

ПРОТОКОЛ РАЗРАБОТКИ СКРИНИНГОВОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К ВАКЦИНОУПРАВЛЯЕМЫМ ИНФЕКЦИЯМ: ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ К КОРИ, ПАРОТИТУ, КРАСНУХЕ И ГЕПАТИТУ В

Е. П. Мазунина¹ ✉, Д. А. Клейменов¹, В. А. Мануйлов^{1,2}, В. А. Гушчин^{1,3}, А. П. Ткачук¹

¹ Лаборатория трансляционной биомедицины, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва

² Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

³ Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Скрининговые мультиплексные тест-системы для оценки уровня содержания антител к вакциноуправляемым инфекциям активно используются в масштабных сероэпидемиологических исследованиях. Между тем, они отсутствуют в виде коммерчески доступных продуктов, т. к. задачи подобных исследований достаточно узкоспецифичны и ограничены разовым применением таких наборов. В результате исследователи должны самостоятельно разрабатывать и внедрять мультиплексные тест-системы при изучении иммунологической памяти населения. В работе обсуждаются теоретические и практические основы разработки мультиплексных скрининговых тест-систем, приводятся протоколы и рекомендации, основанные на практическом опыте авторов.

Ключевые слова: иммунологическая память, гуморальный иммунитет, вакциноуправляемые инфекции, корь, паротит, краснуха, гепатит В, серодиагностика, мультиплексный иммунный анализ

Финансирование: работа поддержана государственным заданием Министерства здравоохранения РФ.

✉ **Для корреспонденции:** Мазунина Елена Петровна
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; naldinaelena@rambler.ru

Статья получена: 26.09.2017 **Статья принята к печати:** 10.10.2017

A PROTOCOL OF DEVELOPMENT OF A SCREENING ASSAY FOR EVALUATING IMMUNOLOGICAL MEMORY TO VACCINE-PREVENTABLE INFECTIONS: SIMULTANEOUS DETECTION OF ANTIBODIES TO MEASLES, MUMPS, RUBELLA AND HEPATITIS B

Mazunina EP¹ ✉, Kleymenov DA¹, Manuilov VA^{1,2}, Gushchin VA^{1,3}, Tkachuk AP¹

¹ Laboratory of Translational Biomedicine, N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Institute of Molecular Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³ Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Multiplex screening assays for measuring antibodies to vaccine-preventable infections are routinely used in large-scale seroepidemiological studies, but not commercially available, because such studies are too specific and normally employ a particular type of the assay only once. This prompts researchers to develop their own solutions for exploring herd immunity. In this work we discuss theoretical principles and practical approaches to developing multiplex screening assays and give examples of protocols and recommendations based on our own experience in the field.

Keywords: immunological memory, humoral immunity, vaccine-preventable infections, measles, mumps, rubella, hepatitis B, serologic diagnosis, multiplex immunoassay

Funding: this work was supported by the Russian Ministry of Health.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Mazunina
ul. Gamalei, d. 18, Moscow, Russia, 123098; naldinaelena@rambler.ru

Received: 26.09.2017 **Accepted:** 10.10.2017

Качественные характеристики скрининговых тест-систем при проведении масштабных сероэпидемиологических исследований играют решающую роль. Современные тест-системы позволяют проводить скрининг антител против различных инфекций, входящих в национальный кален-

дарь вакцинации, и разрабатываются под оборудование, использующее технологии мультиплексного суспензионного анализа. Этот подход позволяет существенно уменьшить требуемый для анализа объем сыворотки крови, увеличить скорость проведения исследования, снизить

его стоимость. Между тем проблемой является полное отсутствие коммерчески доступных мультиплексных тест-систем, готовых для использования в сероэпидемиологических исследованиях. Потребителями таких тест-систем являются в основном лаборатории, проводящие масштабные серологические исследования и изучающие в их рамках десятки тысяч образцов. Тем не менее объем рынка пока все же небольшой, и, кроме того, коммерческий потенциал тест-систем подрывает отсутствие унифицированных требований по составу определяемых антител со стороны потенциальных заказчиков. Это указывает на необходимость разработки мультиплексных тест-систем самими лабораториями, но решение таких задач требует высокой квалификации персонала: необходимо владение специальными методами для разработки и валидации тест-системы, которая будет использоваться для скрининга.

В данной работе приводится протокол разработки тест-системы для проведения мультиплексного иммунного анализа (МИА) антител к вакциноуправляемым инфекциям на примере кори, паротита, краснухи и гепатита В (рис. 1). Обсуждаются потенциальные сложности каждого этапа и пути их преодоления. Данная методика используется в лаборатории трансляционной биомедицины Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (Москва). Детально описывается последовательность проведения работы на каждом из этапов на примере реальных данных. Мы надеемся, что приведенный протокол и демонстрация реальных данных сложностей станет отправной точкой для разработки мультиплексных суспензионных тест-систем в других лабораториях, что сделает получение данных об иммунологической памяти населения России к вакциноуправляемым инфекциям более эффективным и удобным.

