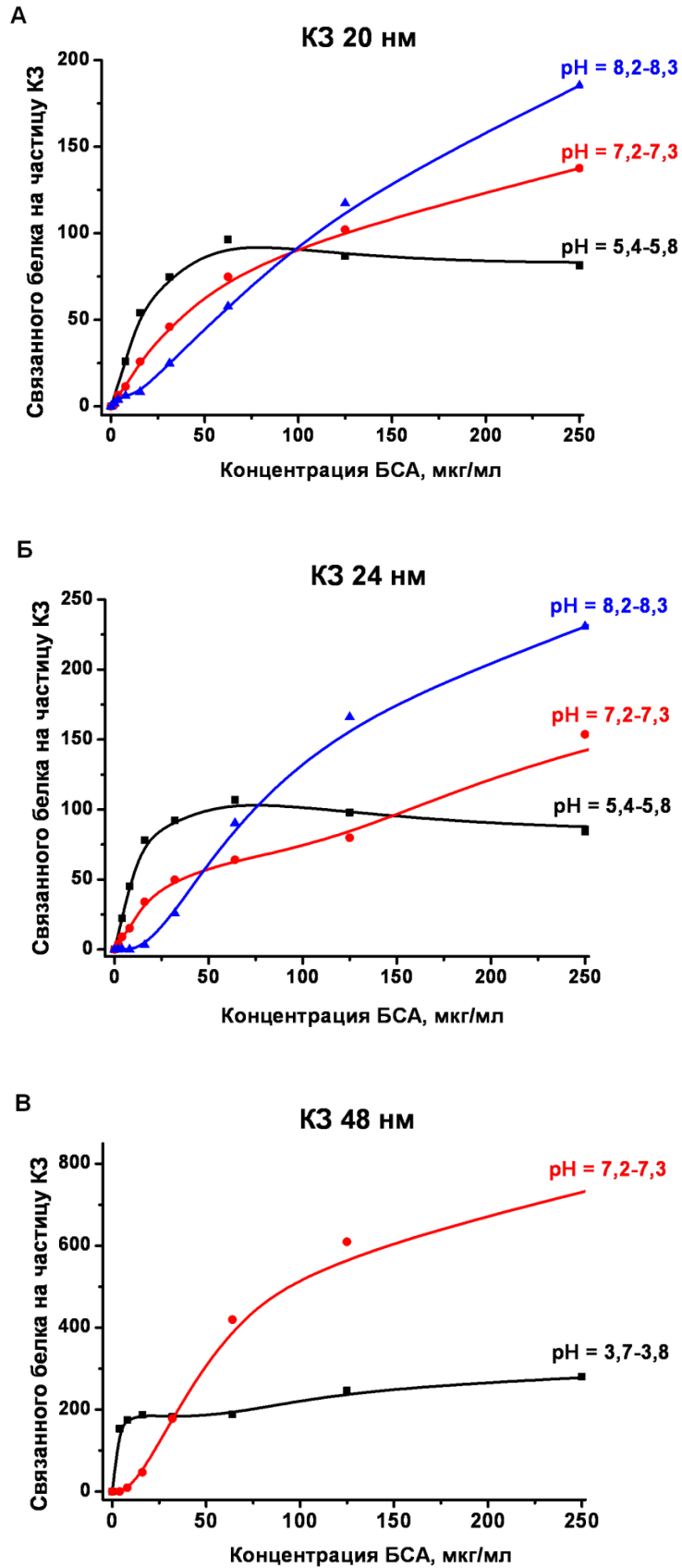


Рис. 20. Зависимость количества молекул БСА, сорбированных на одной частице КЗ разного диаметра (А – 20 нм; Б – 24 нм; В – 48 нм) от концентрации БСА при синтезе для разных значений рН среды конъюгации.



Как было показано в разделе 3.2.1, в кислых растворах белки сорбируются на КЗ до заполнения монослоя. Увеличение максимального количества сорбированного белка при повышении рН означает, что в щелочных растворах на частице КЗ образуется несколько белковых слоев. Таким образом, в зависимости от рН среды может происходить как монослойная, так и полислойная сорбция, что позволяет объяснить различия результатов, полученных разными группами исследователей (см. раздел 1.2.4). Однако могут быть и другие причины разных закономерностей сорбции белков на КЗ.

### **3.3. Характеристика состава и функциональной активности коллоидных конъюгатов методом ИФА**

#### ***3.3.1. Определение состава конъюгатов КЗ с антителами методом ИФА***

Разработанная нами методика определения состава конъюгатов КЗ с белками позволяет быстро характеризовать взаимодействия двух компонентов – КЗ и белка. Однако она не позволяет определить состав конъюгата, полученного при взаимодействии с несколькими белками. В то же время конъюгаты КЗ, используемые в ИХА, после функционализации поверхности антителами, белками А/Г и др. стабилизируют, как правило, с помощью БСА. Таким образом, флуоресцентный метод не позволяет определить состав конъюгатов после их стабилизации.

По этой причине нами была разработана альтернативная методика определения состава конъюгатов, основанная на методе ИФА. Ее экспериментальная реализация была проведена на примере конъюгатов КЗ с антивидовыми антителами (sIgG). Предлагаемая методика основана на анализе концентрации антител в надосадочной жидкости, полученной после конъюгации антител с КЗ, стабилизации конъюгата БСА и отделении конъюгата от раствора центрифугированием. В отличие от флуоресцентного метода, ИФА позволяет специфично определять концентрацию одного аналита в сложной смеси, поэтому присутствие БСА не влияет на результаты анализа.

Определение концентрации непрореагировавших с КЗ молекул sIgG проводили следующим образом. В микропланшетах для ИФА сорбировали hIgG. Затем лунки микропланшета отмывали и добавляли надосадочные жидкости, полученные после центрифугирования конъюгатов КЗ-sIgG. Для каждого препарата надосадочной жидкости готовили 8 разведений с 2-кратным шагом. Для построения калибровочной кривой в соседние лунки микропланшета добавляли растворы sIgG известных концентраций. После инкубации микропланшеты отмывали от несвязавшихся иммуноглобулинов и добавляли антитела мыши против sIgG, меченные пероксидазой (P-MASIss). Таким образом, в

лунках планшета формировались комплексы hIgG-sIgG-P-MASIss. После повторной отмывки определяли пероксидазную активность иммобилизованных меченых иммунных комплексов добавлением субстрата ТМБ.

Калибровочный график зависимости сигнала в ИФА от концентрации sIgG представлен на рис. 21. Линейность зависимости сохраняется до 0,8 единиц оптической плотности (OD); коэффициент корреляции на этом участке равен 0,99, а аппроксимирующая функция:

$$OD=0,12+10,7 \cdot C, \quad (4)$$

где 0,12 – фоновое окрашивание субстрата.

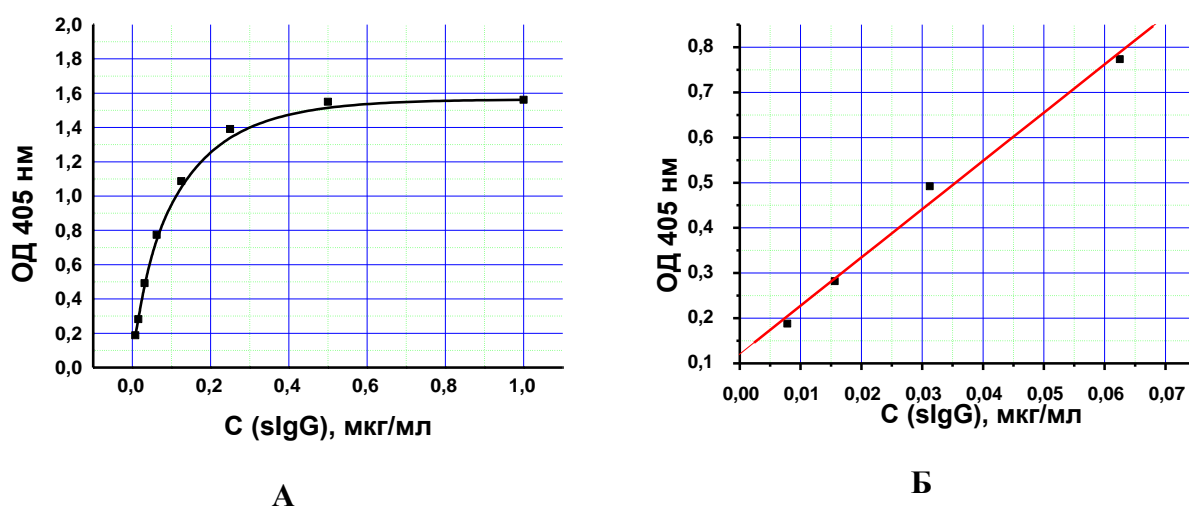


Рис. 21. Калибровочная зависимость для предложенной методики определения состава конъюгатов. А. – Зависимость оптической плотности субстратного раствора при 405 нм при проведении ИФА от концентрации sIgG в пробе; Б. – Линейная область зависимости.

Концентрацию sIgG в надосадочной жидкости вычисляли, сравнивая оптические плотности в лунках микропланшета, в которых методом ИФА были охарактеризованы надосадочные жидкости после синтеза конъюгатов и стандартные растворы sIgG. Для этого выделяли линейные участки полученных зависимостей оптической плотности от обратной величины разведения надосадка и на основании уравнения (4) определяли концентрацию свободных sIgG в надосадочной жидкости. Вычитая полученную величину из изначально добавленной концентрации, вычисляли концентрацию связанных с КЗ sIgG.

Результаты проведенных расчетов для серии конъюгатов КЗ-sIgG представлены в табл. 5. Как видим, при варьировании исходной концентрации sIgG от 5,0 до 93,5 мкг/мл доля связанных sIgG составляет от 92 до 74%, уменьшаясь по мере роста исходной

концентрации sIgG. На рис. 22 представлена зависимость концентрации конъюгированных с КЗ иммуноглобулинов от исходно добавленной, рассчитанная на основании данных, полученных по разработанной методике.

Табл. 5. Концентрации sIgG в надосадочных жидкостях после первого и второго центрифугирования конъюгатов, определенные по разработанной методике, и рассчитанные концентрации конъюгированных с КЗ антител.

С (sIgG) добавленная, мкг/мл	С (sIgG) в 1-м надосадке, мкг/мл	С (sIgG) во 2-м надосадке, мкг/мл	Рассчитанная С (sIgG) в конъюгате, мкг/мл	% конъюгированных антител
5	0,2	0,2	4,6	92
10	0,7	0,2	9,1	91
30	4,5	0,5	25,0	83
50	9,6	1,3	39,1	78
93,5	23,2	1,1	69,2	74

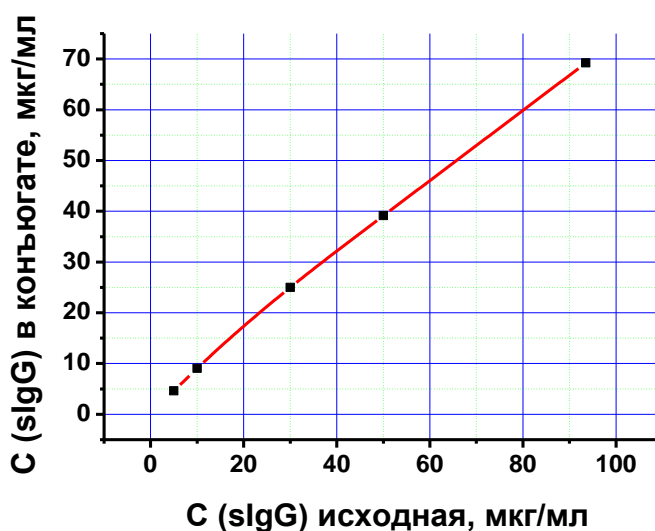


Рис. 22. Зависимость концентрации sIgG, связанных в конъюгате, от исходно добавленной концентрации sIgG.

### 3.3.2. Определение степени сохранения связывающей способности антител после конъюгации с КЗ

Определение сорбционной емкости маркерных частиц дает важную информацию о максимально возможном количестве центров связывания в конъюгате. Однако не все сорбированные на поверхности наночастиц белковые молекулы сохраняют свои функциональные свойства. Так, иммуноглобулины могут связаться с поверхностью золота антиген-связывающими фрагментами, после чего они частично или полностью теряют способность взаимодействовать с антигеном. С учетом этого нами была разработана методика определения связывающей способности антител после конъюгирования с коллоидным золотом, основанная на ИФА. 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. 23. Конъюгат КЗ с антивидовыми антителами против иммуноглобулинов человека инкубируется с иммуноглобулинами человека. После этого конъюгат КЗ со связанными антителами человека отделяется центрифугированием, и в надосадочной жидкости определяется концентрация свободных иммуноглобулинов человека методом ИФА. После вычитания полученной концентрации из исходно добавленной получаем концентрацию иммуноглобулинов человека, связанных с конъюгатом КЗ-антивидовые антитела. Сравнивая концентрации сорбированных на КЗ антивидовых антител с концентрацией связанных ими иммуноглобулинов человека, делаем вывод о доле антивидовых антител, сохранивших после конъюгирования способность связываться со своим партнером.

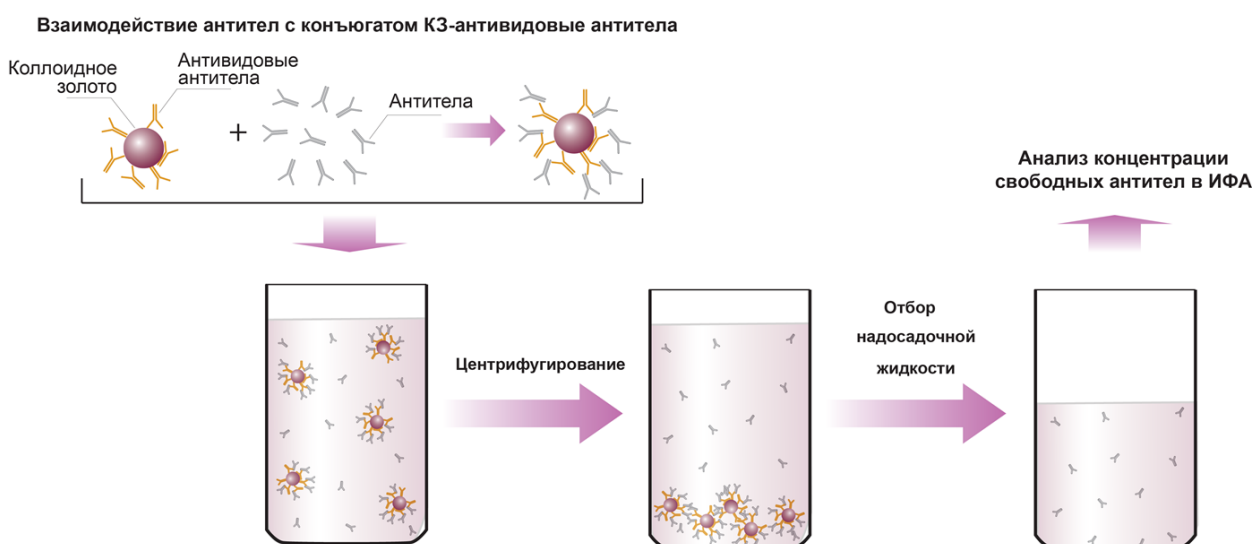


Рис. 23. Схема определения количества активных связывающих центров иммобилизованного белка на маркерном конъюгате.

В эксперименте использовали конъюгаты КЗ-sIgG, полученные с использованием sIgG в концентрации при конъюгировании, равной 30 мкг/мл. Как показано в разделе 3.3.1, из добавленных 30 мкг/мл sIgG с наночастицами связывается около 25 мкг/мл. Конъюгат инкубировали с растворами hIgG разной концентрации и затем концентрировали в 10 раз. Это концентрирование позволяет увеличить количество связываемых hIgG и, как следствие, повысить точность измерений. После смешивания конъюгата с растворами hIgG происходит его 6-кратное разбавление (в 3 раза PBST и еще в 2 раза раствором hIgG). Таким образом, в реакционном растворе оказывается 42 мкг/мл sIgG. В опыте использовали 4 конечные концентрации hIgG: 50, 30, 10 и 5 мкг/мл. После инкубации образовавшиеся комплексы hIgG с конъюгатом КЗ-sIgG центрифугировали и измеряли содержание hIgG в надосадочной жидкости методом ИФА.

ИФА проводили следующим образом. В лунках микропланшета сорбировали кроличьи антитела против иммуноглобулинов G человека (RAHss). 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-MAHss). После инкубации и отмывки в лунках микропланшета определяли содержание тройных комплексов RAHss-hIgG-P-MAHss, добавляя субстрат ТМБ и регистрируя оптическую плотность.

На рис. 24 приведен калибровочный график зависимости оптической плотности при 405 нм от концентрации hIgG. Начальный участок зависимости (оптическая плотность до 0,8) линеаризовали по уравнению:

$$OD = 0,02 + 13,4 \cdot C, \quad (5)$$

(фоновый сигнал – 0,02, коэффициент корреляции равен 0,98).

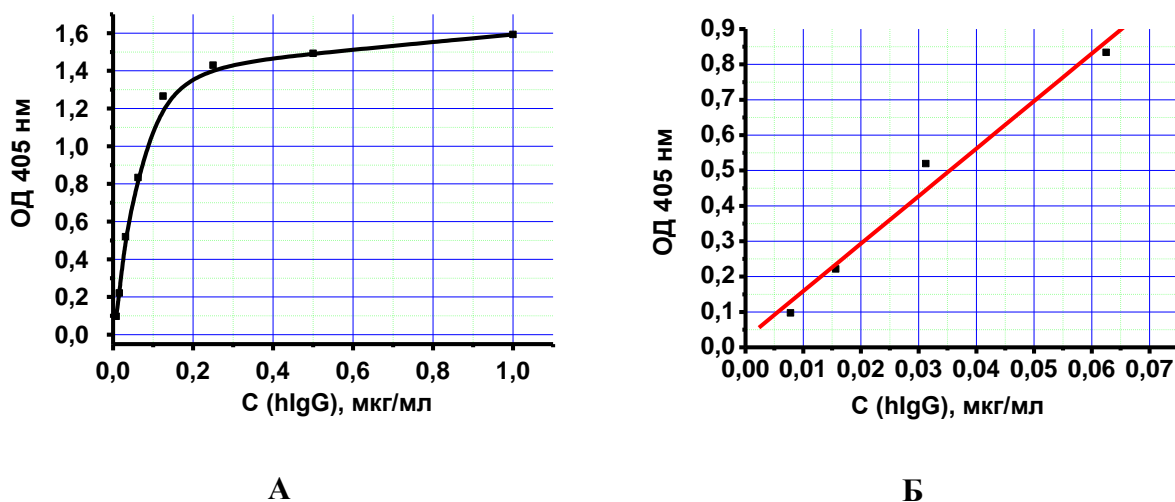


Рис. 24. Калибровочная зависимость для предложенной методики определения степени сохранения связывающей способности антител после конъюгации с КЗ. А – зависимость оптической плотности субстратного раствора при 405 нм при проведении ИФА от концентрации hIgG в пробе; Б – линейная область зависимости.

Далее вычисляли концентрацию hIgG в надосадочной жидкости, сравнивая окрашивание субстрата в лунках с надосадком и с калибровочными растворами. Для каждой пробы надосадочной жидкости готовили 8 разведений с шагом 2. Из полученных зависимостей выбирали точки, укладывающиеся в линейную область, и вычисляли концентрацию hIgG согласно уравнению (5). Исходя из этих данных, вычисляли концентрацию не связанных с КЗ hIgG. Вычитая полученную величину из изначально добавленной концентрации hIgG, получали концентрацию hIgG, связанных с КЗ. Полученные результаты для разных исходных концентраций hIgG представлены в табл.6. Зависимость концентрации hIgG, связавшихся с конъюгатом КЗ-sIgG, от исходно добавленной концентрации hIgG (рис. 25) демонстрирует, что увеличение добавленной концентрации hIgG от 5 до 30 мкг/мл приводит к увеличению количества hIgG, связанных конъюгатом КЗ-sIgG, более чем в 2 раза. При дальнейшем увеличении добавленной концентрации hIgG до 50 мкг/мл концентрация связанных hIgG повышается всего на 3%, что свидетельствует о достижении предельной связывающей способности конъюгата. Максимальная концентрация связавшихся с конъюгатом hIgG составила 10 мкг/мл.

Табл. 6. Концентрации hIgG в надосадочных жидкостях после центрифугирования конъюгатов, определенные по разработанной методике, и рассчитанные концентрации hIgG, связавшиеся с конъюгатом КЗ-sIgG.

С (hIgG) добавленная, мкг/мл	С (hIgG) в надосадке, мкг/мл	Рассчитанная С (hIgG), связанных с конъюгатом КЗ- sIgG, мкг/мл
5	0,9	4,1
10	5,6	4,4
30	20,3	9,7
50	40,0	10

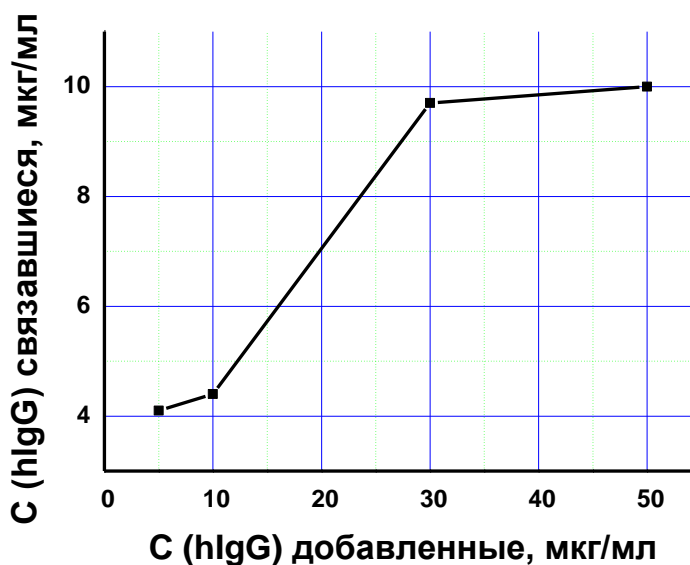


Рис. 25. Зависимость концентрации hIgG, связавшихся с конъюгатом КЗ-sIgG, от исходно добавленной концентрации hIgG.

Соотношение концентраций в реакционном объеме связавшихся hIgG и sIgG, иммобилизованных на КЗ, равно 0,24. При этом, поскольку каждое антитело имеет по 2 валентности, потенциально каждая молекула sIgG могла бы связать по 2 молекулы hIgG, то есть заняты лишь 12% потенциальных валентностей.

Низкий процент прореагировавших антител может быть объяснен несколькими причинами. Первая причина – неориентированная сорбция антител на поверхность золота, вследствие чего часть антител теряет возможность связываться с антигеном. Вторая

причина связана с тем, что IgG человека являются объемным антигеном и могут заслонять один или несколько антигенсвязывающих центров на поверхности конъюгата. Также возможно образование полислойных структур из сорбированных молекул антител на поверхности КЗ, поскольку в данных экспериментах использовался конъюгат, синтезированный при рН 9. Как показано в разделе 3.2.2, щелочная среда делает возможной полислойную иммобилизацию белков на поверхности КЗ. В результате внутренние слои сорбированных молекул антител становятся недоступны для антигена.

### **3.4. Определение кинетических и равновесных параметров взаимодействий антиген-антитело**

Еще одним важным параметром, влияющим на характеристики иммунохроматографического анализа, является аффинность взаимодействия пары антиген-антитело. Для определения кинетических и равновесных констант взаимодействия использовали биохимический анализатор Biacore, использующий технику поверхностного плазмонного резонанса.

Исследуемой взаимодействующей парой были рекомбинантный антиген Rv0934 *M. tuberculosis* и мышинные моноклональные антитела НТМ81 против данного антигена. Данные реагенты были использованы для определения возможностей выявления специфических антител в ИХА и калибровки разрабатываемых тест-систем.

#### **3.4.1. Определение оптимального значения рН иммобилизации белка**

Для регистрации иммунных взаимодействий методом ППР необходимо иммобилизовать один из компонентов иммунной пары на сенсорной поверхности. рН используемого буферного раствора должен обеспечивать оптимальное соотношение зарядов на белковой глобуле и на поверхности чипа и, тем самым, - максимальное сродство иммобилизуемых молекул и сенсорной поверхности. Оптимальный рН иммобилизации антител определяли, пропуская через аналитическую ячейку растворы антител с рН в кислом диапазоне (в цитратных буферах), поскольку поверхность чипа имеет отрицательный заряд. Растворы пропускались только через аналитическую ячейку, ячейка сравнения оставалась закрытой. На рис. 26 представлена сенсограмма взаимодействий поверхности чипа с иммуноглобулином G для последовательного введения в сенсорную ячейку его растворов с разными значениями рН (от 5,5 до 3,5).



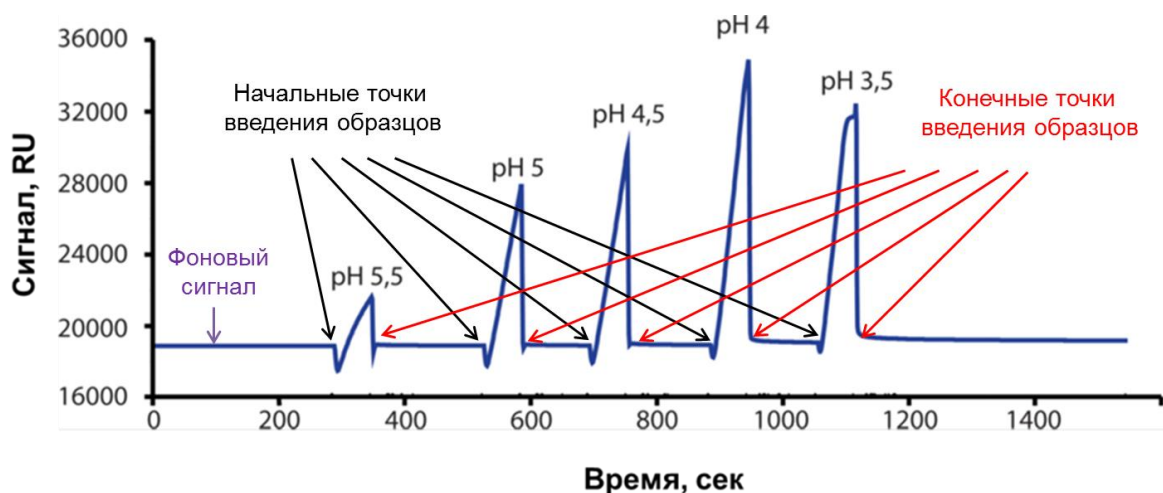


Рис. 26. Сенсограмма взаимодействий иммуноглобулинов G с немодифицированной поверхностью чипа, полученная при различных значениях pH буферного раствора.

Каждый пик на сенсограмме соответствует взаимодействию поверхности чипа с иммуноглобулинами при определенном значении pH. Сорбция белка на сенсорной поверхности сопровождается ростом сигнала из-за накопления белковых молекул на поверхности. После прекращения введения иммуноглобулинов в ячейку происходит быстрая десорбция белковых молекул с поверхности, которая сопровождается резким падением сигнала до фонового уровня.

Наибольший рост сигнала наблюдали при внесении иммуноглобулинов в раствор 10 mM натрий-цитратного буфера с pH 4,0, который и использовали далее.

Функционализацию поверхности проводили пропусканием смеси 0.05 M EDC / 0.2 M NHS через аналитическую ячейку и ячейку сравнения. Затем закрывали ячейку сравнения и через аналитическую ячейку пропускали раствор иммуноглобулинов с концентрацией 200 мкг/мл в 10 mM натрий-цитратном буфере с pH 4,0. Далее открыли ячейку сравнения и через обе ячейки пропускали 1 M раствор этаноламина для блокировки активированных групп.

#### 3.4.2. Определение констант иммунного взаимодействия

Для взаимодействующей пары антиген-антитело измеряли сенсограммы при различных концентрациях антигена: 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 30; 40 и 50 мкг/мл (рис. 27).

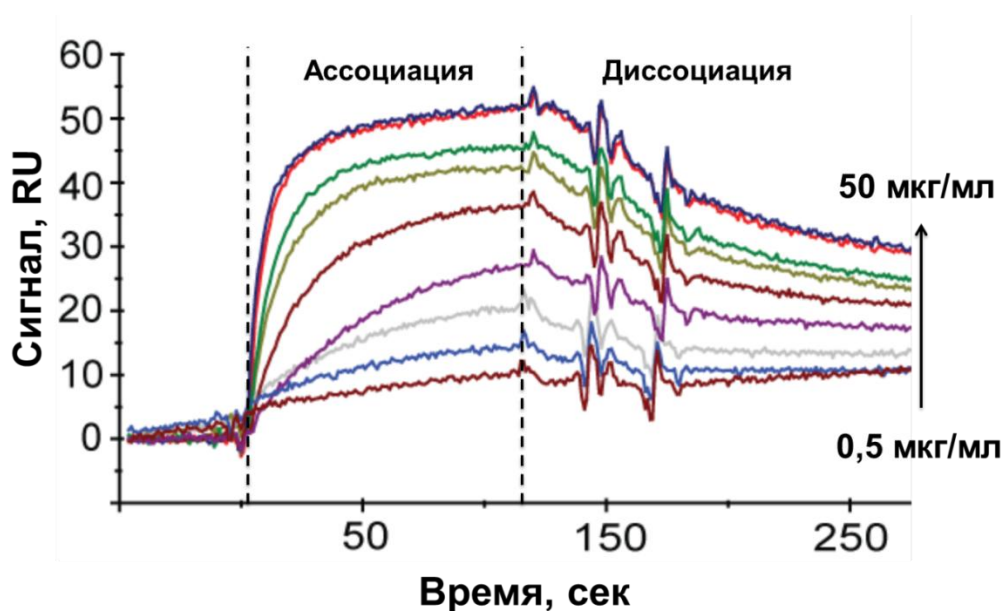


Рис. 27. Сенсограммы взаимодействия антигена Rv0934 *M. tuberculosis* с модифицированной антителами NTM81 поверхностью чипа CM5. Концентрации антигена 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 30; 40; 50 мкг/мл. Пунктирными линиями на рисунке показаны начало и конец временного интервала протекания растворов антигена через сенсорную ячейку. Значения сигнала – разница между величинами RU в аналитической ячейке и ячейке сравнения.

Константу ассоциации рассчитывали в приближении равновесных условий по формуле

$$R_{eq} = (K_a \cdot C \cdot R_{max}) / (1 + K_a \cdot n \cdot C), \quad (6)$$

где  $K_a$  – равновесная константа связывания,  $R_{eq}$  – сигнал сенсора, отражающий степень связывания,  $R_{max}$  – максимальный сигнал сенсора, отражающий степень связывания,  $C$  – концентрация добавленного антигена,  $n$  – стерический фактор (данный фактор определяет количество иммобилизованных на поверхности молекул IgG, которые заслоняет одна связавшаяся молекула антигена; если заслонения не происходит,  $n$  принимается равным 1).

Поскольку в нашем случае антиген в несколько раз меньше IgG ( $M_r$  38 кДа и 150-160 кДа), то  $n$  можно принять за единицу.

Для расчета  $R_{eq}$  потенциально можно использовать любую точку на участке ассоциации сенсограммы. Однако, поскольку расчет ведется в приближении равновесных условий, то значения констант будут тем точнее, чем ближе реакция к равновесным условиям. Наиболее точные значения констант можно получить, если использовать в

качестве  $Req$  значения сигнала на конечном участке ассоциации (точки пересечения второй пунктирной линии с сенсограммами на рис. 27).

Таким образом, из переменных уравнения (6) нам известны  $n$ ,  $Req$  и добавленные концентрации  $C$ .

В координатах Скетчарда ( $1/Req$  от  $1/C$ ) геометрическое место точек уравнения (6) приобретает вид прямой линии (рис. 28) – коэффициент корреляции 0,998. Точка пересечения прямой с осью ординат дает величину  $1/R_{max} = 0,0192 \pm 0,0003$ , а тангенс наклона линеаризованной зависимости –  $1/(K_a \cdot R_{max}) = 2,52 \times 10^{-9} \pm 7 \times 10^{-11}$ , откуда находится значение  $K_a = (7,6 \pm 0,4) \times 10^7$ .

Из полученных сенсограмм для расчетов  $K_a$  использовали лишь те, которые не приводят к ошибкам определения константы. При этом руководствовались следующими критериями отбора:

1. Для расчета в рамках равновесной модели необходимы величины  $Req$ , наиболее близкие к равновесным. Однако для низких концентраций антигена равновесие может достигаться в течение продолжительного времени и во время пропускания пробы сигнал растет практически линейно (рис. 27, три нижние сенсограммы). Такие пробы исключались из рассмотрения, так как для них невозможно установить равновесное значение сигнала, что повышает погрешность определения констант в рамках равновесной модели.

2. Также исключались пробы, для которых завышена концентрация антигена: молекулы антигена заполняют практически все центры связывания и дальнейшее увеличение концентрации не приводит к повышению сигнала, достаточному для определения константы взаимодействия. Для концентраций антигена 40 и 50 мкг/мл (Рис. 27, две верхние сенсограммы) сенсограммы взаимодействия практически идентичны, соответственно, нарушается зависимость  $Req$  от  $C$ .

Таким образом, расчет  $K_a$  проводился на основании анализа сенсограмм для четырех концентраций антигена: 5; 10; 20; 30 мкг/мл.

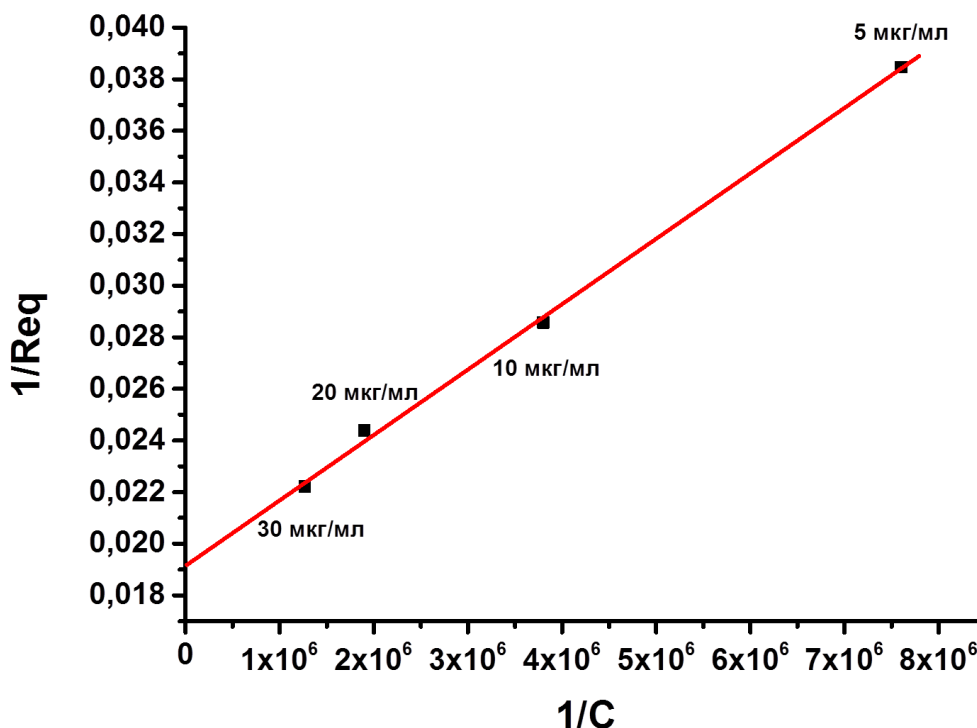


Рис. 28. Зависимость обратного сигнала Вiascore от обратной концентрации добавленного антигена (координаты Скетчарда).

Кинетическую константу диссоциации рассчитывали по формуле:

$$R=R_0 e^{-k_d(t-t_0)} + \text{Offset}, \quad (7)$$

где  $R$  – сигнал при времени  $t$ ,  $R_0$  – сигнал в начале участка диссоциации (при времени  $t_0$ ),  $\text{Offset}$  – фоновый сигнал.

Данное уравнение описывает кинетику необратимой диссоциации, т.к. антиген из диссоциировавшего комплекса вымывается из реакционной зоны и не может реассоциировать.

В отличие от  $K_a$ ,  $k_d$  не зависит от абсолютной концентрации комплекса, т.к. реакция диссоциации комплекса является мономолекулярной, а значит, за одинаковые промежутки времени распадается одинаковая доля комплекса [178]. Поэтому для расчета кинетической константы диссоциации можно использовать любую из сенсограмм. Однако наиболее точные значения получаются для высоких концентраций комплекса из-за большего, а значит и более достоверного, падения сигнала. Для расчета  $k_d$  были отобраны четыре верхние сенсограммы, соответствующие концентрациям антигена 50, 40, 30, 20 мкг/мл.

После нахождения  $K_a$  вычисляли  $k_a$  и  $K_d$ , используя выражения  $K_a = k_a/k_d$ ;  $K_d = k_d/k_a$ . Для исследованной пары антиген Rv0934 *M. tuberculosis* – моноклональные антитела НТМ81 значения кинетических и равновесных констант приведены в табл. 7.

Табл. 7. Кинетические и равновесные константы взаимодействий антигена Rv0934 *M. tuberculosis* с моноклональными антителами НТМ81

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

### 3.5. Разрабатываемые схемы ИХА

ИХА для серодиагностики может быть реализован в различных вариантах, которые отличаются порядком формирования комплексов на иммунохроматографических мембранах и, соответственно, составом окрашенного комплекса в аналитической зоне тест-системы. Рассмотрим последовательно три использованные в работе схемы ИХА.

#### 3.5.1. Традиционная схема ИХА для серодиагностики (Схема А)

Традиционная схема иммунохроматографической серодиагностики представлена на рис. 29. В данной схеме ИХА используется конъюгат КЗ с иммуноглобулин-связывающим белком (антивидовыми антителами, белком А *Staphylococcus aureus*, белком G *Streptococcus* spp. или другими реагентами для связывания иммуноглобулинов). Проба крови или сыворотки протекает через мембраны тест-системы. На первой стадии происходит взаимодействие всех иммуноглобулинов в пробе с коллоидным конъюгатом. Затем фронт жидкости преодолевает аналитическую зону, которая представляет собой участок мембраны с иммобилизованным антигеном. Конъюгат КЗ с иммуноглобулин-связывающим белком взаимодействует с иммобилизованными молекулами антигена, в результате чего в аналитической зоне образуется тройной окрашенный комплекс. Степень связывания маркера с иммобилизованным антигеном и, соответственно, интенсивность окрашивания мембраны определяются концентрацией специфических антител в пробе.

## Схема А

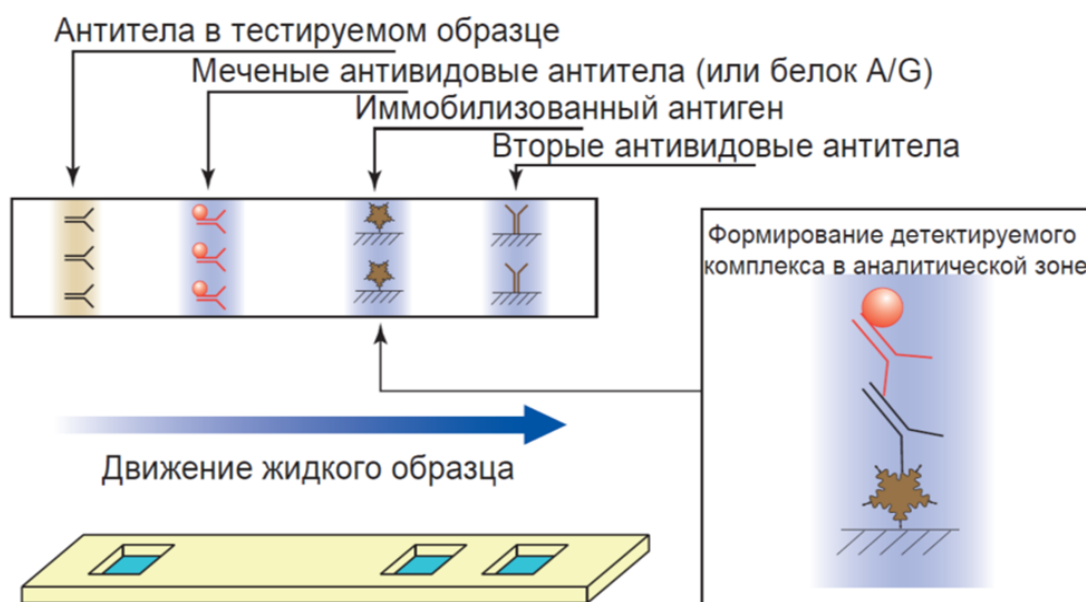


Рис. 29. Традиционная схема иммунохроматографической серодиагностики (Схема А).

### 3.5.1.1. Анализ влияния неспецифических антител на чувствительность иммунохроматографической серодиагностической системы в стандартном формате (Схема А)

Как уже отмечалось, общий уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови значительно превышает уровень специфических иммуноглобулинов. Для демонстрации ослабления сигнала в ИХА вследствие конкуренции специфических и неспецифических антител за связывание с маркером и количественной оценки данного ослабления был проведен модельный опыт. Моноклональные антитела НТМ81 против антигена Rv0934 в концентрации 10 мкг/мл смешивались с моноклональными антителами, не взаимодействующими с данным антигеном, в соотношениях от 1:1 до 1:30, а затем проводилось выявление специфических антител в полученных растворах по традиционной схеме ИХА. При концентрациях конъюгатов КЗ со средними диаметрами 20 нм и 48 нм, равных  $10^{-9}$  М и  $9 \cdot 10^{-11}$  М, соответственно, присутствие неспецифических антител в двукратном избытке по отношению к специфическим снижает сигнал (окрашивание аналитической зоны) до визуально недетектируемого предела (что соответствует сигналу анализатора «Рефлеком» 0,5 усл. ед.). При увеличении концентрации конъюгатов в 3 раза предел визуальной детекции достигается при соотношении специфических/неспецифических антител, равном 10-20 (рис. 30).

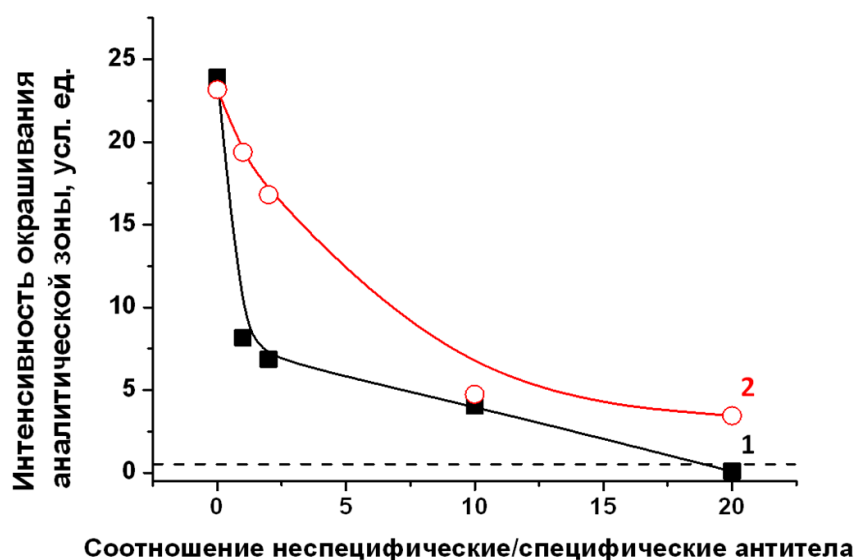


Рис. 30. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны от соотношения специфических и неспецифических антител (1 – КЗ 20 нм, 2 – КЗ 48 нм). (-----) – предел визуальной детекции.

С целью преодоления ограничений традиционной схемы серодиагностического ИХА нами были предложены альтернативные схемы, позволяющие снизить мешающее влияние неспецифических иммуноглобулинов на аналитические характеристики тест-систем.

### 3.5.2. «Обратная» схема ИХА для серодиагностики (Схема Б)

В связи с высокой концентрацией иммуноглобулинов в крови, очевидно, что для увеличения чувствительности иммунохроматографической серодиагностики следует использовать как можно более высокие концентрации иммуноглобулин-связывающего белка. Однако это увеличение лимитировано низкой сорбционной емкостью КЗ (см. раздел 3.2.). Концентрирование же конъюгата КЗ – иммуноглобулин-связывающий белок более чем на порядок приводит к его полной или частичной агрегации. Сорбционная емкость рабочей мембраны иммунохроматографического теста на несколько порядков выше, чем КЗ – до 15 мг/мл (согласно паспорту производителя мембран), что сопоставимо с общей концентрацией иммуноглобулинов в крови. Поэтому нами был предложен способ ИХА, в котором молекулы антигена или антигенов сорбируются на поверхности КЗ, а в аналитической зоне тест-полоски иммобилизуется белок, связывающий

иммуноглобулины: антивидовые антитела, белок А из *Staphylococcus aureus*, белок G из *Streptococcus* spp. и др. (рис. 31). В данной схеме ИХА на первой стадии специфические иммуноглобулины взаимодействуют с конъюгатом КЗ-антиген, далее образовавшийся комплекс мигрирует вместе с жидким образцом к аналитической зоне с иммобилизованным иммуноглобулин-связывающим белком. Иммуноглобулин-связывающий белок иммобилизуется в аналитической зоне в концентрациях, достаточных для связывания всех иммуноглобулинов в образце, что исключает конкуренцию специфических и неспецифических иммуноглобулинов за связывание в аналитической зоне.

## Схема Б

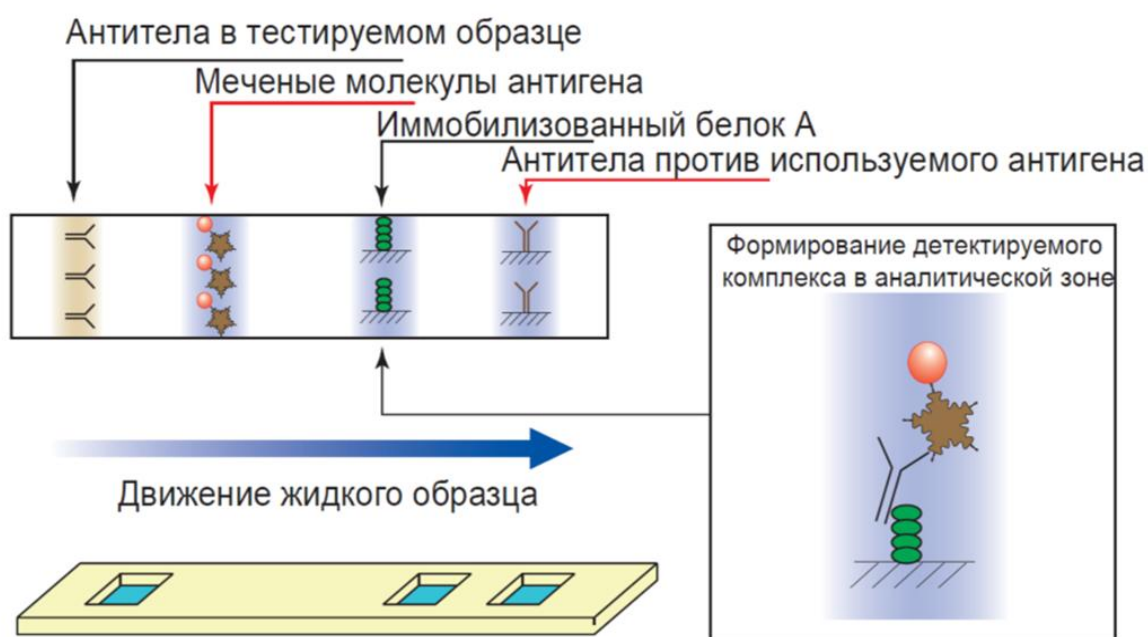


Рис. 31. Схема серодиагностического ИХА с обратной последовательностью формирования детектируемых комплексов (Схема Б).

### 3.5.3. Схема ИХА для серодиагностики с использованием свойства поливалентности антител (Схема В)

Еще одним способом устранения негативного влияния неспецифических иммуноглобулинов в иммунохроматографической серодиагностике является использование поливалентности иммуноглобулинов. В предложенной нами схеме ИХА, представленной на рис. 32, на частицах КЗ и в аналитической зоне иммобилизуется один и тот же антиген. И с коллоидным конъюгатом, и в аналитической зоне связываются только



специфические иммуноглобулины, которые взаимодействуют с антигенными молекулами двумя разными антиген-связывающими центрами. Следует, однако, отметить наличие в этой схеме другого мешающего процесса, обусловленного возможностью взаимодействия антител двумя валентностями с антигенными молекулами, иммобилизованными на одном носителе. Данный процесс ухудшает аналитические характеристики ИХА, построенного по схеме В.

## Схема В



Рис. 32. Схема серодиагностического ИХА с использованием поливалентности антител (Схема В).

### 3.6. Моделирование систем определения специфических антител

#### 3.6.1. Условные обозначения:

A – иммуноглобулины в пробе;

P – 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 коллоидным конъюгатом;

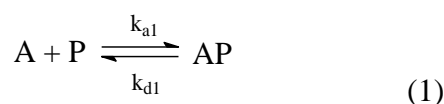
$t_1$  – время реакции в аналитической зоне;

$T$  – разность между  $t$  и  $t_1$ ;

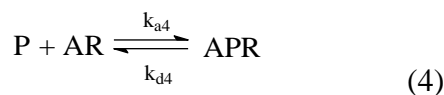
$x$  – доля специфических иммуноглобулинов в общем пуле иммуноглобулинов тестируемой пробы.

### 3.6.2. Реакции, протекающие в ИХ-системе

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



После достижения фронтом жидкости аналитической зоны дополнительно происходят реакции с иммобилизованным в аналитической зоне рецептором, описываемые схемами:



Компоненты R, AR, APR иммобилизованы в аналитической зоне, а компоненты A и AP протекают через нее (рис. 33). Очевидно, что сигнал в аналитической зоне пропорционален [APR], при этом интенсивность окраски в разных частях аналитической зоны может отличаться. Для простоты мы будем рассчитывать концентрации связанных реагентов вблизи левой (согласно рис. 33) границы аналитической зоны. Так как в эту зону все время поступают новые молекулы A, P и AP, а непрореагировавшие A, P и AP вымываются потоком жидкости, то можно считать, что концентрации этих трех реагентов вблизи левой границы аналитической зоны определяются только реакцией (1).