I. Дизайн эксперимента

Рассмотренный здесь метод непрямого (серологического) иммуноанализа на магнитных микросферах и разрабатываемая тест-система были созданы на основе рекомендаций компании Luminex (США), производителя микросфер MagPlex™-С и анализатора MAGPIX [1], анализа литературы [2–10], в том числе серии руководств по планированию иммунологических исследований [11–13] и валидации тест-систем [11, 14–16], а также на основе собственных разработок.

Суть предлагаемого метода заключается в детекции антител в образцах крови с помощью антигенов (АГ), ковалентно связанных с поверхностью магнитных микросфер, и детектирующих антител (козы антитела против IgG человека), конъюгированных с флюорохромной меткой фикоэритрином. Данный метод отличается от классических иммунометрических методов, например иммуноферментного анализа (ИФА), более широким динамическим диапазоном и возможностью одновременного определения до 50 отдельных аналитов, если для детекции сигнала использовать прибор MAGPIX. Общая схема метода показана на рис. 1.

Данный метод использовался для разработки тест-системы для мультиплексного иммунного анализа, общая схема процесса показана на рис. 2.

Разрабатываемая тест-система предназначена для одновременной детекции IgG против вируса кори, краснухи, эпидемического паротита и вируса гепатита В (anti-HBs) в сыворотке крови человека. Вся процедура пробоподготовки по протоколу готовой методики занимает 1 ч, включая инкубации, плюс около 10 мин отводится на распределение реактивов и отмывки. Анализ на приборе,

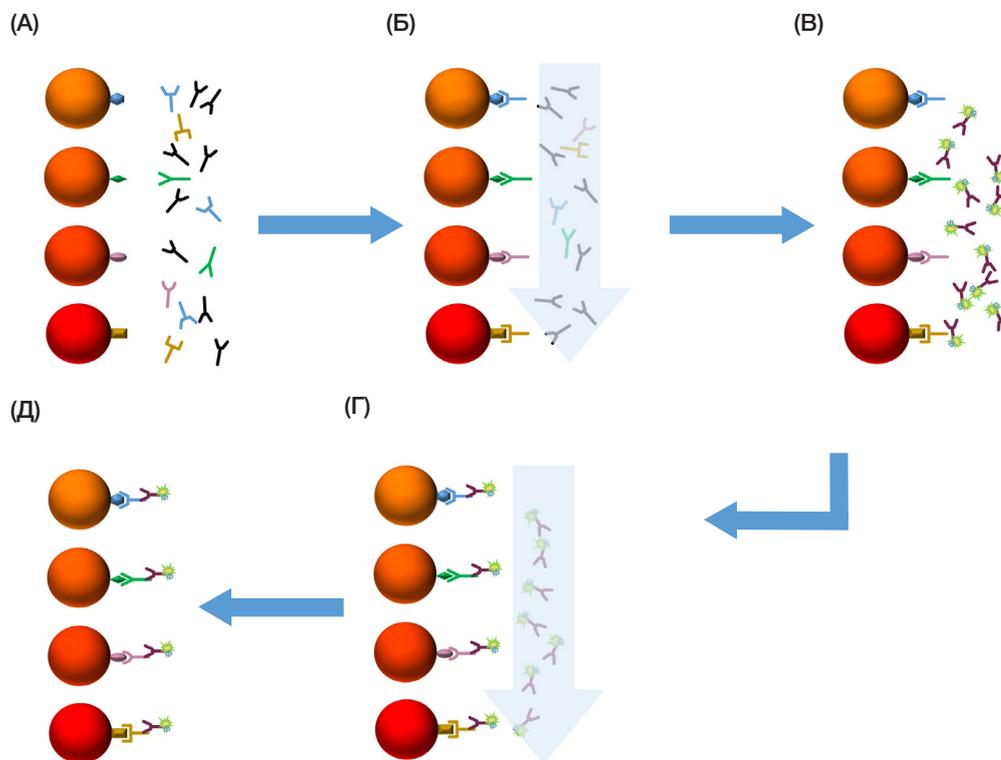


Рис. 1. Общая схема метода непрямого серологического мультиплексного иммунного анализа. Показаны микросферы четырех регионов, каждая из которых сенсibilizирована определенным антигеном. Добавление сыворотки к микросферам и первая инкубация (А). Первая серия отмывок — удаление несвязавшихся компонентов сыворотки (Б). Добавление к микросферам с иммунными комплексами антивидовых антител (В), конъюгированных с флюорохромной меткой — фикоэритрином и вторая инкубация. Вторая серия отмывок — удаление несвязавшихся компонентов (конъюгата) (Г). Микросферы с иммунными комплексами отправляются для анализа в мультиплексный анализатор MAGPIX (Д)