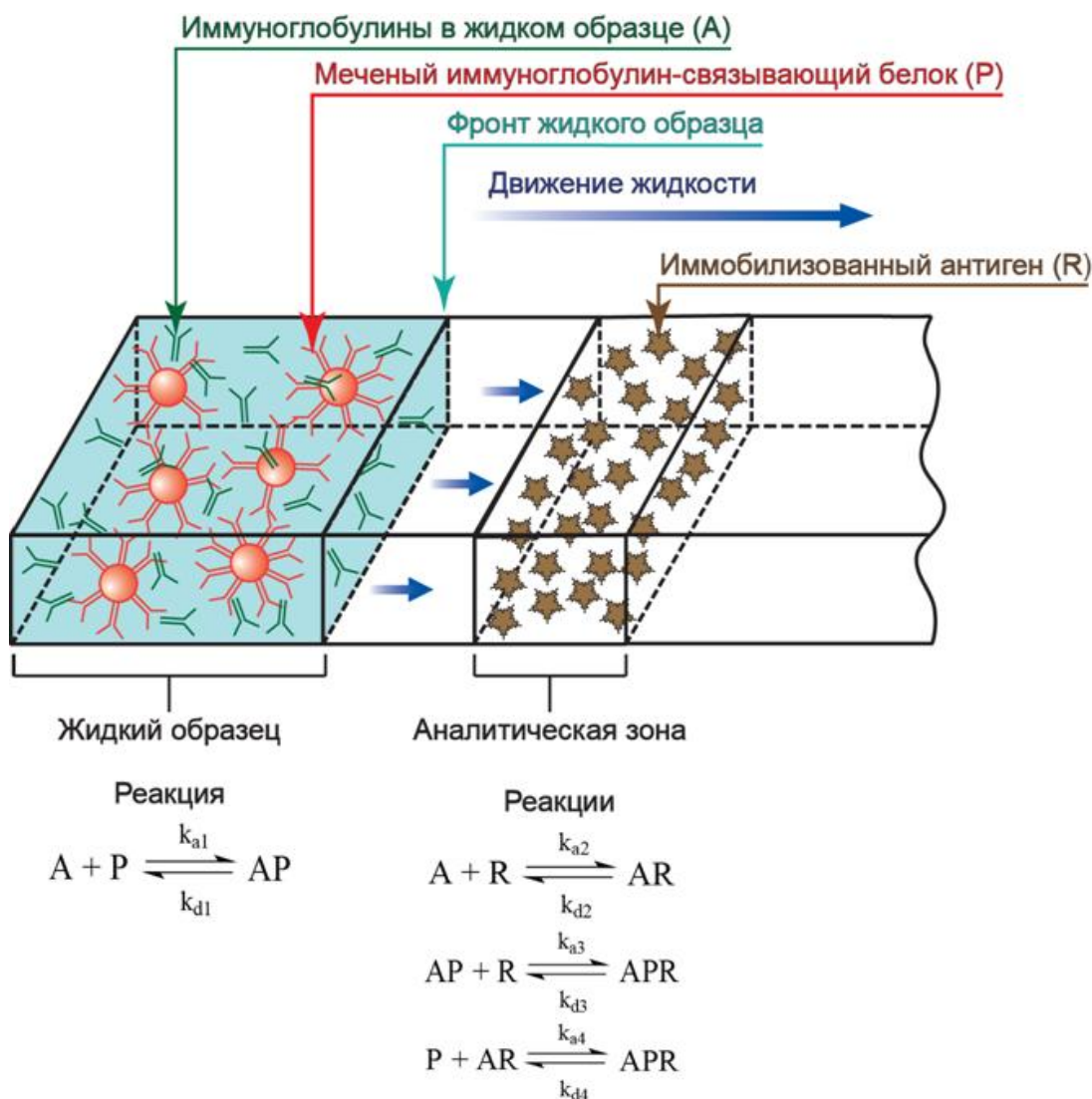


Рис. 33. Упрощенная схема иммунохроматографической системы для построения модели.

### 3.6.3. Упрощения и приближения

Для построения модели необходимо ввести ряд упрощений и приближений:

- 1 В системе существуют два обособленных участка: участок до аналитической зоны и собственно аналитическая зона. Миграция веществ происходит вместе с потоком жидкости в направлении аналитической зоны равномерно по всему фронту.
- 2 Анализ подразделяется на три стадии: 1. Иммуноглобулины в образце взаимодействуют с коллоидным конъюгатом, но фронт пробы 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 имеется два реакционных объема: объем движущейся жидкой пробы и объем аналитической зоны. Реагенты А и Р равномерно распределены в реакционном объеме жидкой пробы, а реагент R равномерно распределен в пределах аналитической зоны (Рис. 33). Граница аналитической зоны проницаема для реагентов А и Р, и их комплекса, но непроницаема для 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 являются минорными вследствие стерических факторов).
- 5 Все антитела в пробе характеризуются одной усредненной аффинностью по отношению к антигену. Аффинность центров связывания антител на маркерном конъюгате также полагается одинаковой.

### 3.6.4. Моделирование системы определения специфических антител в ИХА по стандартной схеме (Схема А)

В стандартном формате серодиагностического ИХА скорость реакции (1) выражается формулой:

$$V_{AP} = \frac{\partial [AP]}{\partial t} = -\frac{\partial [A]}{\partial t} = -\frac{\partial P}{\partial t} = k_{a1} A P - k_{d1} [AP] \quad (8)$$

Квадратными скобками обозначены концентрации соответствующих реагентов.

В соответствии со схемами (2)-(4) скорости образования AR и APR описываются следующими формулами:

$$V_{AR} = \frac{\partial[AR]}{\partial t_1} = k_{a2}x A R - k_{d2} AR + k_{d4} [APR] \quad (9)$$

$$V_{APR} = \frac{\partial[APR]}{\partial t_1} = k_{a3}x AP R + k_{a4} AR P - (k_{d3} + k_{d4})[APR] \quad (10)$$

В реакции (1) участвуют все содержащиеся в пробе иммуноглобулины, а в реакциях (2)-(4) – только специфические антитела, поэтому в уравнениях (9), (10) появляется коэффициент  $x$ , отражающий долю специфических иммуноглобулинов в общем пуле иммуноглобулинов.

Поскольку сигнал в аналитической зоне отражает концентрацию образовавшегося комплекса APR, то основной целью построения модели является нахождение функции изменения  $[APR]$  при разных параметрах системы. Однако прежде чем перейти к решению этой задачи, нам понадобится вывести функции изменения концентраций других реагентов.

#### 3.6.4.1 Образование комплекса AP (стадия 1)

Уравнение (8) скорости изменения концентрации AP можно представить в виде:

$$V_{AP}/k_{d1} = K_{a1} A P - [AP], \quad (8a)$$

где  $K_{a1}$  – равновесная константа ассоциации иммуноглобулинов с иммуноглобулин-связывающим реагентом, иммобилизованным на поверхности коллоидного маркера.

Поскольку для связывания иммуноглобулинов, как правило, используются антивидовые антитела ( $K_a$  в диапазоне  $10^8 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$  [179]) или белки A/G ( $K_a$  в диапазоне  $10^7 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$  [180]), то можем принять, что  $K_{a1}$  находится в диапазоне  $10^7 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$ .

Начальная концентрация IgG (класса иммуноглобулинов, преобладающего в составе крови – более 70%) в пробе  $[A]_0$ , например, для человеческой сыворотки составляет 6-20 мг/мл (или  $4 \cdot 10^{-5} - 10^{-4} \text{ M}$ ) [181]. (Здесь и далее подстрочным индексом 0 обозначаются начальные концентрации). В большинстве случаев перед использованием сыворотки в ИХА её разбавляют в 2-4 раза, с учетом этого минимальная концентрация IgG составляет  $10^{-5} \text{ M}$ . Важной особенностью серодиагностического ИХА является то, что на первой стадии анализа конъюгат КЗ с иммуноглобулин-связывающим реагентом взаимодействует

со всеми иммуноглобулинами в пробе, а в аналитической зоне происходит взаимодействие антигена только со специфическими иммуноглобулинами, которые составляют малую долю всех иммуноглобулинов крови. Так, в крови людей концентрации IgG против индивидуальных антигенов не превышают 50 мкг/мл [182-185], т.е. специфические антитела против индивидуальных антигенов составляют менее 1% иммуноглобулинов крови. При целенаправленной иммунизации животных с адъювантами и дополнительными циклами реиммунизации можно добиться большего процентного соотношения специфических антител. Однако даже в гипериммунных сыворотках содержание специфических иммуноглобулинов достигает лишь 10% общего содержания иммуноглобулинов [186].

Оценить начальную концентрацию  $[P]_0$  значительно сложнее. Однако можно достоверно утверждать, что  $[P]_0$  минимум на порядок меньше, чем  $[A]_0$ . Из представленных выше данных о составе маркерных конъюгатов, измеренных на основании регистрации флуоресценции триптофана, следует, что на частицах коллоидного золота размером около 24 нм, синтезированных по методу Френса, в условиях монослойной иммобилизации может сорбироваться около 50 молекул IgG и около 500 молекул белка G на частицу. Концентрация частиц после синтеза составляет  $3,6 \times 10^{11}$  частиц/мл. После получения конъюгатов с белками на частицах будет сорбировано  $1,8 \times 10^{14}$  молекул белка G или  $1,8 \times 10^{13}$  молекул IgG в мл, что составляет  $3 \times 10^{-7}$  М и  $3 \times 10^{-8}$  М соответственно. В работе Horisberger и соавт. [187] изучены количественные характеристики взаимодействия КЗ, полученного аскорбатным методом, с белком А. По данным работы на частицах коллоидного золота диаметром 11,2 нм в оптимизированных условиях сорбируется до 38 молекул белка А. Концентрация наночастиц после синтеза –  $4,1 \times 10^{12}$  частиц на мл, соответственно концентрация сорбированного белка А – до  $1,55 \times 10^{14}$  молекул на мл ( $2,57 \times 10^{-7}$  М) – что сопоставимо с нашими выкладками. Однако далеко не все сорбированные молекулы сохраняют способность связываться с иммуноглобулинами, то есть эффективная концентрация иммуноглобулин-связывающего белка в несколько раз ниже, например, для антивидовых антител в 4 раза (см. раздел 3.3.2). При формировании мультимембранного композита иммунохроматографического теста раствором маркерного конъюгата пропитывают специальную пористую подложку и высушивают. Во время анализа жидкая проба протекает через поры данной подложки, растворяя конъюгат и смывая его на рабочую мембрану теста. Конъюгат наносится на подложку в объеме не более 7 мкл на тест-полоску шириной 3,5 мм (см. «Материалы и методы» раздел 2.6.). Нами экспериментально установлено, что за 10 мин через рабочую мембрану теста протекает около 20 мкл

жидкости. Поэтому усредненная концентрация конъюгата в жидкости, протекающей через рабочую мембрану, не превышает его исходную концентрацию. Конъюгат можно сконцентрировать перед использованием, однако концентрирование более чем на порядок затрудняет анализ из-за частичной агрегации и застревания конъюгата на рабочей мембране. При десятикратном концентрировании конъюгата конечные концентрации  $[P]_0$  будут равны  $3 \times 10^{-6}$  М и  $3 \times 10^{-7}$  М для белка G и IgG в конъюгате с КЗ диаметром 24 нм, и  $2,57 \times 10^{-6}$  М для белка А в конъюгате с КЗ диаметром 11,2 нм (в условиях насыщения). То есть даже с учетом предварительного концентрирования конъюгат способен связать лишь малую долю IgG в пробе (концентрация  $[A]_0 > 10^{-5}$  М с учетом разбавления в 4 раза). С высокой долей точности можно принять  $[A] \approx [A]_0$ . Тогда при четырехкратном разбавлении сыворотки значение  $K_{a1} \times [A]$  находится в диапазоне от  $10^2$  до  $3,3 \times 10^7$ . В состоянии равновесия  $K_{a1} \cdot [A]_e = [AP]_e / [P]_e$  (подстрочный индекс e обозначает равновесные концентрации). Отсюда можно сделать вывод, что  $[AP]_e$  больше  $[P]_e$  в  $10^2 - 3,3 \times 10^7$  раз. Реакция сильно смещена в сторону образования продукта. Её можно считать необратимой и описывать с помощью математического аппарата расчёта кинетики необратимой реакции.

Из выражения для скорости бимолекулярной необратимой реакции [188] получаем:

$$AP = \frac{A_0 P_0 (e^{tk_{a1}} - 1)}{A_0 + P_0 - e^{tk_{a1}} (A_0 + P_0 - 1)} \quad (11)$$

Для взаимодействий антиген–антитело, IgG–белок А, IgG–белок G характерны значения кинетической константы ассоциации  $10^4 - 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  [179; 189]. На рис. 34 представлены примеры зависимости  $[AP]$  от времени, рассчитанные по формуле (11), для трех значений кинетической константы ассоциации  $k_{a1}$ :  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  при  $[A]_0 = 10^{-5}$  М и  $[P]_0 = 10^{-7}$  М. Из представленных зависимостей видно, что  $[AP]$  достигает предельного значения, равного  $[P]_0$ , за время менее 1 мин даже при минимальном значении  $k_{a1}$ , характерном для иммунных взаимодействий, и минимальном значении  $[A]_0$ , характерном для сыворотки/крови с учетом разбавления в 4 раза. При более высоких значениях  $k_{a1}$  и  $[A]_0$  предельная концентрация комплекса достигается еще быстрее. Эти данные позволяют ввести в модель важное упрощение: к моменту достижения фронтом жидкости аналитической зоны теста (около 30 сек) концентрации реагентов практически достигают равновесных значений. При этом с высокой точностью выполняются соотношения:  $[AP]_e \approx [P]_0$ ,  $[P]_e \approx 0$ ,  $[A]_e \approx [A]_0$ . Отсюда следует, что через аналитическую зону протекают два компонента, имеющие постоянные концентрации  $[AP]_e$  и  $[A]_e$ . Также из этого следует, что

образованием комплекса APR по схеме  $P + AR = APR$  (4) можно пренебречь вследствие нехватки [P].

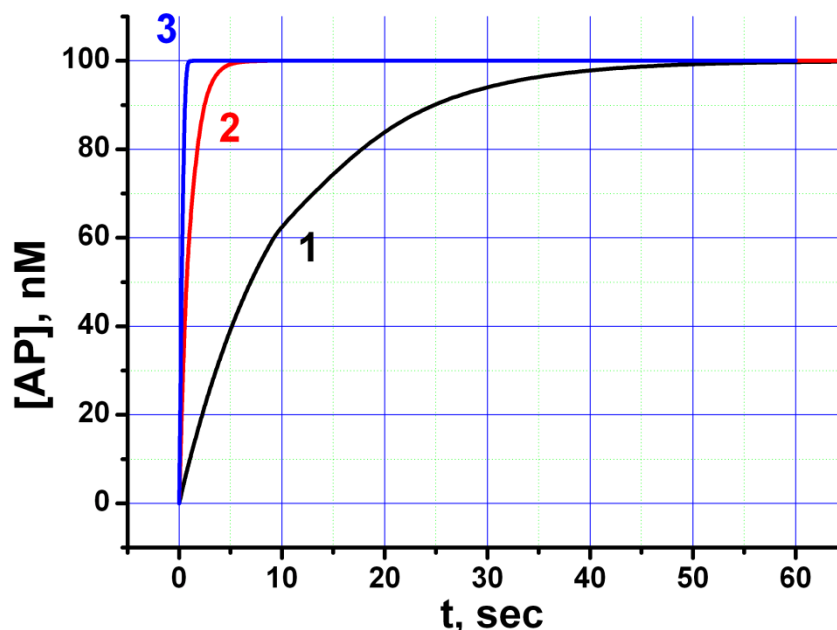


Рис. 34. Кинетические зависимости образования комплекса AP при  $[A]_0=10^{-5}$  M ( $\approx 1,5$  мг/мл IgG) и  $[P]_0=10^{-7}$  M. 1. –  $k_{a1} = 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 2. –  $k_{a1} = 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 3 –  $k_{a1} = 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### 3.6.4.2. Изменение концентрации свободного рецептора [R] (стадия 2)

Молекулы рецептора (антигена) вступают в реакцию со специфическими антителами по схемам (2)-(3). Соответственно, суммарная скорость изменения [R] выражается формулой:

$$-\frac{\partial[R]}{\partial t} = k_{a2}x A R - k_{d2} AR + k_{a3}x AP R - k_{d3}[APR] \quad (12)$$

где  $x[A]$  – концентрация специфических антител,  $x[AP]$  – концентрация специфических антител, связанных с маркерным конъюгатом.

Поскольку  $[P]_0$  на несколько порядков меньше, чем  $[A]_0$ ,  $[AP] < [P]_0$ , то и  $[AP]$  на несколько порядков меньше, чем  $[A]_0$ . Значит, выражением  $k_{a3}x \cdot [AP] \cdot [R]$  можно пренебречь по сравнению с  $k_{a2}x \cdot [AP] \cdot [R]$ , так как для резкого увеличения кинетической константы связывания меченых антител по сравнению с немечеными нет физических оснований.



Учитывая, что IgG-связывающие белки, иммобилизованные на коллоидном носителе, связывают  $F_c$  фрагменты антител, можно предположить, что аффинность антиген-связывающих  $F_{ab}$  фрагментов при образовании AP изменяется незначительно. Поэтому кинетические константы диссоциации комплекса рецептора с мечеными и немечеными антителами примерно одинаковы ( $k_{d2} \approx k_{d3}$ ). Тогда, с учетом соотношения  $[R]+[AR]+[APR]=[R]_0$ , формулу (9) можно преобразовать в:

$$-\frac{\partial R}{\partial t_1} = (k_{a2}x A_0 + k_{d2}) R - k_{d2}[R]_0 \quad (13)$$

Решением данного дифференциального уравнения (см. ниже) является функция:

$$R = \frac{[R]_0(k_{d2} + k_{a2}x A_0) e^{-(k_{a2}x A_0 + k_{d2})t_1}}{k_{a2}x A_0 + k_{d2}} \quad (14)$$

#### 3.6.4.3. Решение дифференциального уравнения (10):

Введем обозначение  $(k_{a2}x A_0 + k_{d2}) R - k_{d2}[R]_0 = y$ , тогда

$$\frac{\partial y}{\partial t_1} = (k_{a2}x A_0 + k_{d2}) \frac{\partial R}{\partial t_1} \quad (15)$$

Уравнение (15) преобразуется в:

$$-\frac{1}{k_{a2}x A_0 + k_{d2}} \frac{\partial y}{\partial t_1} = y \quad (16)$$

Разделяем переменные:

$$\frac{\partial y}{y} = -(k_{a2}x A_0 + k_{d2}) \partial t_1 \quad (17)$$

Интегрируем обе части уравнения:

$$\ln(y) = -(k_{a2}x A_0 + k_{d2})t_1 + Const, \quad (18)$$

$$y = Const * e^{-(k_{a2}x A_0 + k_{d2})t_1} \quad (19)$$

Из граничных условий (при  $t_1=0$ ,  $[R]=[R]_0$ ) находим  $Const$ :

$$Const = k_{a2}x A_0 R_0, \quad (20)$$

С учетом последнего уравнения имеем:

$$R = R_0 * \frac{k_{d2} + k_{a2}x A_0 e^{-(k_{a2}x A_0 + k_{d2})t_1}}{k_{a2}x A_0 + k_{d2}} \quad (21)$$

Зависимости  $[R]$  от  $t_1$  при различных значениях  $k_{a2}$ , рассчитанные на основании уравнения (21), представлены на рис. 35. Данные зависимости демонстрируют, что при увеличении  $k_{a2}$  скорость уменьшения  $[R]$  возрастает: при значениях  $k_{a2} = 10^6$  (1/М•с) реакция протекает на 95% за 5 мин, тогда как при  $k_{a2} = 10^4$  (1/М•с) концентрация  $R$  уменьшается менее чем на 7% за все время проведения ИХА – 10 мин.

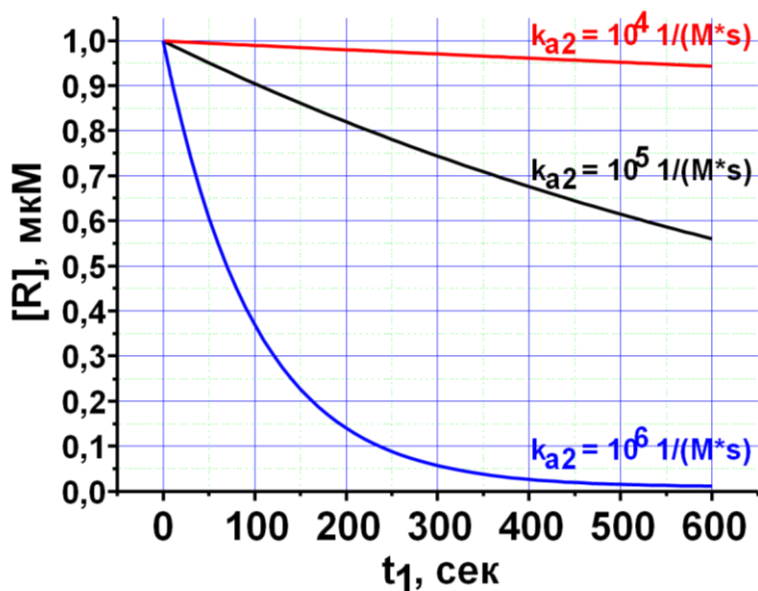


Рис. 35. Кинетические зависимости изменения  $[R]$  при различных значениях  $k_{a2}$ . Параметры модели:  $t-t_1=60$  sec,  $[A]_0=10^{-5}$  М,  $[P]_0=10^{-6}$  М,  $[R]_0=10^{-6}$  М,  $k_{d2}=k_{d3}=10^{-4}$  1/с.

#### 3.6.4.4. Образование окрашенного комплекса APR в аналитической зоне (стадия 2)

Выражение для скорости изменения концентрации APR (стадия 2, формула (10)) вследствие незначительного уровня величины  $[P]$  и с учетом  $[AP] \approx [P]_0$  (см. раздел 2.4.4.) может быть упрощено до:

$$V_{APR} = \frac{\partial APR}{\partial t_1} = k_{a3} \times P_0 R - (k_{d3} + k_{d4})[APR] \quad (22)$$

Подставляя в уравнение (22) выражение для  $[R]$  (21) и, решая полученное дифференциальное уравнение, получаем искомое выражение для  $[APR]$ .

### 3.6.4.5. Решение дифференциального уравнения (12):

Подставляем в уравнение (22) выражение для [R] (21):

$$\frac{\partial APR}{\partial t_1} = k_{a3} x P_0 R_0 \frac{k_{d2} + k_{a2} x A_0 e^{-(k_{a2} x A_0 + k_{d2}) t_1}}{k_{a2} x A_0 + k_{d2}} - (k_{d3} + k_{d4}) [APR] \quad (23)$$

Введем обозначение:  $\frac{k_{a3} k_{d2} x P_0 R_0}{k_{a2} x A_0 + k_{d2}} - (k_{d3} + k_{d4}) [APR] = z$ , тогда

$$\frac{\partial z}{\partial t_1} = - (k_{d3} + k_{d4}) \frac{\partial APR}{\partial t_1} \quad (24)$$

Уравнение (22) приобретает вид:

$$\frac{\partial z}{\partial t_1} + (k_{d3} + k_{d4})(z + k_{a2} k_{a3} x^2 A_0 P_0 R_0 e^{-(k_{a2} x A_0 + k_{d2}) t_1}) = 0 \quad (25)$$

Введем дополнительные обозначения:  $k_{d3} + k_{d4} = p$ ;  $k_{a2} x A_0 + k_{d2} = q$ ;  
 $k_{a2} k_{a3} x^2 A_0 P_0 R_0 = r$ .  $p, q, r$  – константы.

Перепишем уравнение с введенными обозначениями:

$$\frac{\partial z}{\partial t_1} + pz + pr e^{-qt_1} = 0 \quad (26)$$

Данное уравнение является линейным дифференциальным уравнением первого порядка. Решим его методом Бернулли.

Представим функцию  $z$  как произведение двух функций –  $u$  и  $v$ :  $z = uv$ ,  $\frac{\partial z}{\partial t_1} = \frac{\partial u}{\partial t_1} v + \frac{\partial v}{\partial t_1} u$

Подставим данные выражения в решаемое дифференциальное уравнение:

$$\frac{\partial u}{\partial t_1} v + \frac{\partial v}{\partial t_1} u + piv + pr e^{-qt_1} = 0 \quad (27)$$

Перейдем к системе уравнений:

$$\frac{\partial v}{\partial t_1} + pv = 0 \quad (28)$$

$$\frac{\partial u}{\partial t_1} v + pr e^{-qt_1} = 0; \quad (29)$$

Решаем уравнение (28):

Разделяем переменные:

$$\frac{\partial v}{v} = -p \partial t_1 \quad (30)$$

Интегрируем обе части

$$\ln(v) = -p t_1 \quad (31)$$

Отсюда

$$v = e^{-p t_1} \quad (32)$$

Подставляем полученное выражение для  $v$  в уравнение (29):

$$\frac{\partial u}{\partial t_1} = -p r e^{(p-q)t_1} \quad (33)$$

Разделяя переменные и интегрируя обе части полученного уравнения, получаем:

$$u = \frac{p r}{q-p} e^{(p-q)t_1} + Const \quad (34)$$

Из выражений для  $v$  (32) и  $u$  (34) находим  $z$ :

$$z = \frac{p r}{q-p} e^{-q t_1} + Const * e^{-p t_1} \quad (35)$$

Значение  $Const$  находим из граничных условий: при  $t_1=0$ ,  $[APR]=0$ ,  $z_0 = \frac{k_{a3} k_{d2} x_0 P_0 R_0}{q}$ ,

$$Const = \frac{k_{a3} k_{d2} x_0 P_0 R_0}{q} + \frac{p r}{p-q} \quad (36)$$

Подставляем значение  $Const$  в выражение для  $z$ , снова переходим от переменной  $z$  к  $[APR]$ , и, после арифметических упрощений, получаем выражение для  $[APR]$ :

$$APR = \frac{k_{a3} P_0 R_0 x_0}{q} \frac{k_{a2} x_0 A_0 (e^{-q t_1} - e^{-p t_1})}{p-q} - \frac{k_{d2} (e^{-p t_1} - 1)}{p} \quad (37)$$

где  $p = k_{d3} + k_{d4}$ ,  $q = k_{a2} * x_0 + k_{d2}$ .

Полученная зависимость (уравнение (37)) является главным результатом разработки модели, поскольку окрашивание в аналитической зоне пропорционально концентрации  $APR$ . Уравнение (37) 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 аналитические параметры тестов.

Далее рассмотрим последовательно влияние каждого из параметров на образование окрашенного комплекса в аналитической зоне.

#### *3.6.4.6. Влияние константы диссоциации на кинетику образования окрашенного комплекса*

Диссоциация иммунного комплекса является мономолекулярной реакцией, поэтому ее скорость зависит не от концентрации комплекса, а только от значения кинетической константы диссоциации. Другими словами, за одинаковые промежутки времени распадается одинаковая доля комплекса. В рамках этого допущения можно оценить максимальное количество комплекса, диссоциирующего за определенный промежуток времени. В реальной иммунохроматографической системе диссоциация комплекса будет необратимой после протекания через аналитическую зону всего маркерного конъюгата (стадия 3 анализа в нашей модели), так как, начиная с этого момента, продукты диссоциации будут вымываться из аналитической зоны потоком жидкости, а новые комплексы не могут образоваться из-за отсутствия конъюгата.

Зависимость доли распавшегося комплекса ( $D$ ) от времени определяется уравнением:

$$D = 1 - e^{-k_d t_1} \quad (38)$$

где  $k_d$  – суммарная константа диссоциации APR по схемам (3)–(4).

Длительность иммунохроматографического анализа чаще всего составляет 10 мин, поэтому рассмотрим кинетику реакций в этом диапазоне времени. Кинетические зависимости диссоциации комплекса, рассчитанные по уравнению (38), представлены на рис. 36.

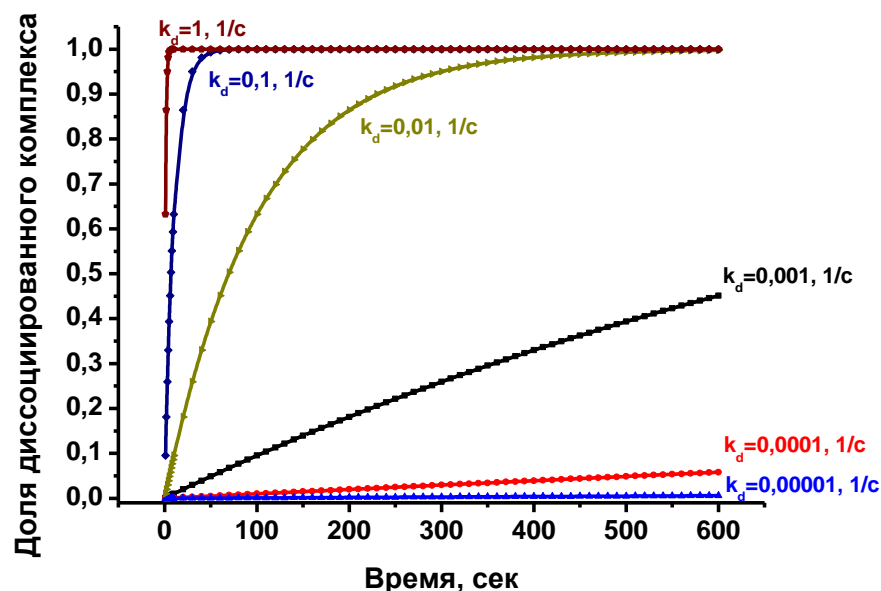


Рис. 36. Кинетики диссоциации иммунного комплекса при различных значениях кинетической константы диссоциации.

Кривые на рис. 36 наглядно демонстрируют, что при кинетической константе диссоциации от  $0,01 \text{ с}^{-1}$  и выше за время проведения анализа весь образовавшийся в аналитической зоне иммунный комплекс APR может распасться. Реальные кинетические константы диссоциации иммунных комплексов не столь велики. Так, по данным Landry и соавт. [179] они редко превышают  $10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Тем не менее, значения кинетических констант диссоциации комплексов выше  $10^{-4} \text{ с}^{-1}$  не являются недостижимыми. Характерные значения констант диссоциации комплексов IgG (например, мышинных) с белками А и G составляют соответственно  $2,77 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  и  $2,91 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  [189]. Количества комплекса, диссоциировавшие за 10 мин при  $k_d=10^{-4} \text{ с}^{-1}$  и  $k_d=10^{-5} \text{ с}^{-1}$ , отличаются друг от друга на 5%, поэтому дальнейшее уменьшение константы диссоциации незначительно влияет на [APR].

Вернемся к рассмотрению стадии 2 анализа, на которой процессы ассоциации и диссоциации комплексов происходят одновременно и, соответственно, зависимости изменения концентрации окрашенного комплекса в аналитической зоне от времени имеют более сложный вид. Результаты теоретического расчета концентрации [APR] по уравнению (37) при разных значениях  $k_{d4}$ , представленные на рис. 37, подтверждают, что в иммунохроматографической системе сложно детектировать антитела с кинетической константой диссоциации более  $10^{-2} \text{ с}^{-1}$  из-за практически полной диссоциации комплекса APR за 10 мин (рис. 37, кривая 4). При константе диссоциации  $10^{-3} \text{ с}^{-1}$  аналитическая зона

после 5 мин реакции частично обесцвечивается (рис. 37, кривая 3), а при значениях  $k_{d4}$  более  $10^4 \text{ c}^{-1}$  наблюдается монотонный рост сигнала (рис. 37, кривые 1, 2).

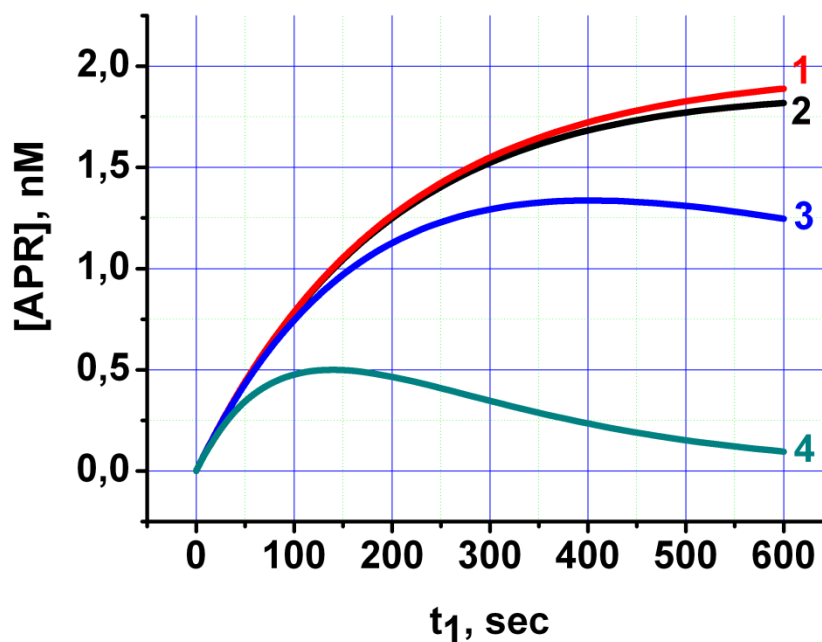


Рис. 37. Кинетика изменения концентрации APR при различных значениях кинетической константы диссоциации  $k_{d4}$ : **1.** –  $10^{-5} \text{ 1/s}$ ; **2.** –  $10^{-4} \text{ 1/s}$ ; **3.** –  $10^{-3} \text{ 1/s}$ ; **4.** –  $10^{-2} \text{ 1/s}$ . Параметры модели:  $[A]_0=5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[P]_0=10^{-6} \text{ M}$ ,  $[R]_0=10^{-6} \text{ M}$ ,  $k_{a2}=10^4 \text{ 1/(M}\cdot\text{s)}$ ,  $k_{a3}=10^4 \text{ 1/(M}\cdot\text{s)}$ ,  $k_{d2} = k_{d3}=10^{-5} \text{ 1/s}$ ,  $x=10^{-3}$ .

Если  $k_d < 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ , то за время проведения анализа диссоциацией можно пренебречь и считать реакцию образования комплекса необратимой. Тогда кинетика образования APR будет определяться значением кинетической константы ассоциации, и уравнение (37) упрощается до:

$$APR = \frac{k_{a3} P_0 R_0}{k_{a2} A_0} (1 - e^{-k_{a2} x A_0 t_1}) \quad (38)$$

Упрощенную зависимость (38) можно использовать для определения аналитических параметров ИХ-тестов при значениях кинетических констант диссоциации комплекса антиген-антитело менее  $10^{-4} \text{ c}^{-1}$ .

### 3.6.4.7. Влияние концентраций компонентов и констант ассоциации на кинетику образования окрашенного комплекса

Из уравнений (37) и (38) видно, что сигнал аналитической системы при избыточной концентрации антител пропорционален  $[P]_0$  и  $[R]_0$ . Следовательно, для достижения высокого сигнала следует использовать максимальные концентрации компонентов, связывающих антитела. Увеличение этих концентраций лимитировано сорбционной емкостью коллоидного маркера, возможностью концентрирования маркерного конъюгата без агрегации частиц, впитывающей способностью подложки под конъюгат (для  $[P]_0$ ) и сорбционной емкостью рабочей мембраны теста (для  $[R]_0$ ).

При увеличении доли специфических антител сигнал в аналитической системе также возрастает, но в этом случае рост имеет экспоненциальный характер (рис. 38). Однако данный параметр не является варьируемым, так как зависит только от свойств конкретной пробы.

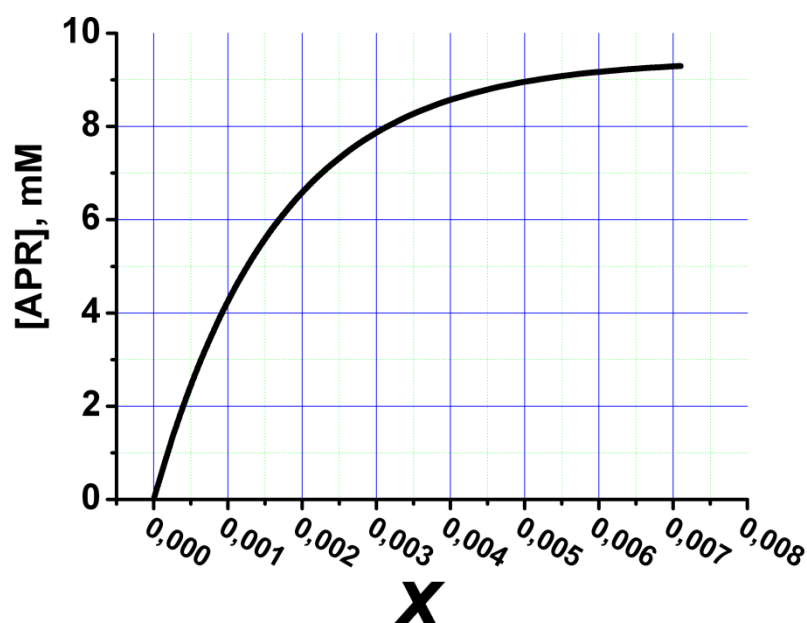


Рис. 38. Зависимость концентрации APR, образовавшегося в аналитической зоне за  $t_1=600$  секунд, от доли специфических антител ( $x$ ). Параметры модели:  $t-t_1=60$  sec,  $[A]_0=10^{-4}$  M,  $[P]_0=10^{-6}$  M,  $[R]_0=10^{-6}$  M,  $k_{a2}=10^4$  1/(M\*s),  $k_{d2}=k_{d3}=10^{-4}$  1/s.

Зависимость сигнала от концентрации  $[A]_0$ , рассчитанная по формуле (37), имеет менее очевидный характер:  $[APR]$  экспоненциально уменьшается при увеличении  $[A]_0$  или (рис. 39) в диапазоне величин  $[A]_0$ : от  $10^{-5}$  M и выше (при меньших значениях  $[A]_0$



нарушаются допущения, введенные при разработке модели (см. раздел 2.4.4.)). Причиной уменьшения  $[APR]$  при увеличении  $[A]_0$  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. После достижения фронтом жидкости аналитической зоны теста связанные и несвязанные с маркером молекулы специфических иммуноглобулинов конкурируют между собой за взаимодействие с иммобилизованным рецептором. При этом несвязанных антител значительно больше, чем связанных, поэтому ослабление влияния конкурента, к которому приводит уменьшение величины  $[A]_0$ , оказывает более значимый положительный эффект, чем отрицательный эффект от снижения скорости связывания AP в указанном диапазоне значений  $[A]_0$ .

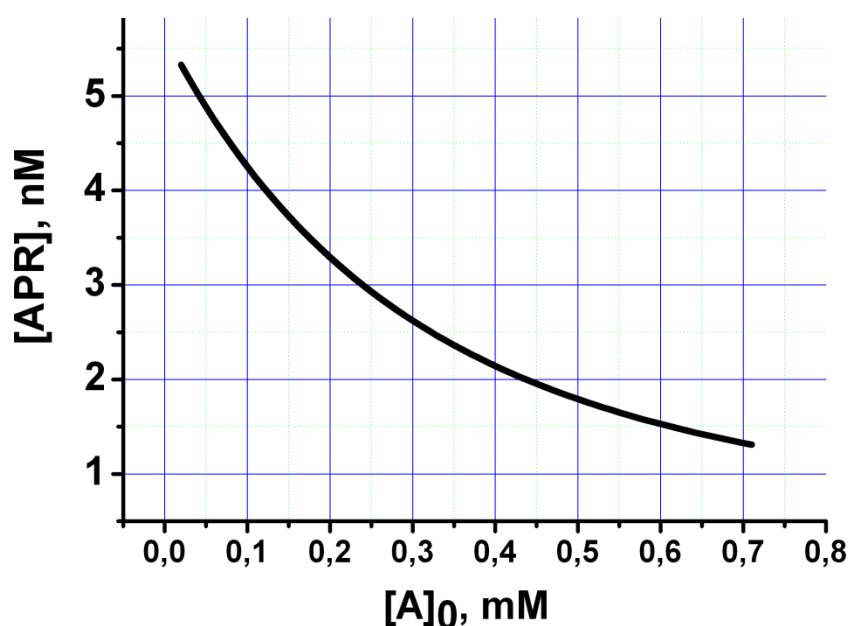


Рис. 39. Зависимости концентрации APR, образовавшегося в аналитической зоне за 600 секунд, от  $[A]_0$  при  $k_{a2}=10^4$  1/(M\*s),  $[P]_0=10^{-6}$  M,  $[R]_0=10^{-6}$  M,  $k_{d2}=k_{d3}=10^{-4}$  1/s,  $x=10^{-3}$ .

Практические рекомендации для разработчиков иммунохроматографических серодиагностических систем заключаются в том, что чувствительность анализа может быть повышена за счет разбавления сыворотки крови. К сожалению, предложенная модель не позволяет рассчитать оптимальную величину разведения, так как она разработана в предположении, что концентрация IgG в пробе составляет несколько миллиграммов на миллилитр. Однако, исходя из типичных концентраций IgG в

сыворотке, можно утверждать, что разбавление сыворотки на порядок (возможно и выше) должно благоприятно влиять на чувствительность анализа.

Для проверки данного утверждения был проведен модельный опыт по выявлению специфических антител против ЛПС *Brucella abortus* в сыворотке крови. В качестве пробы был использован национальный стандарт положительной сыворотки (пулированная сыворотка зараженных *B. abortus* коров с нормированным содержанием специфических антител 1000 МЕ). Результаты тестирования, представленные на рис. 40, подтверждают выдвинутую гипотезу. Максимальное окрашивание аналитической зоны было достигнуто при разбавлении сыворотки в 100 раз. Больше разбавление сыворотки приводит к отклонению от представленной зависимости и не описывается моделью.

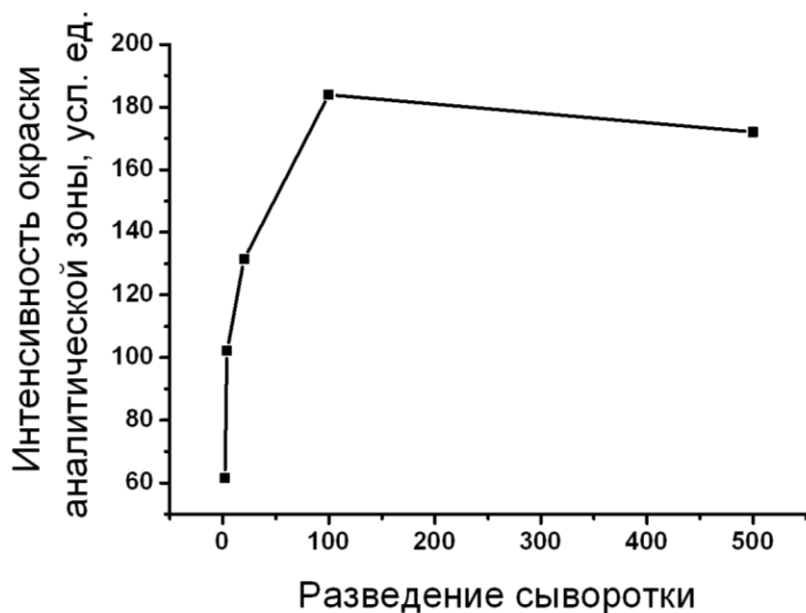


Рис. 40. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны иммунохроматографических тестов для серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота от разведения стандартной положительной сыворотки КРС: А. – внешний вид тест-полосок после проведения анализа (цифрами указана величина разведения пробы); Б. – количественная зависимость, полученная с помощью цифрового анализатора иммунохроматографических тестов «Рефлеком».

### 3.6.5. Моделирование ИХ-системы определения специфических антител с «обратной» схемой формирования окрашенного комплекса (схема Б)

В «обратной» схеме серодиагностического ИХА (схема Б) протекают те же реакции (1)-(4), что и в стандартной схеме ИХА (схема А). 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. В схеме Б анализа Р – активные молекулы антигена, иммобилизованные на коллоидном носителе, а R – активные молекулы иммуноглобулин-связывающего белка, иммобилизованные в аналитической зоне.

Поскольку в схеме Б с коллоидным конъюгатом взаимодействуют только специфические антитела, составляющие небольшую часть от всех иммуноглобулинов пробы, то, в отличие от схемы А, мы не можем принять допущения  $[A]_0 \gg [P]_0$ ,  $[AP]_e \approx [P]_0$ ,  $[P]_e \approx 0$ ,  $[A]_e \approx [A]_0$  и пренебречь формированием детектируемого окрашенного комплекса в аналитической зоне по реакции  $P+AR=APR$  (4). Образование APR в результате двух реакций –  $AP+R=APR$  (3) и  $P+AR=APR$  (4), – усложняет моделирование кинетики данного процесса. Поэтому мы будем рассматривать лишь упрощенный вариант (впрочем, отражающий реальные свойства иммунореагентов): диссоциация аффинных комплексов за время проведения ИХА (10 мин) пренебрежимо мала ( $k_d < 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Кроме того, считаем, что взаимодействие антигенсвязывающих центров определяемых антител (А) с антигеном не приводит к изменению константы связывания антител с иммуноглобулин-связывающим белком и наоборот, т.е.  $k_{a1} \approx k_{a4}$ ;  $k_{a2} \approx k_{a3}$ .

#### 3.6.5.1. Образование комплекса AP (стадия 1)

Образование комплекса иммуноглобулинов с коллоидным конъюгатом в схеме А описывается уравнением (11). Поскольку согласно схеме Б в данной реакции участвуют только специфические антитела (доля которых от общего содержания иммуноглобулинов равняется  $x$ ), то для «обратной» схемы анализа кинетику образования AP описывает уравнение (11), в котором  $[A]_0$  заменено на  $x \cdot [A]_0$ :

$$AP = \frac{x A_0 P_0 (e^{tk_{a1}} P_0 - A_0 x - 1)}{P_0 e^{tk_{a1}} P_0 - A_0 x - A_0 x} \quad (39)$$

Графики зависимости  $[AP]$  от  $t$  при разных значениях  $k_{a1}$  (рис. 41) демонстрируют, что образование комплекса AP может продолжаться на протяжении всего времени

проведения ИХА – 10 мин. Это означает, что, в отличие от ИХА по схеме А, концентрация AP не достигает равновесного значения ко времени достижения фронтом жидкости аналитической зоны.

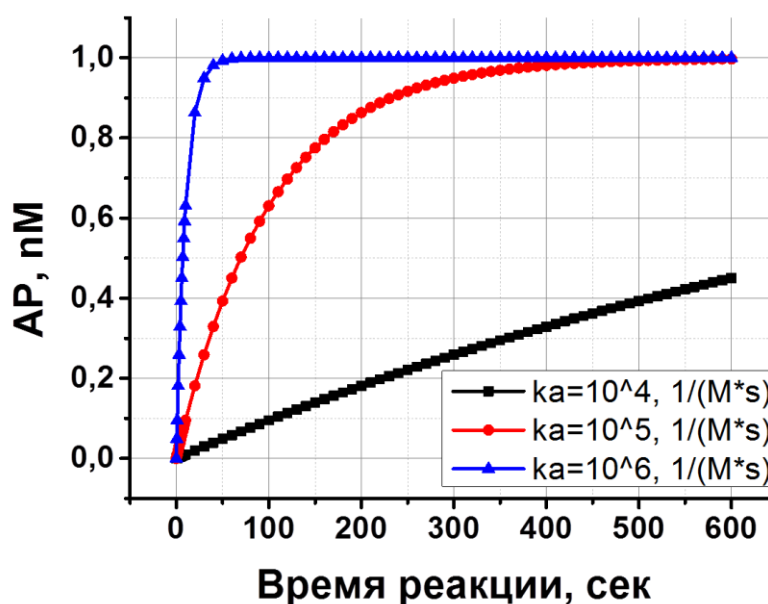


Рис. 41. Кинетические зависимости изменения  $[AP]$  при различных значениях  $k_{a1}$ ,  $[A]_0=10^{-5}$  M,  $[P]_0=10^{-7}$  M,  $x = 0,0001$ .

### 3.6.5.2. Изменение концентрации свободного рецептора $[R]$ (стадия 2)

С рецептором R в схеме Б взаимодействуют все иммуноглобулины в пробе. Поэтому изменение  $[R]$  описывается уравнением (21), в котором  $x \cdot [A]_0$  заменено на  $[A]_0$  (величиной  $k_{d2}$  пренебрегаем). В результате соответствующего преобразования уравнения (21) получаем:

$$R = [R]_0 e^{-k_{a3} A_0 t_1} \quad (40)$$

Подчеркнем, что данное уравнение справедливо только для случая  $k_{a2} \approx k_{a3}$ . Альтернативные случаи, когда рецептор предпочителнее связывает немеченые или, наоборот, меченые иммуноглобулины, требуют значительно более сложных описаний.

### 3.6.5.3. Изменение концентрации рецептора, связанного с антителами, $[AR]$ (стадия 2)

Взаимодействие R с иммуноглобулинами, связанными и не связанными с P, приводит к образованию комплексов AR и APR. Соответственно, имеем:

$$[AR] = [R]_0 - [R] - [APR] \quad (41)$$

Большая часть комплекса AR содержит неспецифичные к используемому антигену антитела и не способна к образованию тройного комплекса APR. Специфичные антитела входят в состав небольшой части комплексов AR<sub>сп</sub> и взаимодействуют с P по реакции (4). Чтобы рассчитать скорость реакции (4), необходимо установить, как [AR]<sub>сп</sub> изменяется со временем. Проанализируем свойства нашей системы. Если из нее исключить компонент P, то через аналитическую зону будут протекать только свободные иммуноглобулины (A). В этом случае [AR] = [R]<sub>0</sub> - [R] и, соответственно, [AR]<sub>сп</sub> = ([R]<sub>0</sub> - [R])·x. Если в систему добавить компонент P, то в аналитической зоне, помимо комплекса AR, со специфическими антителами будет образовываться комплекс APR. Значит:

$$[AR]_{\text{сп}} = ([R]_0 - [R]) \cdot x - [APR] \quad (42)$$

Комплекс APR может образовываться по реакциям (3) и (4). Соответственно мы можем выделить концентрации APR, образующиеся этими способами, - [APR]<sub>3</sub> и [APR]<sub>4</sub> ([APR] = [APR]<sub>3</sub> + [APR]<sub>4</sub>). Скорости изменения этих концентраций определяются уравнениями:

$$\frac{\partial APR_3}{\partial t_1} = k_{a3} A P R \quad (43)$$

$$\frac{\partial APR_4}{\partial t_1} = k_{a4} AR_{\text{сп}} P \quad (44)$$

Скорость изменения концентрации [AR]<sub>сп</sub>:

$$\frac{\partial AR_{\text{сп}}}{\partial t_1} = k_{a3} A_{\text{сп}} R - \frac{\partial APR_4}{\partial t_1} \quad (45)$$

Подставляя в уравнение (45) выражение (44) и выражения [A]<sub>сп</sub> = x·[A]<sub>0</sub> - [AP], [P] = [P]<sub>0</sub> - [AP], получаем:

$$\frac{\partial AR_{\text{сп}}}{\partial t_1} = k_{a3}(x A_0 - AP) R - k_{a4} AR_{\text{сп}}(P_0 - AP) \quad (46)$$

Поскольку зависимость [AP] от времени известна (см. уравнение (39)), то уравнение (46) содержит только одну неизвестную функцию - [AR]<sub>сп</sub> - и является линейным дифференциальным уравнением первого порядка.

### 3.6.5.4. Решение дифференциального уравнения (46)

Подставим в уравнение (46) выражение для [AP] (39) и введем обозначения:  $[AR]_{\text{сп}}=y$  и  $[P]_{0-x}*[A]_0=m$ . Тогда после арифметических упрощений уравнение (46) преобразуется в:

$$\frac{\partial y}{\partial t_1} + \frac{k_{a4} P_0 m e^{tk_{a1}m}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} y - \frac{k_{a3} x A_0 R_0 m e^{-t_1 k_{a3} A_0}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} = 0 \quad (47)$$

Решим данное уравнение методом Бернулли:

Представим функцию  $y$  как произведение двух функций –  $u$  и  $v$ :  $y = uv$ ,  $\frac{\partial y}{\partial t_1} = \frac{\partial u}{\partial t_1} v + \frac{\partial v}{\partial t_1} u$

Подставим в решаемое дифференциальное уравнение:

$$\frac{\partial u}{\partial t_1} v + \frac{\partial v}{\partial t_1} u + \frac{k_{a4} P_0 m e^{tk_{a1}m}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} uv - \frac{k_{a3} x A_0 R_0 m e^{-t_1 k_{a3} A_0}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} = 0 \quad (48)$$

Перейдем к системе уравнений:

$$\frac{\partial v}{\partial t_1} + \frac{k_{a4} P_0 m e^{tk_{a1}m}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} v = 0 \quad (49)$$

$$\frac{\partial u}{\partial t_1} v - \frac{k_{a3} x A_0 R_0 m e^{-t_1 k_{a3} A_0}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} = 0 \quad (50)$$

Решаем уравнение (49).

Разделяем переменные:

$$\frac{\partial v}{v} = - \frac{k_{a4} P_0 m e^{tk_{a1}m}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} \partial t_1 \quad (51)$$

Интегрируем обе части уравнения (51):

$$\ln(v) = -k_{a4} P_0 m \frac{e^{tk_{a1}m}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} \partial t_1 \quad (52)$$

Отметим, что  $\partial t_1 = \partial t$ , т.к.  $t$  и  $t_1$  отличаются на константу.

Введем обозначение:  $P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x = z$ , тогда  $\frac{\partial z}{\partial t} = k_{a1} m e^{tk_{a1}m}$ .

Перепишем уравнение (52) в данных обозначениях:

$$\ln(v) = - \frac{k_{a4}}{k_{a1}} \frac{\partial z}{z} \quad (53)$$

Воспользуемся введенным выше условием  $ka_1 \approx ka_4$ . Берем интеграл в правой части уравнения (53):

$$\ln(v) = -\ln(z) \quad (54)$$

Отсюда  $v = 1/z$ .

Теперь решаем уравнение (50). Перепишем его с введенными обозначениями:

$$\frac{\partial u}{\partial t_1} = \frac{k_{a3} x A_0 R_0 m e^{-t_1 k_{a3} A_0}}{z v} \quad (55)$$

Поскольку  $v = 1/z$ , то:

$$\frac{\partial u}{\partial t_1} = k_{a3} x A_0 R_0 m e^{-t_1 k_{a3} A_0} \quad (56)$$

Проинтегрируем обе части уравнения (56):

$$u = k_{a3} x A_0 R_0 m e^{-t_1 k_{a3} A_0} \partial t_1 \quad (57)$$

$$u = -x R_0 m e^{-t_1 k_{a3} A_0} + Const \quad (58)$$

Вернемся к исходным обозначениям:

$$[AR]_{сп} = \frac{Const - x R_0 m e^{-t_1 k_{a3} A_0}}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} \quad (59)$$

Const находим из граничных условий: при  $t_1=0$ ,  $[AR]_{сп} = 0$ .

$$Const = x R_0 (P_0 - A_0 x) \quad (60)$$

Отсюда:

$$[AR]_{сп} = \frac{x R_0 (P_0 - A_0 x)(1 - e^{-t_1 k_{a3} A_0})}{P_0 e^{tk_{a1}m} - A_0 x} \quad (61)$$

### 3.6.5.5. Образование окрашенного комплекса APR в аналитической зоне (стадия 2)

Функцию зависимости  $[APR]$  от времени находим из уравнения (41):

$$[APR] = \frac{x R_0 P_0 (1 - e^{-t_1 k_{a3} A_0})(e^{tk_{a1}(P_0 - A_0 x)} - 1)}{P_0 e^{tk_{a1}(P_0 - A_0 x)} - A_0 x} \quad (62)$$

Воспользовавшись выражением (39), уравнение (62) можно упростить до:

$$APR = \frac{x R_0 AP}{A_0} 1 - e^{-t_1 k_{a3} A_0} , \quad (63)$$

что и является искомым решением.

График данной зависимости представлен на рис. 42.

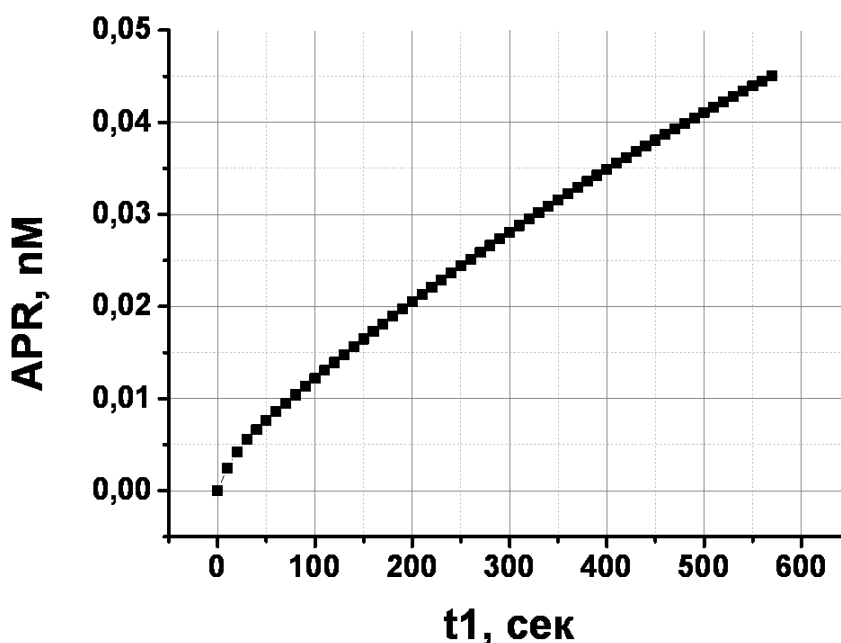


Рис. 42. Кинетика образования APR в «обратной» схеме иммунохроматографической серодиагностики. Параметры модели:  $[A]_0=10^{-5}$  М,  $[P]_0=10^{-7}$  М,  $[R]_0=10^{-6}$  М,  $k_{a1-4}=10^4$  1/(М·с),  $x=10^{-4}$ .

### 3.6.6. Сравнение двух схем иммунохроматографической серодиагностики

Сравнение двух схем будем проводить на основании уравнений (38) и (63), описывающих изменение во времени концентрации детектируемого комплекса [APR] (без учета диссоциации). Построим графики изменения [APR] при одинаковых параметрах. Из рис. 43 А видно, что на начальном этапе скорость образования APR в схеме Б выше, чем в схеме А. Однако затем скорость образования APR в схеме Б снижается, а в схеме А остается практически неизменной в течение всего времени реакции в аналитической зоне ( $t_1$ ). При данных параметрах модели конечные значения [APR] сопоставимы. Однако схема Б позволяет увеличить концентрацию иммуноглобулин-связывающего белка до концентраций, сопоставимых с концентрацией иммуноглобулинов в крови, поскольку иммуноглобулин-связывающий белок иммобилизуется на нитроцеллюлозной мембране, имеющей предельную сорбционную ёмкость до 15 мг/мл белка. В традиционной схеме



анализа повысить концентрацию иммуноглобулин-связывающего белка затруднительно, так как данный белок иммобилизуется на КЗ, сорбционная ёмкость которого на несколько порядков ниже.

Кинетика образования APR при десятикратном повышении концентрации  $[R]_0 = 10^{-5}$  М в сравнении с кинетикой образования APR в схеме А при  $[R]_0 = 10^{-6}$  М представлена на рис. 43 Б и демонстрирует возможности повышения сигнала тест-системы данным способом.

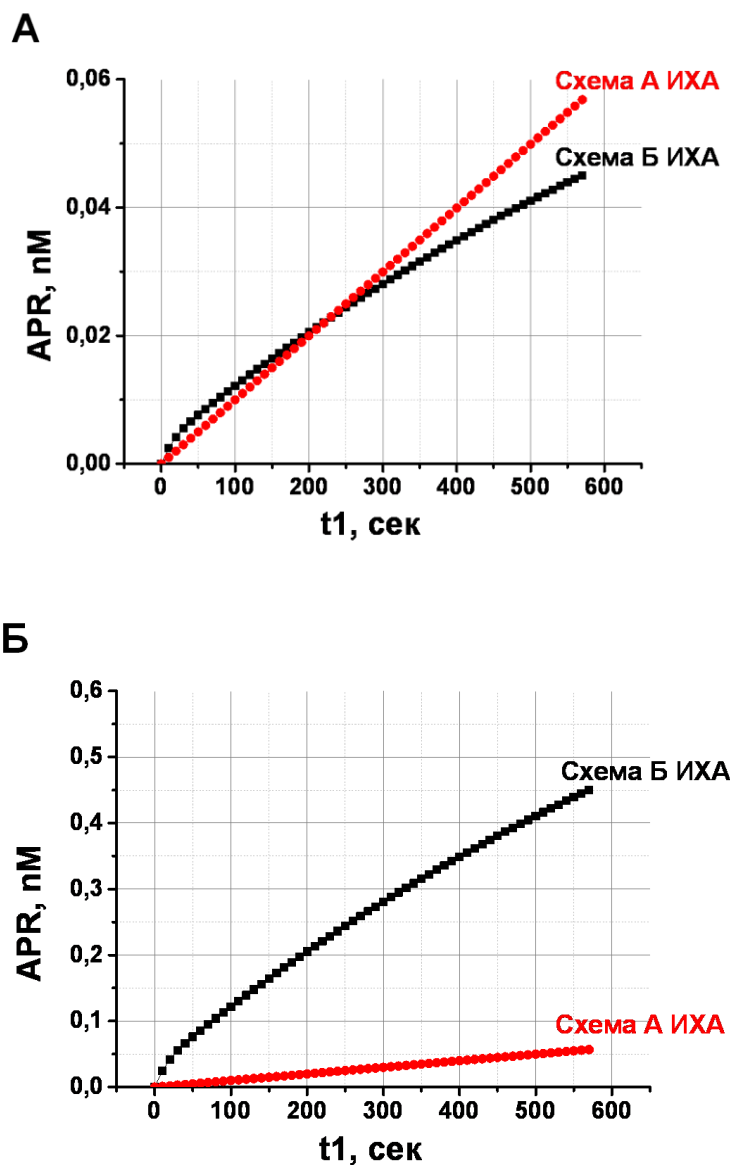


Рис. 43. Кинетика образования APR в ИХА по схемам А и Б. Параметры модели:  $[A]_0 = 10^{-5}$  М,  $[P]_0 = 10^{-7}$  М,  $k_{a1-4} = 10^4$  1/(М·с),  $x = 10^{-4}$ ; **А.**  $[R]_0 = 10^{-6}$  М; **Б.**  $[R]_0 = 10^{-6}$  М – в схеме А ИХА,  $[R]_0 = 10^{-5}$  М – в схеме Б ИХА.

### 3.7. Разработка иммунохроматографических тест-систем для определения специфических антител

#### 3.7.1. Тест-системы для серодиагностики бруцеллеза КРС

##### 3.7.1.1 Определение оптимального состава конъюгата КЗ-белок G.

Для определения концентрации белка G, необходимой для получения стабильных, неагрегирующих конъюгатов с коллоидным золотом, процесс адсорбции контролировали по величине  $D_{580}$  при добавлении 10%-ного NaCl [83]. Полученная зависимость  $D_{580}$  от концентрации белка G приведена на рис. 44. Ее вид соответствует существующим представлениям о конъюгировании белков с коллоидным золотом:  $D_{580}$  сначала возрастает, доходит до максимума и начинает снижаться, выходя на плато.

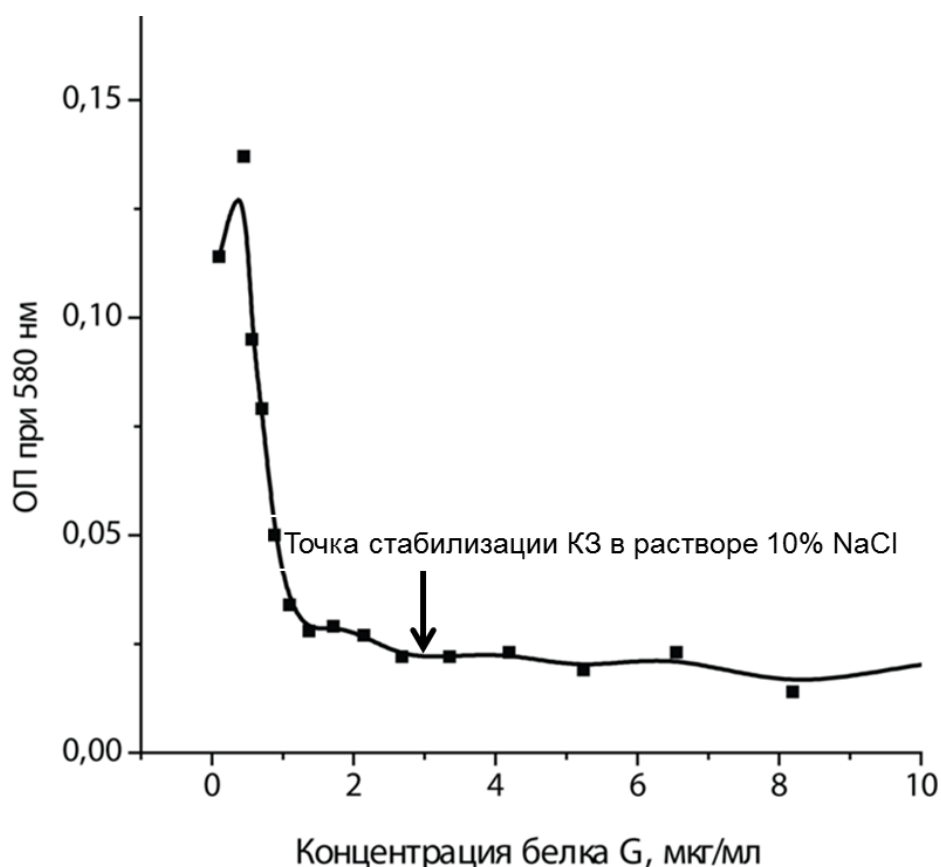


Рис. 44. Флоккуляционная кривая взаимодействия белка G с коллоидным золотом. По оси абсцисс – концентрация белка G, по оси ординат –  $D_{580}$  реакционной смеси после добавления 10%-ного NaCl.

Общепринято представление о том, что лучше всего использовать конъюгаты с содержанием белка, на 10-20% превышающим минимальную концентрацию, достаточную

для предотвращения агглютинации коллоидных частиц в растворах, содержащих 10% NaCl [167]. Предполагается, что при этом достигается монослойное заполнение поверхности коллоидной частицы и дальнейшее увеличение концентрации белка нецелесообразно. Однако нет никаких данных, подтверждающих, что стабилизация наночастиц в растворах с высокой ионной силой означает невозможность дальнейшей сорбции белковых молекул наночастицами. Поэтому нами было проведено сравнение эффективности использования конъюгатов разного состава коллоидного золота с белком G в иммунохроматографическом определении специфических антител против *B. abortus*. В качестве пробы при этом использовалась положительная стандартная коровья сыворотка – национальный стандарт, содержащий 1000 МЕ специфических антител против ЛПС *B. abortus*. Интенсивности окраски аналитической зоны теста в зависимости от содержания белка в конъюгате представлены на рис. 45.

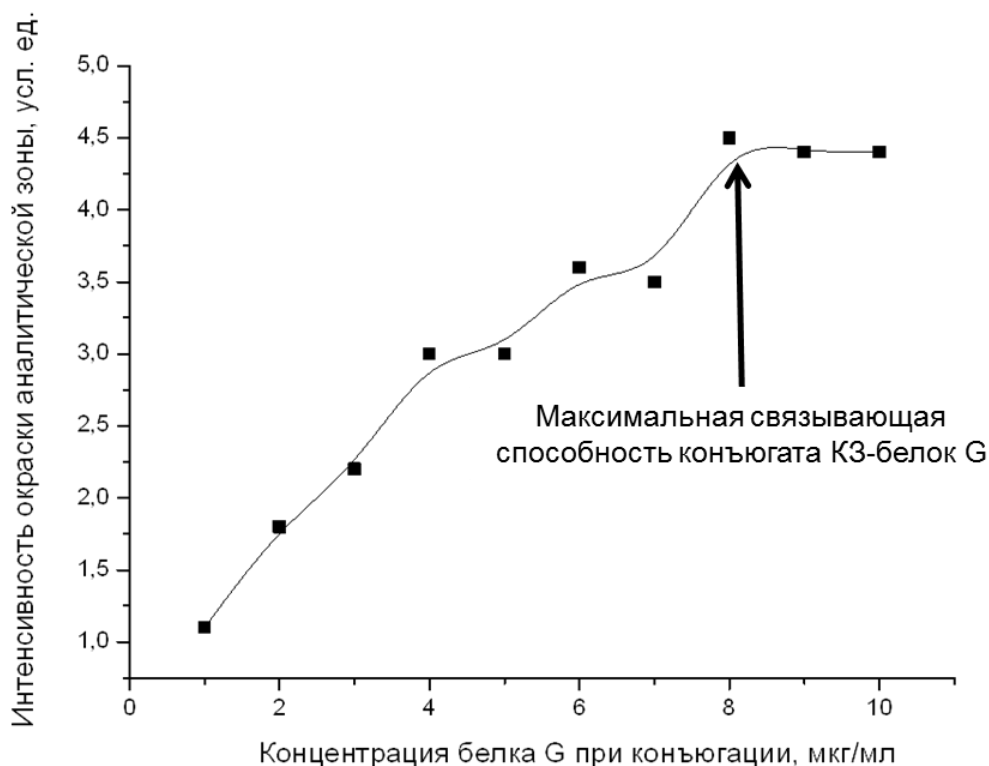


Рис. 45. ИХА стандартной положительной бруцеллезной сыворотки с использованием конъюгата КЗ с белком G.

Сравнение флоккуляционной зависимости с иммунохроматографией позволяет заключить, что активность конъюгата коллоидного золота с белком не находится в прямой зависимости со стабилизацией поверхности коллоидного золота сорбированными молекулами. Так, точка выхода на плато флоккуляционной зависимости для белка G соответствует приблизительно 3 мкг/мл, тогда как максимальная интенсивность сигнала достигается при 8 мкг/мл. Концентрация золота в обоих случаях составляет 0,53 нМ. Таким образом, аффинность конъюгата увеличивается при концентрациях, которые значительно превышают порог, определяемый стабилизацией частиц КЗ.

Для определения аффинности связывания белка G с поверхностью коллоидного золота полученная зависимость между значениями количеств свободного и связанного белка была построена в координатах Скетчарда – в виде зависимости отношения количества связанного белка, приходящегося на частицу КЗ, к концентрации свободного белка от количества связанного белка, приходящегося на частицу КЗ. На рис. 46 отмечены значения количества белка, соответствующие выходу на плато флоккуляционной зависимости и нагрузке, обеспечивающей максимальную связывающую способность конъюгата. Отметим, что при определении состава конъюгатов коллоидное золото предварительно концентрировали в 5 раз, поэтому для данных препаратов КЗ соответствующие значения концентрации белка, достаточной для стабилизации КЗ в растворе с высокой ионной силой и обеспечивающей максимальную связывающую способность конъюгата, составляют 15 и 40 мкг/мл.

Стабилизация КЗ в растворе 10% NaCl наступает тогда, когда поверхность золота покрыта белком G, но молекулы белка G расположены свободно и константа диссоциации имеет низкие значения (начальный участок кривой на рис. 46). Этого количества белка G достаточно для предотвращения контакта золотых частиц друг с другом, необходимого для начала агглютинации, однако поверхность частиц заполнена не полностью. При более высоких концентрациях белка G его сорбция продолжается, но с меньшей прочностью связывания. После связывания с частицей около 300 молекул белка G константа диссоциации комплекса значительно повышается и дальнейшее увеличение количества сорбированного белка не приводит к росту связывающей способности конъюгата.

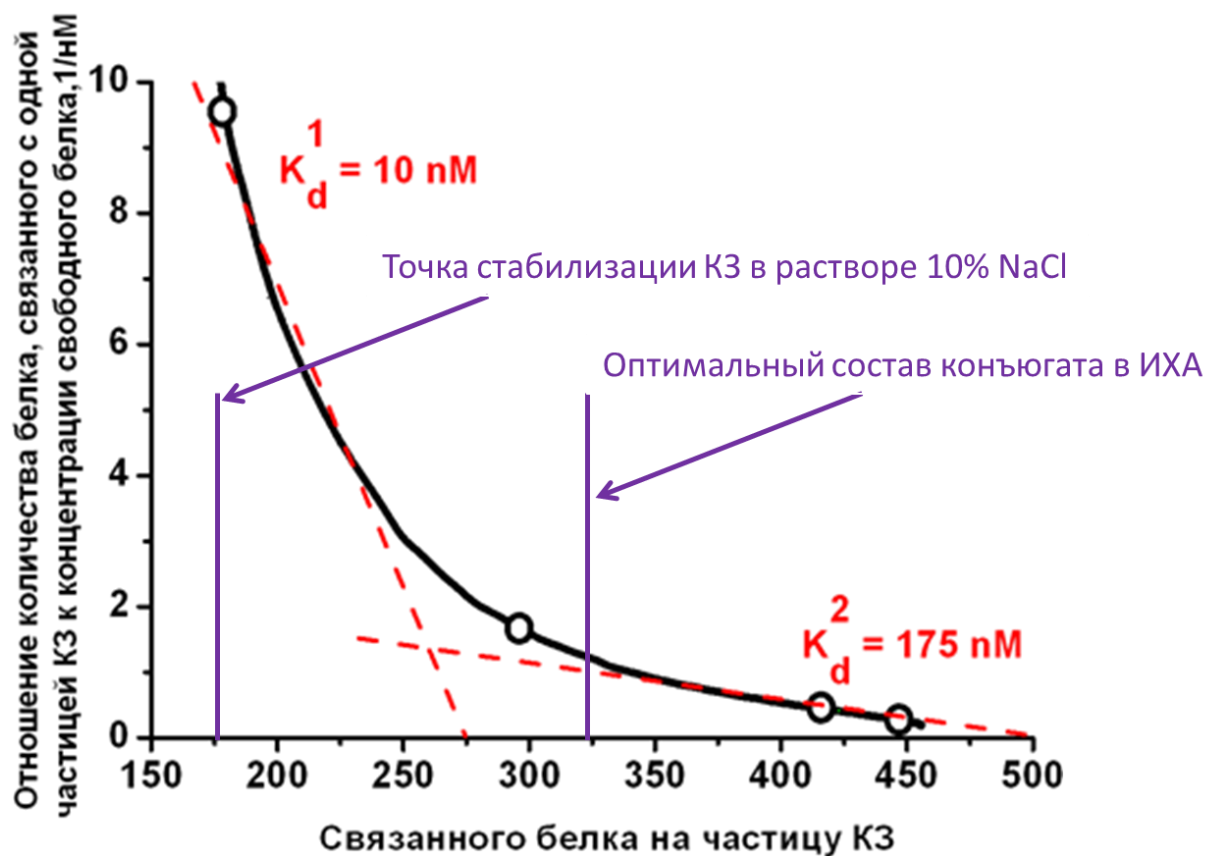


Рис. 46. Определение равновесных констант диссоциации комплекса белка с поверхностью КЗ в координатах Скетчарда. Красными линиями обозначены линейризованные участки зависимости. Фиолетовыми линиями – нагрузка белка, достаточная для стабилизации КЗ в растворе с высокой ионной силой и нагрузка белка, обеспечивающая максимальную связывающую способность конъюгата.

### 3.7.1.2. Тестирование сывороток крови КРС методом твердофазного ИФА

На первой стадии предоставленная Национальным центром биотехнологии Республики Казахстан панель сывороток КРС, с поставленным диагнозом «бруцеллез» (63 сыворотки), была охарактеризована методом ИФА для определения титров антител в сыворотках и подтверждения поставленного диагноза. Также была предоставлена панель из 21 сыворотки КРС без положительных реакций на бруцеллез.

Стандартные препараты - сильноположительная сыворотка, слабоположительная сыворотка, «Cut-off» сыворотка и отрицательная сыворотка - были использованы для оценки результатов ИФА, который применялся как референс-метод по отношению к разрабатываемому иммунохроматографическому методу. В качестве унифицированной характеристики количества специфических антител в сыворотке использовали величину ее разведения, которая на асимптотической кривой титрования в ИФА соответствует

оптической плотности 0,7. Для сыворотки «Cut-off» данная величина составляет 1:250. Соответственно, сыворотки, дающие разведение более 1:250, классифицировались как положительные.

Затем были протестированы сыворотки от 84 коровы. По данным ИФА 63 из них были классифицированы как положительные и 21 как отрицательные, что полностью совпало с данными, предоставленными Национальным центром биотехнологии Республики Казахстан. Пример иммуноферментного тестирования сывороток на ограниченной выборке приведен на рис. 47.

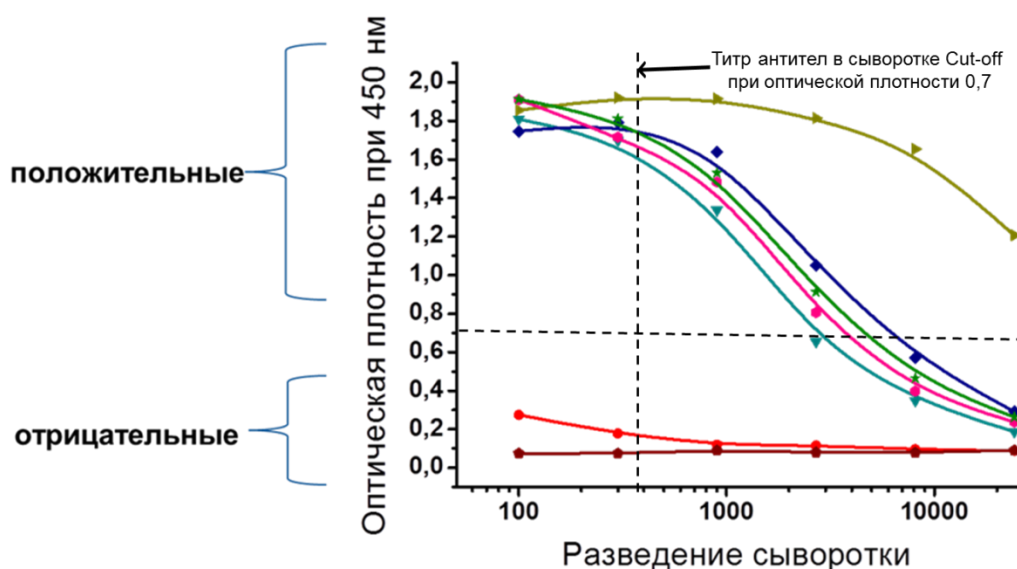


Рис. 47. Оценка титров антител к ЛПС в сыворотках крови КРС методом ИФА на ограниченной выборке.

3.7.1.3. Разработка и характеристика иммунохроматографической тест-системы определения специфических IgG против ЛПС *Brucella abortus* в стандартной схеме анализа (Схема А).

Для реализации ИХА по стандартной схеме использовали конъюгат белка G с КЗ (диаметр частиц 24 нм) с оптимизированным составом (см. раздел 3.7.1.1.). В аналитической зоне тест-системы иммобилизовали ЛПС *B. abortus*. Для проверки качества реагентов и сохранения функциональности тест-системы использовали контрольную зону, в которой иммобилизовали антитела кролика против иммуноглобулинов быка (RABIss).

Изготовленные экспериментальные образцы тест-систем были протестированы на стандартных препаратах сывороток – сильноположительной (национальный стандарт), слабоположительной, пороговой («Cut-off») и отрицательной сыворотках. Полученные

результаты (рис. 48, табл. 8) 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» соответствовало пределу визуальной детекции.

Затем были протестированы 63 положительные и 21 отрицательных по данным ИФА сывороток коров. 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. 49 представлена зависимость между характеристиками содержания в сыворотках специфических антител против ЛПС *B. abortus*, получаемыми методами ИФА и ИХА. Для ИФА использовали величину разведения сыворотки, при которой достигается диагностически значимое значение оптической плотности, равное 0,7, для ИХА – интенсивность окрашивания в аналитической зоне, измеренную с помощью анализатора «Рефлеком». Для сывороток, характеризующихся разведением в ИФА не более 1:10.000, зависимость хорошо интерполируется линейным уравнением  $y = 0,0023 \cdot x - 0,4254$ , коэффициент корреляции составляет 0,88. Для сывороток с более высоким содержанием специфических антител наблюдается медленный рост результатов ИХА в диапазоне 25-30 отн. ед., отражающий насыщение аналитической зоны тест-полоски.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой достоверности диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота с помощью разработанной иммунохроматографической тест-системы определения антител против ЛПС *B. abortus*.

Табл. 8. Интенсивность окрашивания аналитической зоны тест-систем для определения специфических антител против ЛПС *Brucella abortus* после тестирования стандартных препаратов сывороток (данные измерений с помощью анализатора «Рефлеком»)

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

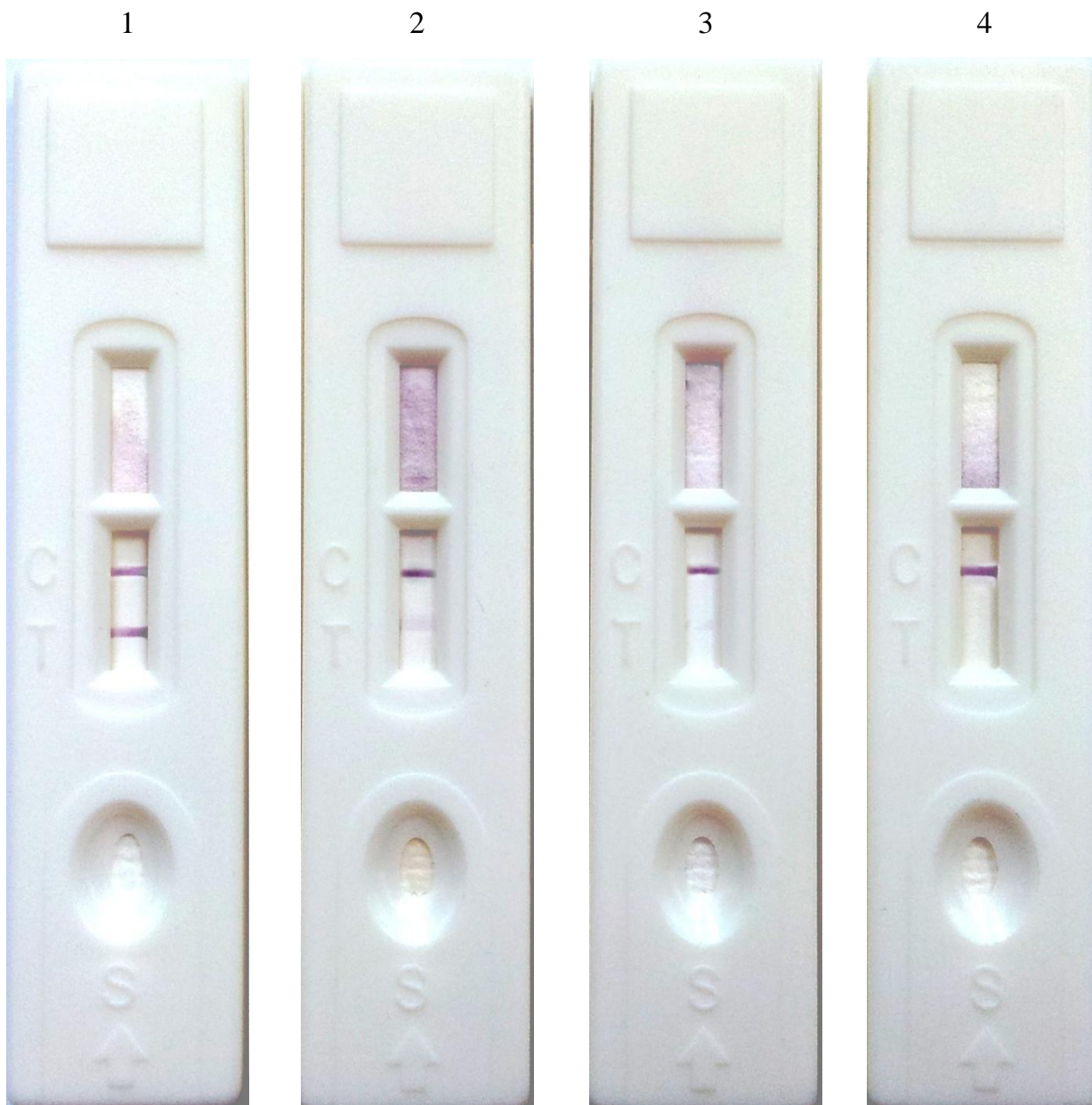


Рис. 48. Тестирование стандартных препаратов сывороток с использованием разработанной иммунохроматографической тест-системы: 1 – сильноположительная сыворотка, 2 – слабоположительная сыворотка, 3 - сыворотка «Cut-off», 4 – отрицательная сыворотка.



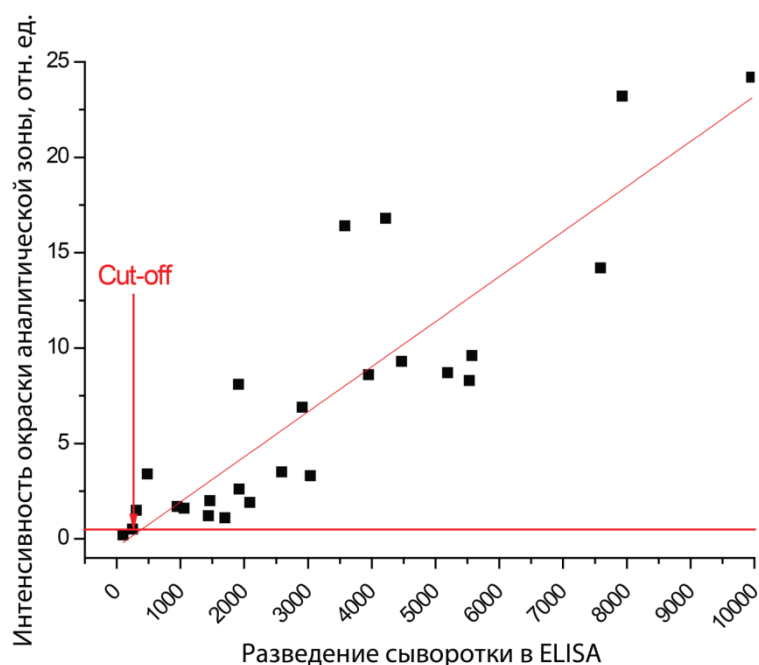


Рис. 49. Корреляция результатов определения уровня специфических IgG к ЛПС *B. abortus* методами ИФА и ИХА. По оси абсцисс – разведение сыворотки, дающее в ИФА оптическую плотность 0,7, по оси ординат – интенсивность окрашивания в аналитической зоне при тестировании этой сыворотки методом ИХА.

При проведении иммунохроматографической серодиагностики возникла проблема исчезновения контрольной зоны при тестировании сывороток. Поскольку концентрация иммуноглобулинов в сыворотке на несколько порядков превышает концентрацию сайтов связывания иммуноглобулинов на коллоидном конъюгате, то после их взаимодействия на конъюгате не остается свободных валентностей для связывания в контрольной зоне. Из-за исчезновения окраски контрольной зоны можно сделать неправильный вывод о непригодности теста. Данная проблема была решена добавлением к конъюгату антивидовых антител против антител, иммобилизованных в контрольной зоне. Антивидовые антитела добавляются в концентрациях на порядок ниже связывающей способности конъюгата, поэтому данная добавка не приводит к существенному уменьшению чувствительности тест-системы, а контрольная зона образуется только при сохранении функциональной активности конъюгата, что повышает достоверность анализа.

*3.7.1.4. Разработка и характеристика иммунохроматографической тест-системы определения специфических IgG против ЛПС Brucella abortus в «обратной» схеме анализа (Схема Б)*

После проведения тестирования сывороток крови КРС в стандартной схеме ИХА сыворотки были протестированы 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 теста сорбировали белок А из концентрации 10 мг/мл.

После изготовления тест-систем, построенных по схеме Б, провели тестирование той же панели сывороток крови КРС, что и при тестировании схемы А. Показано полное качественное совпадение результатов тестирования в схемах А и Б. В схеме Б, однако наблюдалось небольшое фоновое окрашивание, связанное с неспецифическим взаимодействием конъюгата КЗ-ЛПС с сорбированным белком А, что затрудняло визуальную оценку результатов. Однако при приборной регистрации с помощью анализатора «Рефлеком» и отсечении фонового уровня связывания наблюдалась хорошая корреляция результатов.

*3.7.1.5. Разработка и характеристика иммунохроматографической тест-системы определения специфических IgG против ЛПС Brucella abortus в схеме анализа с использованием свойства поливалентности антител (Схема В)*

Для устранения влияния неспецифических иммуноглобулинов также использовали иммунохроматографический анализ специфических антител, в котором исключено связывание с окрашенной меткой иммуноглобулинов, не способных взаимодействовать с антигеном – схема В иммунохроматографической серодиагностики.

По результатам тестирования 63 сывороток зараженных бруцеллезом коров в схеме В иммунохроматографической серодиагностики 44 (70%) дали положительный результат тестирования. Среди 21 сыворотки здоровых коров положительных результатов тестирования не наблюдалось. Таким образом, специфичность ИХА осталась 100%-ной, однако чувствительность снизилась на 30%. Таким образом, для иммунохроматографической серодиагностики бруцеллеза КРС наиболее эффективной оказалась традиционная схема анализа.

### 3.7.2. Тест-системы для серодиагностики легочного туберкулеза людей

#### 3.7.2.1. Тестирование сывороток крови пациентов методом твердофазного ИФА

Панель из 22 сывороток крови больных с подтвержденным диагнозом «туберкулез органов дыхания», предоставленная ЦНИИ туберкулеза РАМН, была протестирована методом ИФА на содержание специфических антител против рекомбинантного антигена Rv0934 *M. tuberculosis*. Результаты тестирования сывороток представлены на рис. 50. Титры специфических антител в сыворотках больных были на несколько порядков ниже, чем при тестировании сывороток КРС в системе иммуноферментного определения специфических антител против ЛПС *B. abortus* (раздел 3.7.1.2). Поэтому в качестве характеристики содержания антител в сыворотке использовали не титры, как в системе для серодиагностики бруцеллеза КРС, а величину оптической плотности субстратного раствора в ИФА при длине волны 450 нм, для сывороток, разведенных в 100 раз. В качестве отрицательного контроля были использованы 10 сывороток здоровых доноров, предоставленные Институтом медико-биологических проблем РАН. Максимальный уровень окрашивания сывороток здоровых доноров в ИФА был принят в качестве порогового уровня (cut-off). Сыворотки крови больных, дававшие сигнал в ИФА, превышающий пороговый уровень менее чем в 2 раза считали сомнительно положительными.

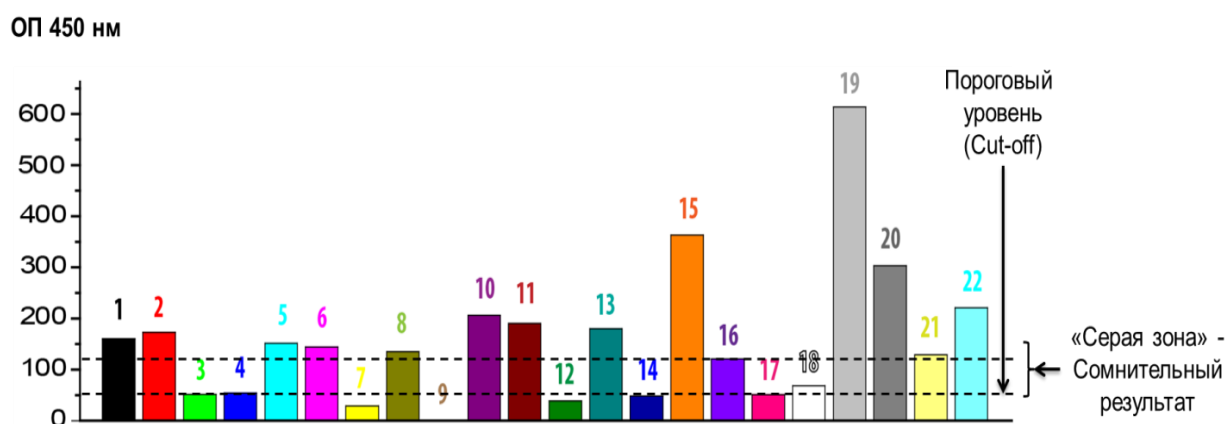


Рис. 50. Результаты серодиагностического тестирования сывороток крови людей, больных легочным туберкулезом, методом ИФА. Разведение сывороток – в 100 раз. (ОП 450 нм – оптическая плотность при длине волны 405 нм).

По результатам серодиагностического тестирования в ИФА 13 из 22 сывороток (59%) крови были классифицированы как положительные, ещё 2 сыворотки дали промежуточный результат тестирования.

*3.7.2.2. Разработка и характеристика иммунохроматографической тест-системы определения специфических IgG против рекомбинантного антигена Rv0934 M. tuberculosis в стандартной схеме анализа (Схема А).*

Изготовленные образцы ИХ-систем, созданных по схеме 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 (рис. 51.) демонстрируют, что данная система позволяет выявлять специфические антитела в сыворотке до концентраций около ~12 мкг/мл.

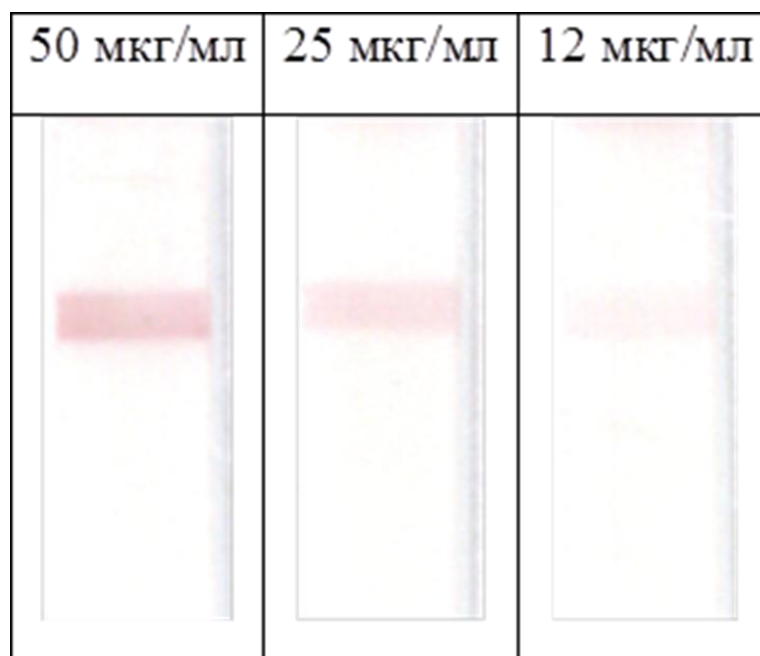


Рис. 51. Определение антител НТМ81 против рекомбинантного антигена Rv0934 *M. tuberculosis* в ИХ-системе по схеме А при разных концентрациях антител.

Тестирование изготовленных ИХ-систем на пробах сывороток крови больных туберкулезом показало их крайне низкую диагностическую эффективность : только 2 из 22 сывороток дали положительный результат тестирования. Этот результат является

следствием высокого предела обнаружения специфических антител в ИХ-системе относительно ИФА.

3.7.2.3. *Разработка и характеристика иммунохроматографической тест-системы определения специфических IgG против антигена Rv0934 M. tuberculosis в «обратной» схеме анализа (Схема Б).*

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 тестирования. На рис. 52 представлен пример внешнего вида тест-полосок после проведения анализа в двух форматах ИХА на 5 сыворотках.

При анализе сывороток крови 10 здоровых доноров ложноположительных результатов тестирования в двух схемах не наблюдалось.

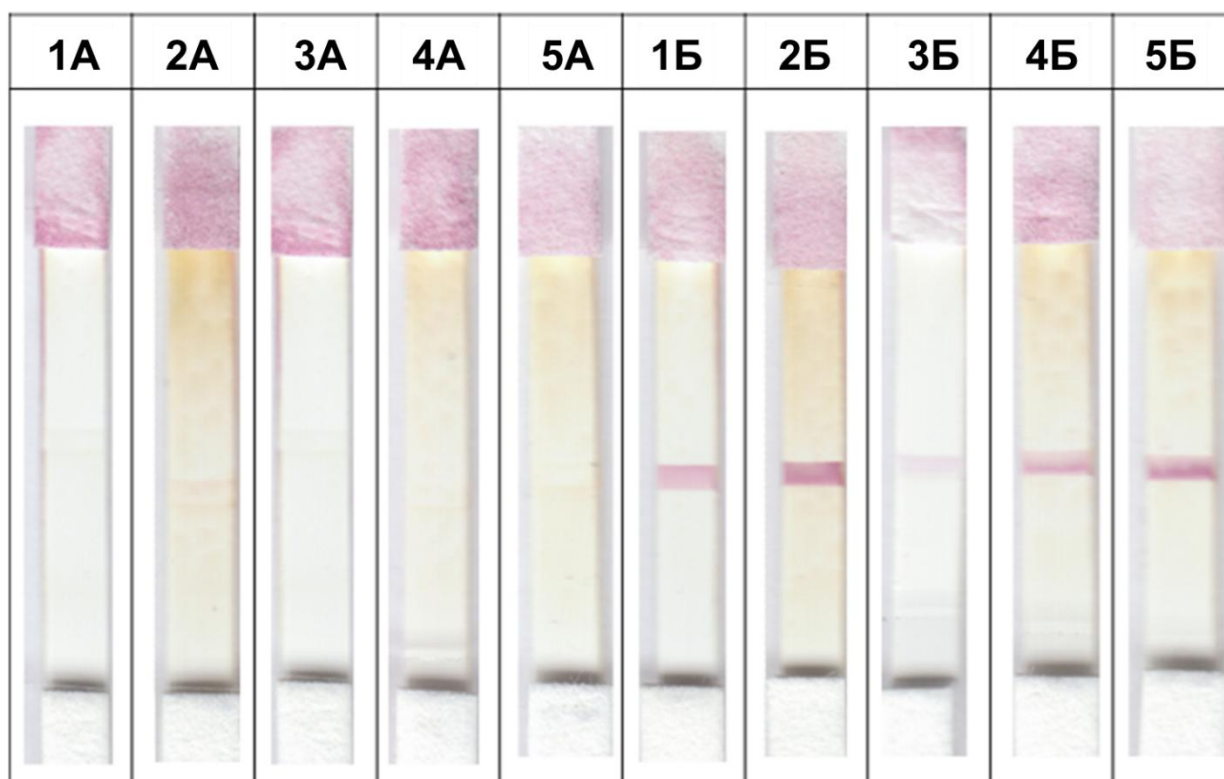


Рис. 52. Тестирование сывороток крови больных туберкулезом (пробы 1-5) по стандартной (А) и альтернативной (Б) схемах иммунохроматографической серодиагностики.

Схема Б позволяет на порядок повысить сигнал в ИХ-системе для определения специфических антител против Rv0934 *M. tuberculosis*, и таким образом, повысить

выявление больных легочным туберкулезом методом ИХА в 5 раз. Данный результат совпадает с теоретическими предсказаниями, которые были получены на основании анализа моделей систем А и Б (см. раздел 3.6.6. и рис. 43.). По диагностической чувствительности ИХ-система по схеме Б приблизилась к методу ИФА, что для такого экспрессного метода, как ИХА, является очень высоким показателем. Однако для половины больных по-прежнему не наблюдалось положительного результата тестирования. Данный результат является следствием незначительного иммунного ответа у некоторых пациентов на Rv0934 *M. tuberculosis*. Отметим, что в работе использовался рекомбинантный аналог антигена, значительно отличающийся от природного Rv0934 *M. tuberculosis* (см. раздел 1.5.1.3.), что также приводит к снижению эффективности диагностики.

Интенсивность окрашивания аналитической зоны может быть дополнительно повышена посредством предварительной инкубации сыворотки с коллоидным конъюгатом для приближения реакции к равновесным условиям. Однако введение дополнительной стадии усложняет процедуру анализа. Поэтому для обеспечения одностадийного анализа с предварительной инкубацией сыворотки и коллоидного конъюгата нами было предложено следующее техническое решение: в состав мультимембранного композита тест-системы включается дополнительная подложка, тормозящая поток жидкости перед рабочей мембраной. Такая подложка представляет собой стекловолоконный слой с нанесенным на него концентрированным раствором БСА (10-20%). После высушивания на подложке БСА образует «пробку», которая задерживает жидкость, пока БСА не растворится. Эта задержка обеспечивает предварительную инкубацию пробы с конъюгатом до их попадания на рабочую мембрану без введения дополнительной стадии в протокол анализа.

*3.7.2.4. Разработка и характеристика иммунохроматографической тест-системы определения специфических IgG против антигена Rv0934 M. tuberculosis в схеме анализа с использованием свойства поливалентности антител (Схема В).*

Схема В также была протестирована в качестве средства повышения эффективности ИХ-серодиагностики туберкулеза. Вначале была построена калибровочная кривая путем тестирования растворов, содержащих фиксированные концентрации специфических антител (моноклональных антител НТМ81), и определен предел визуальной детекции, равный 5 мкг/мл специфических антител (Рис. 53). Калибровочную кривую аппроксимировали согласно рекомендациям, описанным в работе Golubev и соавт. [190], функцией:

$$I(n) = A(1 - e^{-Bn}) \quad (62)$$

где  $n$  – концентрация аналита,  $A$  – асимптотическое значение сигнала при максимальной концентрации аналита,  $B$  – наклон линейной зависимости  $y = -B \cdot n$  при линеаризирующем преобразовании  $y = \ln((A-I)/A)$ .

При использовании схемы В добавление в анализируемые растворы неспецифических антител не приводило к существенному изменению сигнала и предел детекции специфических антител в сыворотках также составил 5 мкг/мл, что в 2 с лишним раза ниже предела детекции в схеме А.

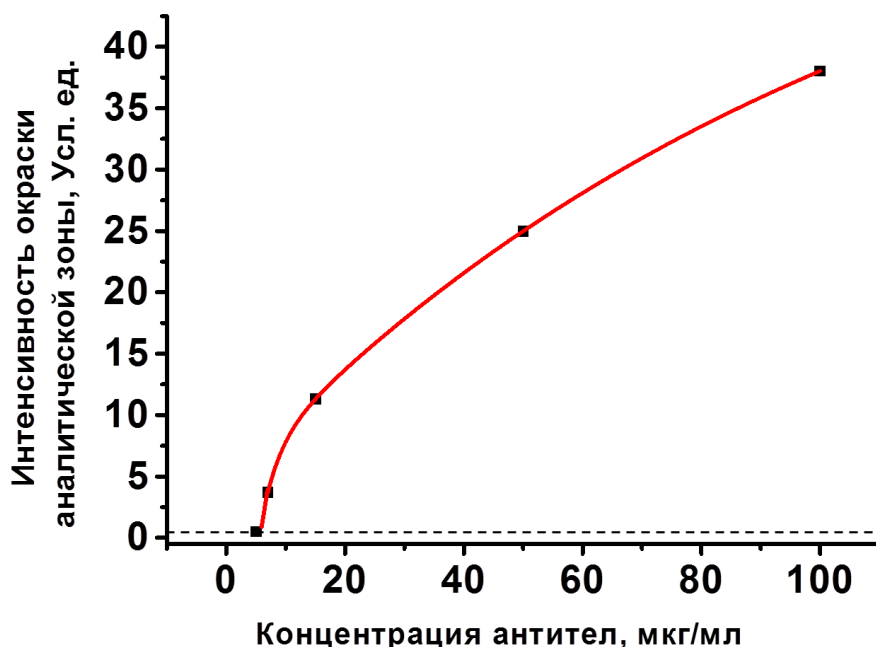


Рис. 53. Калибровочная кривая определения специфических антител против антигена 38 кДа *M. tuberculosis* методом иммунохроматографии. (-----) – предел визуальной детекции.

Отметим, что данная комплектация тест-системы позволяет выявлять специфические иммуноглобулины всех классов, что дополнительно снижает порог детекции. Кроме того, содержащиеся в пробе специфические антитела при взаимодействии с коллоидным конъюгатом потенциально могут формировать агрегаты, включающие несколько частиц. Связывание в аналитической зоне таких агрегатов увеличивает чувствительность детекции.

Тестирование сывороток крови больных туберкулезом подтвердило, что предложенная нами схема характеризуется более высокой диагностической чувствительностью по сравнению с традиционной схемой А (Рис. 54).

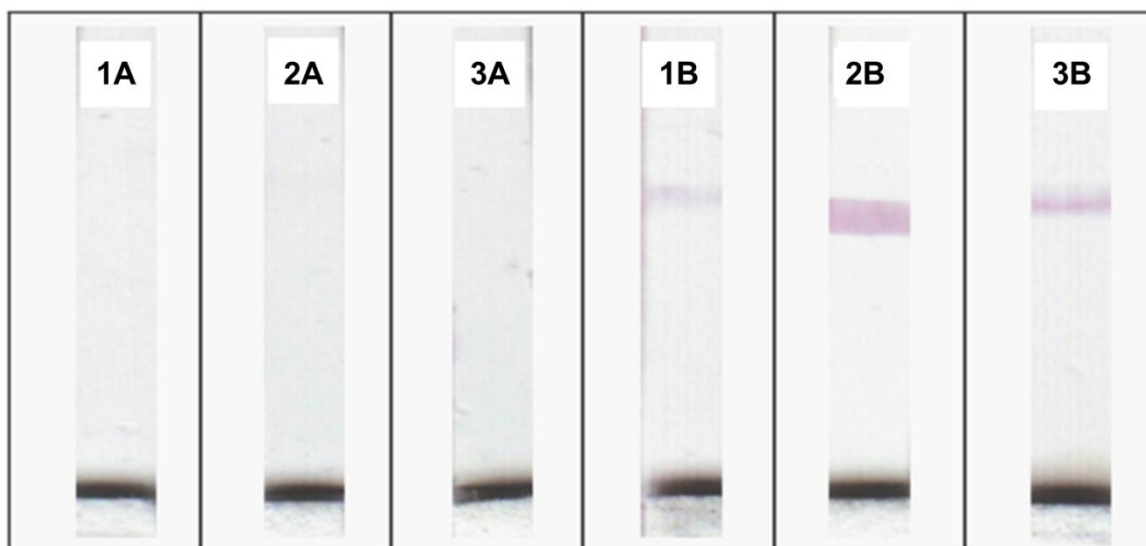


Рис. 54. Тестирование сывороток крови больных туберкулезом по стандартной схеме (1А, 2А, 3А) и по альтернативной схеме (1В, 2В, 3В).

Проведенное сравнение схем А и В серодиагностического ИХА подтвердило эффективность предложенного подхода для повышения чувствительности иммунохроматографической серодиагностики. Однако только 4 сыворотки (20%), которые не давали положительного результата тестирования в стандартной схеме ИХА (схема А), оказались положительными по результатам альтернативной схемы В, что значительно ниже показателя выявления положительных сывороток в схеме Б. Более низкая эффективность выявления специфических антител в схеме В по сравнению со схемой Б может быть связана с образованием тройных комплексов состава РАР (в обозначениях, введенных в разделе 3.6.1.) посредством связывания двух частиц маркерного конъюгата с двумя валентностями одной молекулы IgG. Такие комплексы не могут взаимодействовать с антигеном, иммобилизованным в аналитической зоне теста по схеме В, что приводит к снижению сигнала. Другим мешающим фактором в схеме В может быть резкое падение константы связывания с антигеном второй валентности IgG при связывании первой валентности с конъюгатом КЗ-антиген из-за стерических или иных факторов.

Чувствительность анализа может быть повышена, если в пробу предварительно добавить специфические антитела против используемого антигена (моноклональные антитела НТМ81) в концентрациях немного ниже предела детекции. В этом случае суммарная концентрация антител, изначально содержащихся в сыворотке, и добавленных антител может превысить предел детекции и проба будет диагностирована как положительная. Таким образом, чувствительность метода повышается посредством



смещения диапазона определяемых концентраций в область более низких значений. Принцип повышения чувствительности анализа таким способом проиллюстрирован на рис. 55.

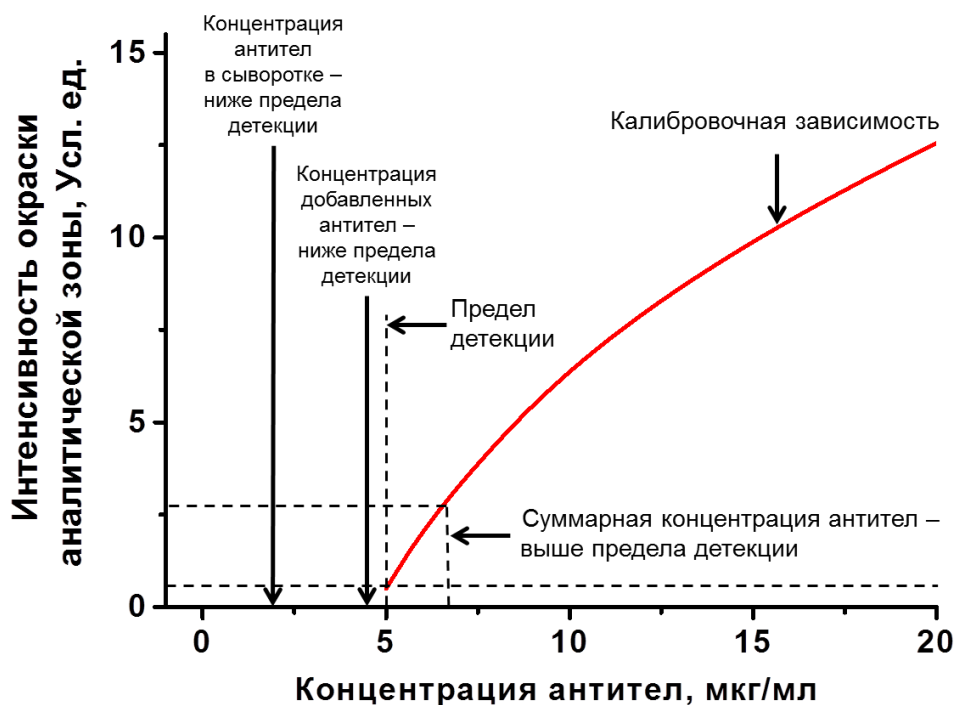


Рис. 55. Начальный участок калибровочной кривой определения специфических антител против антигена 38 кДа *M. tuberculosis* методом ИХА и иллюстрация принципа повышения чувствительности анализа за счет добавления в пробу специфических антител в концентрациях ниже предела детекции метода.

Пример использования предложенного подхода для выявления специфических антител в концентрациях ниже порога детекции метода приведен на рис. 56. Как видим, для больного туберкулезом пациента, у которого не наблюдалось положительного результата тестирования в ИХА (рис. 56 А), после добавления в сыворотку дополнительного количества специфических антител в концентрации, соответствующей пределу визуальной детекции (5 мкг/мл), наблюдается отчетливое окрашивание аналитической зоны (Рис. 56 Б). При этом для здорового донора положительных результатов тестирования в ИХА не наблюдалось ни до, ни после добавления дополнительных концентраций специфических антител.

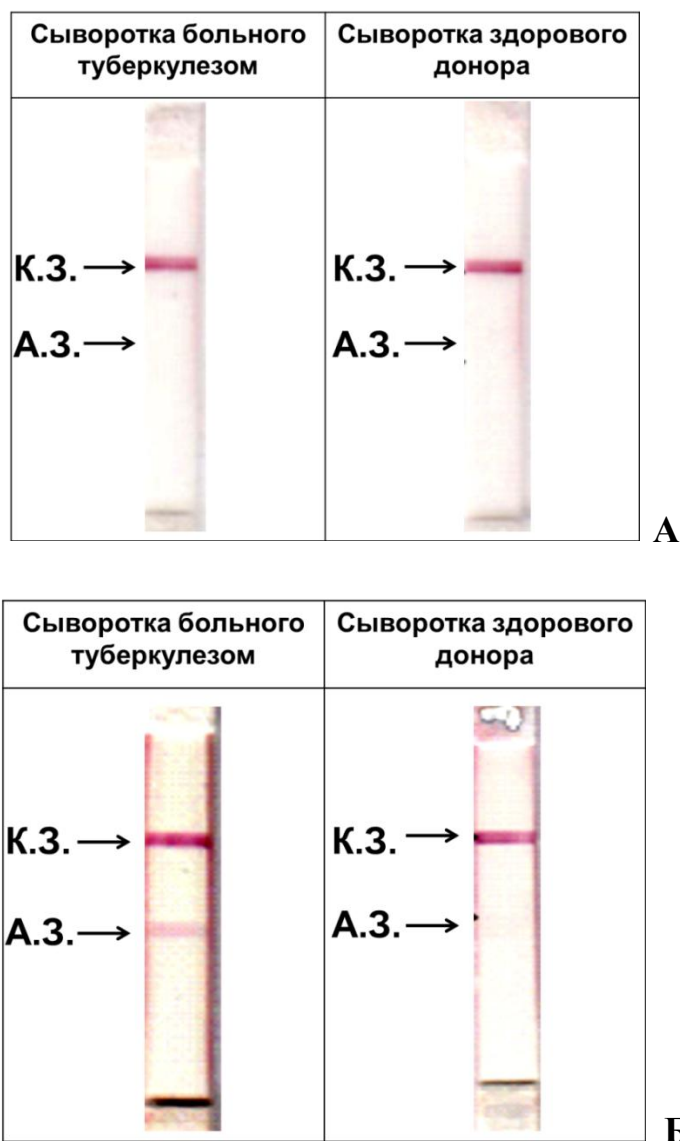


Рис. 56. Тестирование сывороток больного туберкулезом и здорового донора без добавления дополнительного количества специфических антител (А) и после добавления специфических антител в концентрации 5 мкг/мл (Б). А.З. – аналитическая зона; К.З. – контрольная зона.

Использование данного метода снижения предела детекции позволило повысить выявление больных туберкулезом в ИХА по схеме В до 30%.

Таким образом, для серодиагностики легочного туберкулеза людей наиболее эффективной оказалась предложенная в работе 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 антител.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты исследований позволяют сделать следующие 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 значения адсорбции белков на частице коллоидного золота диаметром 24 нм, составляющие 52, 90, 500, 550 молекул соответственно для Ig G, 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 коллоидного золота к полислойной иммобилизации.

3. Определена степень сохранения функциональной активности антител, иммобилизованных на поверхности золотых наночастиц, 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 анализа модели предложены рекомендации по оптимизации условий определения специфических антител. Показано, что увеличение регистрируемого сигнала и снижение предела обнаружения антител можно достигать разбавлением анализируемого образца до 100 раз.

5. Предложены две новых методики для иммунохроматографического определения специфических антител. В первом случае на поверхность коллоидного маркера и на мембрану сорбируется антиген, во втором – коллоидное золото конъюгируется с антигеном, а в аналитической зоне сорбируется белок А. Показано, что

применение данных схем позволяет снизить предел обнаружения антител в диагностике легочного туберкулеза.

6. Разработаны иммунохроматографические тест-системы для экспрессной (время анализа 10 минут) серодиагностики легочного туберкулеза людей с применением в качестве антигена белка Rv0934 и бруцеллеза крупного рогатого скота с применением в качестве антигена липополисахарида *Brucella abortus*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ryan K.J., Ray C.J. Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. New York: McGraw-Hill, 2004. 925 p.
2. Долгов В.В., Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – Т. 1. – С. 928.
3. Chareonsirisuthigul T., Khositnithikul R., Intaramat A., Inkomlue R., Sriwanichrak K., Piromsontikorn S., Kitiwanwanich S., Lowhnoo T., Yingyong W., Chairprasert A. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2013. – V. 76, No 1. – P. 42-45.
4. Birhanu H., Rogé S., Simon T., Baelmans R., Gebrehiwot T., Goddeeris B. M., Büscher P. Surra Sero K-Set, a new immunochromatographic test for serodiagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in domestic animals // Veterinary Parasitology. – 2015. – V. 211, No 3. – P. 153-157.
5. Grimaldi G., Teva A., Ferreira A. L., dos Santos C. B., Pinto I. d.-S., de-Azevedo C. T., Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2012. – V. 106, No 1. – P. 54-59.
6. Saghrouni F., Gaïed-Meksi S., Fathallah A., Amri F., Ach H., Guizani I., Saïd M. B. Immunochromatographic rK39 strip test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Tunisia // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2009. – V. 103, No 12. – P. 1273-1278.
7. Abdoel T., Dias I. T., Cardoso R., Smits H. L. Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock // Veterinary Microbiology. – 2008. – V. 130, No 3. – P. 312-319.
8. Nakano S., Tsukimura T., Togawa T., Ohashi T., Kobayashi M., Takayama K., Kobayashi Y., Abiko H., Satou M., Nakahata T. Rapid immunochromatographic detection of serum anti- $\alpha$ -galactosidase A antibodies in fabry patients after enzyme replacement therapy // PloS One. – 2015. – V. 10, No 6. – P. e0128351.

9. Janwan P., Intapan P. M., Yamasaki H., Rodpai R., Laummaunwai P., Thanchomngang T., Sanpool O., Kobayashi K., Takayama K., Kobayashi Y. Development and usefulness of an immunochromatographic device to detect antibodies for rapid diagnosis of human gnathostomiasis // *Parasites & Vectors*. – 2016. – V. 9, No 1. – P. 1.
10. Struyf F., Lemmens A., Valadas E., Verhaegen J., Van Ranst M. Usefulness of immunochromatographic detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as an adjunct to auramine staining for rapid diagnosis of tuberculosis in a low-prevalence setting // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. – 1999. – V. 18, No 10. – P. 740-742.
11. Schrier W. H., Schoengold R. J., Baker J. T., Norell J. L., Jaseph C. L., Okin Y., Doe J. Y., Chandler H. Development of FlexSure® HP—an immunochromatographic method to detect antibodies against *Helicobacter pylori* // *Clinical Chemistry*. – 1998. – V. 44, No 2. – P. 293-298.
12. Lateral Flow Immunoassay. / Eds. Wong R.C. T. H. Y. – New York: Humana Press, 2009.
13. Quesada-González D., Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 73. – P. 47-63.
14. Huang X., Aguilar Z. P., Xu H., Lai W., Xiong Y. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 75. – P. 166-180.
15. Dzantiev B. B., Byzova N. A., Urusov A. E., Zherdev A. V. Immunochromatographic methods in food analysis // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 55. – P. 81-93.
16. Goryacheva I. Y., Lenain P., De Saeger S. Nanosized labels for rapid immunotests // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2013. – V. 46. – P. 30-43.
17. Sperling R. A., Gil P. R., Zhang F., Zanella M., Parak W. J. Biological applications of gold nanoparticles // *Chemical Society Reviews*. – 2008. – V. 37, No 9. – P. 1896-1908.
18. Boisselier E., Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity // *Chemical Society Reviews*. – 2009. – V. 38, No 6. – P. 1759-1782.
19. Saha K., Agasti S. S., Kim C., Li X., Rotello V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing // *Chemical Reviews*. – 2012. – V. 112, No 5. – P. 2739-2779.
20. Zeng S.W. Y. K. T., Roy I., Dinh X.P., Yu X., Luan F. A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications // *Plasmonics*. – 2011. – V. 6, No 3. – P. 491-506.

21. Dreaden E. C., Alkilany A. M., Huang X., Murphy C. J., El-Sayed M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – V. 41, No 7. – P. 2740-2779.
22. Dykman L., Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – V. 41, No 6. – P. 2256-2282.
23. Daniel M.-C., Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology // *Chemical Reviews*. – 2004. – V. 104, No 1. – P. 293-346.
24. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение // М.: Наука. – 2008. – 319 с.
25. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discussions of the Faraday Society*. – 1951. – V. 11. – P. 55-75.
26. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature*. – 1973. – V. 241, No 105. – P. 20-22.
27. Thanh N. T., Maclean N., Mahiddine S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution // *Chemical Reviews*. – 2014. – V. 114, No 15. – P. 7610-7630.
28. Schulz F., Homolka T., Bastús N. G., Puentes V., Weller H., Vossmeier T. Little adjustments significantly improve the Turkevich synthesis of gold nanoparticles // *Langmuir*. – 2014. – V. 30, No 35. – P. 10779-10784.
29. Bastús N. G., Comenge J., Puentes V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening // *Langmuir*. – 2011. – V. 27, No 17. – P. 11098-11105.
30. LaMer V. K., Dinegar R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols // *Journal of the American Chemical Society*. – 1950. – V. 72, No 11. – P. 4847-4854.
31. Reiss H. The growth of uniform colloidal dispersions // *The Journal of Chemical Physics*. – 1951. – V. 19, No 4. – P. 482-487.
32. Peng X., Wickham J., Alivisatos A. Kinetics of II-VI and III-V colloidal semiconductor nanocrystal growth: 'Focusing' of size distributions // *Journal of the American Chemical Society*. – 1998. – V. 120, No LBNL. – P. 41792.

33. Lacerda S. H. D. P., Park J. J., Meuse C., Pristiniski D., Becker M. L., Karim A., Douglas J. F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins // *ACS Nano*. – 2009. – V. 4, No 1. – P. 365-379.
34. Lou S., Ye J.-Y., Li K.-Q., Wu A. A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: the influence of nanoparticulate size // *Analyst*. – 2012. – V. 137, No 5. – P. 1174-1181.
35. Бызова Н., Жердев А., Ескендинова С., Балтик К., Унышева Г., Муканов К., Раманкулов Е., Дзантиев Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы для экспрессной детекции липополисахаридного антигена и клеток возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2012. – Т. 48, № 6. – С. 653-661.
36. Sapsford K. E., Algar W. R., Berti L., Gemmill K. B., Casey B. J., Oh E., Stewart M. H., Medintz I. L. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology // *Chemical Reviews*. – 2013. – V. 113, No 3. – P. 1904-2074.
37. Salata O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2004. – V. 2, No 1. – P. 1.
38. Faraday M. The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. – 1857. – V. 147. – P. 145-181.
39. Mays D. C. Using the Quirk-Schofield diagram to explain environmental colloid dispersion phenomena // *Journal of Natural Resources & Life Sciences Education*. – 2007. – V. 36, No 1. – P. 45-52.
40. Sellers H., Ulman A., Shnidman Y., Eilers J. E. Structure and binding of alkanethiolates on gold and silver surfaces: implications for self-assembled monolayers // *Journal of the American Chemical Society*. – 1993. – V. 115, No 21. – P. 9389-9401.
41. Sen T., Haldar K. K., Patra A. Au nanoparticle-based surface energy transfer probe for conformational changes of BSA protein // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2008. – V. 112, No 46. – P. 17945-17951.
42. Ghitescu L., Bendayan M. Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 1990. – V. 38, No 11. – P. 1523-1530.



43. Kramarcy N. R., Sealock R. Commercial preparations of colloidal gold-antibody complexes frequently contain free active antibody // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 1991. – V. 39, No 1. – P. 37-39.
44. Sapsford K. E., Tyner K. M., Dair B. J., Deschamps J. R., Medintz I. L. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques // *Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 83, No 12. – P. 4453-4488.
45. Kaur K., Forrest J. A. Influence of particle size on the binding activity of proteins adsorbed onto gold nanoparticles // *Langmuir*. – 2012. – V. 28, No 5. – P. 2736-2744.
46. De Roe C., Courtoy P. J., Baudhuin P. A model of protein-colloidal gold interactions // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 1987. – V. 35, No 11. – P. 1191-1198.
47. 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*. – 2014. – V. 16, No 1. – P. 907-923.
48. Hong S.-H., Ji K. M., Ahn J.-H., Yeo W.-S. Multiplexed quantification of surface-bound proteins on gold nanoparticles // *Analytical Methods*. – 2013. – V. 5, No 16. – P. 3816-3818.
49. Zhang D., Neumann O., Wang H., Yuwono V. M., Barhoumi A., Perham M., Hartgerink J. D., Wittung-Stafshede P., Halas N. J. Gold nanoparticles can induce the formation of protein-based aggregates at physiological pH // *Nano Letters*. – 2009. – V. 9, No 2. – P. 666-671.
50. Bell N. C., Minelli C., Shard A. G. Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement // *Analytical Methods*. – 2013. – V. 5, No 18. – P. 4591-4601.
51. Mullen D. G., Desai A. M., Waddell J. N., Cheng X.-M., Kelly C. V., McNerny D. Q., Majoros I. J., Baker Jr J. R., Sander L. M., Orr B. G. The implications of stochastic synthesis for the conjugation of functional groups to nanoparticles // *Bioconjugate Chemistry*. – 2008. – V. 19, No 9. – P. 1748-1752.
52. Pellegrino T., Sperling R. A., Alivisatos A., Parak W. J. Gel electrophoresis of gold-DNA nanoconjugates // *BioMed Research International*. – 2008. – T. 2007.
53. Lees E. E., Gunzburg M. J., Nguyen T.-L., Howlett G. J., Rothacker J., Nice E. C., Clayton A. H., Mulvaney P. Experimental determination of quantum dot size distributions, ligand

- packing densities, and bioconjugation using analytical ultracentrifugation // *Nano letters*. – 2008. – V. 8, No 9. – P. 2883-2890.
54. Cho T. J., Hackley V. A. Fractionation and characterization of gold nanoparticles in aqueous solution: asymmetric-flow field flow fractionation with MALS, DLS, and UV–vis detection // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2010. – V. 398, No 5. – P. 2003-2018.
55. McKenzie F., Steven V., Ingram A., Graham D. Quantitation of biomolecules conjugated to nanoparticles by enzyme hydrolysis // *Chemical Communications*. – 2009. No 20. – P. 2872-2874.
56. Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH-and thermally induced conformational changes of bovine serum albumin adsorbed onto gold nanoparticles // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2011. – V. 217, No 2. – P. 395-401.
57. Naveenraj S., Anandan S., Kathiravan A., Renganathan R., Ashokkumar M. The interaction of sonochemically synthesized gold nanoparticles with serum albumins // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2010. – V. 53, No 3. – P. 804-810.
58. Jans H., Liu X., Austin L., Maes G., Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies // *Analytical Chemistry*. – 2009. – V. 81, No 22. – P. 9425-9432.
59. Dominguez-Medina S., McDonough S., Swanglap P., Landes C. F., Link S. In situ measurement of bovine serum albumin interaction with gold nanospheres // *Langmuir*. – 2012. – V. 28, No 24. – P. 9131-9139.
60. Calabretta M., Jamison J. A., Falkner J. C., Liu Y., Yuhas B. D., Matthews K. S., Colvin V. L. Analytical ultracentrifugation for characterizing nanocrystals and their bioconjugates // *Nano Letters*. – 2005. – V. 5, No 5. – P. 963-967.
61. Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G. J., Puntès V. Time evolution of the nanoparticle protein corona // *ACS Nano*. – 2010. – V. 4, No 7. – P. 3623-3632.
62. Tsai D.-H., DelRio F. W., Keene A. M., Tyner K. M., MacCuspie R. I., Cho T. J., Zachariah M. R., Hackley V. A. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods // *Langmuir*. – 2011. – V. 27, No 6. – P. 2464-2477.
63. Chakraborty S., Joshi P., Shanker V., Ansari Z., Singh S. P., Chakrabarti P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the

- structure and activity of bovine serum albumin // *Langmuir*. – 2011. – V. 27, No 12. – P. 7722-7731.
64. Brewer S. H., Glomm W. R., Johnson M. C., Knag M. K., Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces // *Langmuir*. – 2005. – V. 21, No 20. – P. 9303-9307.
65. Naveenraj S., Anandan S. Binding of serum albumins with bioactive substances—nanoparticles to drugs // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. – 2013. – V. 14. – P. 53-71.
66. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. / Schasfoort R. B., Tudos A. J. London: Royal Society of Chemistry, 2008. 265 p.
67. Situ C., Mooney M. H., Elliott C. T., Buijs J. Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2010. – V. 29, No 11. – P. 1305-1315.
68. Rich R. L., Myszka D. G. Grading the commercial optical biosensor literature—Class of 2008: ‘The Mighty Binders’ // *Journal of Molecular Recognition*. – 2010. – V. 23, No 1. – P. 1-64.
69. Mariani S., Minunni M. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2014. – V. 406, No 9-10. – P. 2303-2323.
70. Choi I., Choi Y. Plasmonic nanosensors: Review and prospect // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. – 2012. – V. 18, No 3. – P. 1110-1121.
71. Tokel O., Inci F., Demirci U. Advances in plasmonic technologies for point of care applications // *Chemical Reviews*. – 2014. – V. 114, No 11. – P. 5728-5752.
72. Li M., Cushing S. K., Wu N. Plasmon-enhanced optical sensors: a review // *Analyst*. – 2015. – V. 140, No 2. – P. 386-406.
73. Daghestani H. N., Day B. W. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors // *Sensors*. – 2010. – V. 10, No 11. – P. 9630-9646.
74. *Handbook of Optical Constants of Solids*. / Ed. Palik E. D. New York: Academic Press, 1998. 325 p.
75. *Biacore Sensor Surface Handbook*. – 2005. – URL: <http://www.gelifesciences.com/>.

76. Yuk J. S., Hong D.-G., Jung J.-W., Jung S.-H., Kim H.-S., Han J.-A., Kim Y.-M., Ha K.-S. Sensitivity enhancement of spectral surface plasmon resonance biosensors for the analysis of protein arrays // *European Biophysics Journal*. – 2006. – V. 35, No 6. – P. 469-476.
77. Oates T., Wormeester H., Arwin H. Characterization of plasmonic effects in thin films and metamaterials using spectroscopic ellipsometry // *Progress in Surface Science*. – 2011. – V. 86, No 11. – P. 328-376.
78. Lakowicz J. R. Plasmonics in biology and plasmon-controlled fluorescence // *Plasmonics*. – 2006. – V. 1, No 1. – P. 5-33.
79. Nico J., Fischer M. J., Mol N. J. Surface plasmon resonance: methods and protocols // – 2010.
80. Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species // *Chemical Reviews*. – 2008. – V. 108, No 2. – P. 462-493.
81. Surface Plasmon Nanophotonics. / Editors: Brongersma M. L., Kik P. G. Berlin: Springer, 2007. 403 p.
82. Huang Y., Ho H., Wu S., Kong S. Detecting phase shifts in surface plasmon resonance: a review // *Advances in Optical Technologies*. – 2011. – V. 2012.
83. Bioconjugate Techniques. / Hermanson G. T. 3rd edition. New York: Academic Press, 2013. 1200 p.
84. D'Agata R., Spoto G. Artificial DNA and surface plasmon resonance // *Artificial DNA: PNA & XNA*. – 2012. – V. 3, No 2. – P. 45-52.
85. Luzzi E., Minunni M., Tombelli S., Mascini M. New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2003. – V. 22, No 11. – P. 810-818.
86. Haupt K., Mosbach K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors // *Chemical Reviews*. – 2000. – V. 100, No 7. – P. 2495-2504.
87. Knoll W., Liley M., Piscevic D., Spinke J., Tarlov M. J. Supramolecular architectures for the functionalization of solid surfaces // *Advances in Biophysics*. – 1997. – V. 34. – P. 231-251.
88. Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions. / Editors: Nagata K., Handa H. Berlin: Springer, 2000. 252 p.
89. Brockman J. M., Frutos A. G., Corn R. M. A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA interactions with surface

- plasmon resonance imaging // *Journal of the American Chemical Society*. – 1999. – V. 121, No 35. – P. 8044-8051.
90. D'Agata R., Corradini R., Grasso G., Marchelli R., Spoto G. Ultrasensitive detection of DNA by PNA and nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging // *ChemBioChem*. – 2008. – V. 9, No 13. – P. 2067-2070.
91. Makaraviciute A., Ramanaviciene A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – V. 50. – P. 460-471.
92. Egawa Y., Miki R., Seki T. Colorimetric sugar sensing using boronic acid-substituted azobenzenes // *Materials*. – 2014. – V. 7, No 2. – P. 1201-1220.
93. Duval F., van Beek T. A., Zuilhof H. Key steps towards the oriented immobilization of antibodies using boronic acids // *Analyst*. – 2015. – V. 140, No 19. – P. 6467-6472.
94. Chivers C. E., Crozat E., Chu C., Moy V. T., Sherratt D. J., Howarth M. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability // *Nature Methods*. – 2010. – V. 7, No 5. – P. 391-393.
95. Šípová H., Homola J. Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: a review // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – V. 773. – P. 9-23.
96. Lippa P. B., Sokoll L. J., Chan D. W. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry // *Clinica Chimica Acta*. – 2001. – V. 314, No 1. – P. 1-26.
97. Mullett W. M., Lai E. P., Yeung J. M. Surface plasmon resonance-based immunoassays // *Methods*. – 2000. – V. 22, No 1. – P. 77-91.
98. D'Agata R., Spoto G. Surface plasmon resonance imaging for nucleic acid detection // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – V. 405, No 2. – P. 573-584.
99. Zhen G., Falconnet D., Kuennemann E., Vörös J., Spencer N. D., Textor M., Zürcher S. Nitrilotriacetic acid functionalized graft copolymers: A polymeric interface for selective and reversible binding of histidine-tagged proteins // *Advanced Functional Materials*. – 2006. – V. 16, No 2. – P. 243-251.
100. Rich R. L., Myszka D. G. Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature // *Journal of Molecular Recognition*. – 2008. – V. 21, No 6. – P. 355-400.
101. Baird C. L., Myszka D. G. Current and emerging commercial optical biosensors // *Journal of Molecular Recognition*. – 2001. – V. 14, No 5. – P. 261-268.

102. Zeng N., Wang Z., Li Y., Du M., Liu X. Inference of nonlinear state-space models for sandwich-type lateral flow immunoassay using extended Kalman filtering // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 2011. – V. 58, No 7. – P. 1959-1966.
103. Fu E., Nelson K. E., Ramsey S. A., Foley J. O., Helton K., Yager P. Modeling of a competitive microfluidic heterogeneous immunoassay: sensitivity of the assay response to varying system parameters // *Analytical Chemistry*. – 2009. – V. 81, No 9. – P. 3407-3413.
104. Ylander P. J., Hänninen P. Modelling of multi-component immunoassay kinetics—A new node-based method for simulation of complex assays // *Biophysical Chemistry*. – 2010. – V. 151, No 3. – P. 105-110.
105. Qian S., Bau H. H. A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays // *Analytical Biochemistry*. – 2003. – V. 322, No 1. – P. 89-98.
106. Qian S., Bau H. H. Analysis of lateral flow biodetectors: competitive format // *Analytical Biochemistry*. – 2004. – V. 326, No 2. – P. 211-224.
107. Ragavendar M., Anmol C. M. A mathematical model to predict the optimal test line location and sample volume for lateral flow immunoassays // *2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society – IEEE, 2012*. – P. 2408-2411.
108. Ahmad A., Low S., Shukor S. A., Fernando W., Ismail A. Hindered diffusion in lateral flow nitrocellulose membrane: Experimental and modeling studies // *Journal of Membrane Science*. – 2010. – V. 357, No 1. – P. 178-184.
109. Organization W. H. Global Tuberculosis Report // *Book Global tuberculosis report / 2015*.
110. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России. / Нечаева О. Б.: ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава РФ, 2015. 57 с.
111. Palomino J. C., Leão S. C., Ritacco V. Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. – 2007.
112. Mukherjee A. L. R., Kabra S.K. Recent advances in diagnosis of tuberculosis // *Pediatric Infectious Disease*. – 2012. – V. 4, No 2. – P. 45-50.
113. Venkataraman P., Herbert D., Paramasivan C. Evaluation of the BACTEC radiometric method in the early diagnosis of tuberculosis // *Indian Journal of Medical Research*. – 1998. – V. 108. – P. 120.

114. Tiwari R. P., Hattikudur N. S., Bharmal R. N., Kartikeyan S., Deshmukh N. M., Bisen P. S. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead // Tuberculosis. – 2007. – V. 87, No 3. – P. 193-201.
115. Stop T. Partnership's New Diagnostics Working Group // World Health Organization. Pathways to better diagnostics for tuberculosis: a blueprint for the development of TB diagnostics. Geneva, Switzerland: WHO. – 2009.
116. Weldingh K., Rosenkrands I., Okkels L. M., Doherty T. M., Andersen P. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – V. 43, No 1. – P. 57-65.
117. Lyashchenko K. P., Singh M., Colangeli R., Gennaro M. L. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases // Journal of Immunological Methods. – 2000. – V. 242, No 1. – P. 91-100.
118. Cole S., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S., Eiglmeier K., Gas S., Barry C. R. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // Nature. – 1998. – V. 393, No 6685. – P. 537-544.
119. Baumann R., Kaempfer S., Chegou N. N., Oehlmann W., Loxton A. G., Kaufmann S. H., van Helden P. D., Black G. F., Singh M., Walzl G. Serologic diagnosis of tuberculosis by combining Ig classes against selected mycobacterial targets // Journal of Infection. – 2014. – V. 69, No 6. – P. 581-589.
120. Abraham P. R., Udgata A., Latha G. S., Mukhopadhyay S. The *Mycobacterium tuberculosis* PPE protein Rv1168c induces stronger B cell response than Rv0256c in active TB patients // Infection, Genetics and Evolution. – 2016. – V. 40. – P. 339-345.
121. Abraham P. R., Latha G. S., Valluri V. L., Mukhopadhyay S. *Mycobacterium tuberculosis* PPE protein Rv0256c induces strong B cell response in tuberculosis patients // Infection, Genetics and Evolution. – 2014. – V. 22. – No. 244-249.
122. Xu J.-N., Chen J.-P., Chen D.-L. Serodiagnosis efficacy and immunogenicity of the fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* composed of the 10-kilodalton culture filtrate protein, ESAT-6, and the extracellular domain fragment of PPE68 // Clinical and Vaccine Immunology. – 2012. – V. 19, No 4. – P. 536-544.
123. Mahairas G. G., Sabo P. J., Hickey M. J., Singh D. C., Stover C. K. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis* // Journal of Bacteriology. – 1996. – V. 178, No 5. – P. 1274-1282.

124. Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Vallecillo A., Gutierrez-Pabello J., Suarez-Güemes F., McNair J., Cataldi A., Espitia C., Andersen P. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – V. 44, No 12. – P. 4326-4335.
125. Kumar G., Dagur P., Singh M., Yadav V., Dayal R., Singh H., Katoch V., Sengupta U., Joshi B. Diagnostic potential of Ag85C in comparison to various secretory antigens for childhood tuberculosis // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2008. – V. 68, No 2. – P. 177-183.
126. Waghmare P. J., Wankhade G., Anindita M., Wandile K., Badole C., Harinath B. SEVA TB ELISA–Multi antigen and antibody assays for serodiagnosis of suspected cases of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis in tertiary care hospital–A retrospective study // *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. – 2012. – V. 2. – P. S827-S832.
127. Afzal M., Khurshid S., Khalid R., Paracha R. Z., Khan I. H., Akhtar M. W. Fusion of selected regions of mycobacterial antigens for enhancing sensitivity in serodiagnosis of tuberculosis // *Journal of Microbiological Methods*. – 2015. – V. 115. – P. 104-111.
128. Ayala J. C., Pimienta E., Rodríguez C., Sarzo M., Jones J., Vallín C., Guerrero A., Milanés M. T., Anné J., Van Mellaert L. Assessment of an ELISA for serodiagnosis of active pulmonary tuberculosis in a Cuban population // *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. – 2015. – V. 5, No 10. – P. 772-778.
129. Дятлова В. И. Получение рекомбинантных и синтетических антигенов *Mycobacterium tuberculosis* и перспективы их использования для серодиагностики туберкулеза // Дисс. ... канд. биол. наук. М.: 2015. 209 с.
130. Raja A., Ranganathan U. D., Bethunaickan R. Improved diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of antibodies against multiple *Mycobacterium tuberculosis* antigens // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2008. – V. 60, No 4. – P. 361-368.
131. Deng S., Yuan T., Xia J., Huang H., Cheng X., Chen M. Clinical utility of a combination of lipoarabinomannan, 38-kDa, and 16-kDa antigens as a diagnosis tool for tuberculosis // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2011. – V. 71, No 1. – P. 46-50.
132. Ivanyi J. Serodiagnosis of tuberculosis: due to shift track // *Tuberculosis*. – 2012. – V. 92, No 1. – P. 31-37.



133. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2003. – V. 16, No 3. – P. 463-496.
134. Målen H., Søfteland T., Wiker H. Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2008. – V. 67, No 3. – P. 245-252.
135. Feng X., Xiu B., Chen K., Yang X., Zhang H., Yue J., Tan Y., Li H., Nicholson R. A., Tam A. W. Enhanced serodiagnostic utility of novel *Mycobacterium tuberculosis* polyproteins // *Journal of Infection*. – 2013. – V. 66, No 4. – P. 366-375.
136. Жердев А. В., Мартьянов А.А., Авдиенко В.Г., Бабаян С.С., Гергерт В.Я., Калюкина А.С., Лауринавичюте Д.К., Позднякова Н.В., Федоров А.Н., Северин Е.С., Панферцев Е.А., Бикетов С.Ф., Бызова Н.А., Дзантиев Б.Б. Сравнительная характеристика рекомбинантных белков *Mycobacterium tuberculosis* в серодиагностике туберкулеза. Физиология и патология иммунной системы. - 2006. – Т. 9. - С. 3-8.
137. Васильева Е. В., Вербов В.Н., Беклемишев А.Б., Мамаев А.Л., Цырульников А.О., Степаненко Т.А., Ивановский В.Б., Лапин С.В., Арег А. Поиск оптимальной комбинации антигенов для серодиагностики туберкулеза // *Инфекция и иммунитет*. – 2013. – Т. 3, № 3. – С. 235-242.
138. Bothamley G. H. Epitope-specific antibody levels in tuberculosis: biomarkers of protection, disease, and response to treatment // *Significance of Antigen and Epitope Specificity in Tuberculosis*. – 2014. – P. 46.
139. Steingart K. R., Henry M., Laal S., Hopewell P. C., Ramsay A., Menzies D., Cunningham J., Weldingh K., Pai M. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review // *PLoS Medicine* – 2007. – V. 4, No 6. – P. e202.
140. Steingart K. R., Dendukuri N., Henry M., Schiller I., Nahid P., Hopewell P. C., Ramsay A., Pai M., Laal S. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2009. – V. 16, No 2. – P. 260-276.
141. Деркачёва С. А., Ткаченко В. И., Беклемишев А. Б. Получение рекомбинантного антигена р38 *M. tuberculosis* и оценка возможности его применения в серодиагностике туберкулеза // *Сибирский научный медицинский журнал*. – 2007. № 5. – С. 62-68.

142. Andersen A. B., Hansen E. B. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis* // Infection and Immunity. – 1989. – V. 57, No 8. – P. 2481-2488.
143. Abdelnoor A., Khaled G., Matar G., Nabulsi-Khalil M., Ramadan F. Evaluation of a serological test for the diagnosis of tuberculosis using the 38kDa antigen // Eastern Journal of Medicine. – 2000. – V. 5, No 1. – P. 10-12.
144. Senol G., Erer O. F., Yalcin Y. A., Coskun M., Gündüz A., Biçmen C., Ertas M., Özkan S. A. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis // European Respiratory Journal. – 2007. – V. 29, No 1. – P. 143-148.
145. Загоскина Т. Ю. Теоретические прикладные аспекты конструирования твёрдофазных иммунохимических тест-систем для диагностики бруцеллёза // Дисс. ... докт. мед. наук. Иркутск, 2003. – 261 с.
146. Franco M. P., Mulder M., Gilman R. H., Smits H. L. Human brucellosis // The Lancet Infectious Diseases. – V. 7, No 12. – P. 775-786.
147. Ющук Н. Д., Венгеров, Ю.А. / В кн.: Инфекционные болезни: национальное руководство. Под ред. Долгова В.В., Меньшикова В.В.. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 1056.
148. Петрова О. Н., Караулов А.К., Бардина Н.С., Таценко Е.Е., Коренной Ф.И. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации. /М.: Россельхознадзор, 2015.
149. He Y. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2012. – V. 2. – P. 2.
150. Cardoso P. G., Macedo G. C., Azevedo V., Oliveira S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system // Microbial Cell Factories. – 2006. – V. 5, No 1. – P. 1-13.
151. Cloeckaert A., Weynants V., Godfroid J., Verger J.-M., Grayon M., Zygmunt M. S. O-Polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1998. – V. 5, No 6. – P. 862-870.
152. Bundle D., Cherwonogrodzky J., Gidney M., Meikle P., Perry M., Peters T. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides // Infection and Immunity. – 1989. – V. 57, No 9. – P. 2829-2836.

153. Rojas N., Freer E., Weintraub A., Ramirez M., Lind S., Moreno E. Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1994. – V. 1, No 2. – P. 206-213.
154. Aragón V., Diaz R., Moreno E., Moriyon I. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide // Journal of Bacteriology. – 1996. – V. 178, No 4. – P. 1070-1079.
155. Zygmunt M., Dubray G., Bundle D., Perry M. Purified native haptens of *Brucella abortus* B19 and *B. melitensis* 16M reveal the lipopolysaccharide origin of the antigens // Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie. – 1988. – V. 139– P. 421-433.
156. Diaz R., ToYos J., Salvo M., Pardo M. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis // Veterinary Research. – 1981. – V. 12, No 1. – P. 35-39.
157. Bundle D., Cherwonogrodzky J., Perry M. Characterization of *Brucella* polysaccharide B // Infection and immunity. – 1988. – V. 56, No 5. – P. 1101-1106.
158. Григорьева Г. И. Комплексный подход к биотехнологии получения бактериальных антигенов на модели бруцелл // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. – 2001. – С. 35-38.
159. Желудков М. М., Кулаков Ю. К. Использование в иммуоферментном анализе белковых антигенов бруцелл, синтезированных в клетках *Escherichia coli* // Микробиология. – 1998. – Т. 5. – С. 74-77.
160. Ko K. Y., Kim J.-W., Her M., Kang S.-I., Jung S. C., Cho D. H., Kim J.-Y. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis // Veterinary Microbiology. – 2012. – V. 156, No 3. – P. 374-380.
161. Bulashev A.K., Zhumalin A.Kh., Tursunov K. A. The antigenicity of the outer membrane proteins of *Brucella* // Biotechnology. Theory and Practice (Astata). – 2016. – No 1. – [http://kazatu.kz/assets/i/science/sf12\\_vet\\_120.pdf](http://kazatu.kz/assets/i/science/sf12_vet_120.pdf).
162. Kumar S., Tuteja U., Kumar A., Batra H. V. Expression and purification of the 26 kDa periplasmic protein of *Brucella abortus*: a reagent for the diagnosis of bovine brucellosis // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2008. – V. 49, No 3. – P. 213-218.
163. Tiwari A. K., Kumar S., Pal V., Bhardwaj B., Rai G. P. Evaluation of the recombinant 10-kilodalton immunodominant region of the BP26 protein of *Brucella abortus* for specific

- diagnosis of bovine brucellosis // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2011. – V. 18, No 10. – P. 1760-1764.
164. Lim J. J., Kim D. H., Lee J. J., Kim D. G., Min W., Lee H. J., Rhee M. H., Chang H. H., Kim S. Evaluation of recombinant 28 kDa outer membrane protein of *Brucella abortus* for the clinical diagnosis of bovine brucellosis in Korea // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2012. – V. 74, No 6. – P. 687-691.
165. Goward C., Murphy J., Atkinson T., Barstow D. Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G // *Biochemical Journal*. – 1990. – V. 267, No 1. – P. 171-177.
166. Safenkova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – V. 403, No 6. – P. 1595-1605.
167. Byzova N. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Eremin S. A., Dzantiev B. B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk // *Talanta*. – 2010. – V. 81, No 3. – P. 843-848.
168. Byzova N. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Eremin S. A., Sveshnikov P. G., Dzantiev B. B. Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – V. 701, No 2. – P. 209-217.
169. Zaiko V. V., Martinkina L. P., Steriopolo N. A., Kutvitsky V. A., Tugolukov A. E., Egorov E. E., Voloshchuk S. G., Starovoitova T. A., Toguzov R. T., Vengerov Y. Y. Microarray method for multiplex and serial latex agglutination tests with digital image registration // *Clinical Laboratory*. – 2007. – V. 54, No 7-8. – P. 273-279.
170. Gammopathies M. V. P. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis // *Am Fam Physician*. – 2005. – V. 71, No 1. – P. 105-112.
171. Dobrovolskaia M. A., Patri A. K., Zheng J., Clogston J. D., Ayub N., Aggarwal P., Neun B. W., Hall J. B., McNeil S. E. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2009. – V. 5, No 2. – P. 106-117.
172. Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3<sup>rd</sup> ed. – New York: Springer, 2010. – 859 p.

173. Kang K. A., Wang J., Jasinski J. B., Achilefu S. Fluorescence manipulation by gold nanoparticles: from complete quenching to extensive enhancement // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2011. – V. 9. – P. 16.
174. Engelborghs Y. Correlating protein structure and protein fluorescence // *Journal of Fluorescence*. – 2003. – V. 13, No 1. – P. 9-16.
175. Vivian J. T., Callis P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins // *Biophysical Journal*. – 2001. – V. 80, No 5. – P. 2093-2109.
176. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1949. – V. 51, No 4. – P. 660-672.
177. Khlebtsov N., Bogatyrev V., Khlebtsov B., Dykman L., Englebienne P. A multilayer model for gold nanoparticle bioconjugates: application to study of gelatin and human IgG adsorption using extinction and light scattering spectra and the dynamic light scattering method // *Colloid Journal*. – 2003. – V. 65, No 5. – P. 622-635.
178. Леенсон И.А. Как и почему происходят химические реакции. Элементы химической термодинамики и кинетики // М.: ИД Интеллект. – 2010. – 224 с.
179. Landry J., Ke Y., Yu G.-L., Zhu X. Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform // *Journal of immunological methods*. – 2015. – V. 417. – P. 86-96.
180. Сидорин Е. В., Соловьева Т. Ф. IgG-связывающие белки бактерий // *Биохимия*. – 2011. – Т. 76, No 3. – С. 363-378.
181. Meulenbroek A. J., Zeijlemaker W. P. Human IgG Subclasses: Useful Diagnostic Markers for Immunocompetence. – 3rd ed. – The Netherlands: Sanquin, 2008. 52 p.
182. Kemper M. J., Altrogge H., Ganschow R., Müller-Wiefel D. E. Serum levels of immunoglobulins and IgG subclasses in steroid sensitive nephrotic syndrome // *Pediatric Nephrology*. – 2002. – V. 17, No 6. – P. 413-417.
183. Tuerlinckx D., Florkin B., Ferster A., De Schutter I., Chantrain C., Haerynck F., Philippet P., Strengers P., Laub R. Pneumococcal antibody levels in children with PID receiving immunoglobulin // *Pediatrics*. – 2014. – V. 133, No 1. – P. e154-e162.
184. Turner P., Turner C., Green N., Ashton L., Lwe E., Jankhot A., Day N., White N., Nosten F., Goldblatt D. Serum antibody responses to pneumococcal colonization in the first 2 years of life: results from an SE Asian longitudinal cohort study // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2013. – V. 19, No 12. – P. E551-E558.

185. Goldammer A., Derfler K., Herkner K., Bradwell A. R., Hörl W. H., Haas M. Influence of plasma immunoglobulin level on antibody synthesis // *Blood*. – 2002. – V. 100, No 1. – P. 353-355.
186. HPLC of Biological Macro-Molecules, Revised and Expanded. / Gooding K. M., Regnier F. E.: CRC Press, 2002. – 792 p.
187. Horisberger M., Clerc M.-F. Labelling of colloidal gold with protein A // *Histochemistry*. – 1985. – V. 82, No 3. – P. 219-223.
188. Physical Chemistry. / Atkins P., de Paula, J. – 9th ed. – New York: W. H. Freeman and Company, 2009. – 1060 p.
189. Saha K., Bender F., Gizeli E. Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device // *Analytical Chemistry*. – 2003. – V. 75, No 4. – P. 835-842.
190. Golubev S.S., Kudeyarov Y.A., Malyuchenko V.M., Zherdev A.V., Smirnova N.I., Sotnikov D.V. Metrological complex for existing and developing immunoassay test systems: The method of calibration curves for immunoassay test systems // *Nanotechnologies in Russia*. - 2013. - V. 8, No 7-8. - P. 547-552.