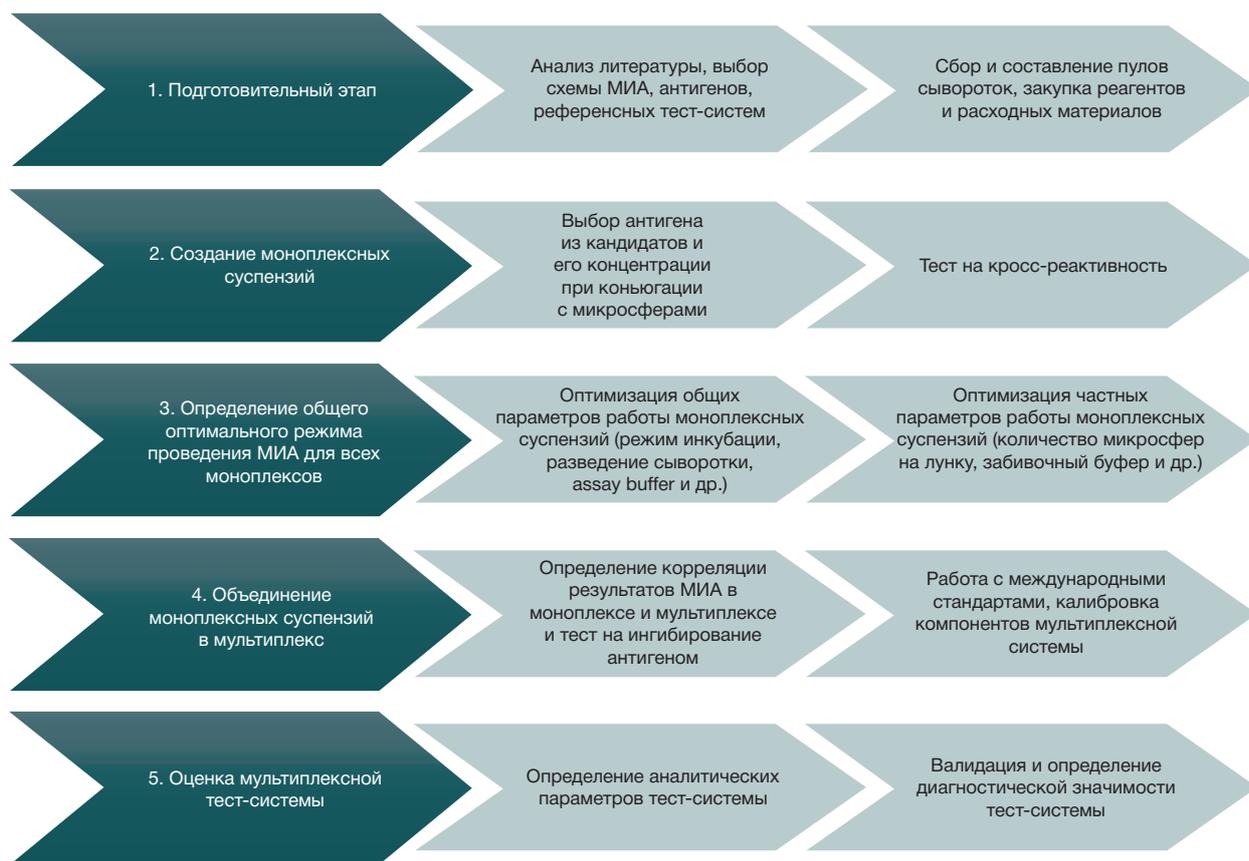


Рис. 2. Общая схема разработки мультиплексной тест-системы.

если используется 96-луночный планшет, занимает около 40 мин. Т. е. время от начала до получения результата составляет менее 2 ч. Рассмотрим подробнее основные этапы разработки тест-системы.

II. Получение моноплексных суспензий

1. Материалы

Для создания моноплексных суспензий необходимы следующие компоненты:

- антигены патогенов, для детекции IgG к которым предназначена мультиплексная тест-система (вирусы кори, эпидемического паротита, краснухи и гепатита В);
- магнитные карбоксилированные микросферы четырех различных регионов (MagPlex™-C);
- выборка сывороток, предварительно охарактеризованных с помощью лицензированной в России тест-системы;
- детектирующие антитела — антитела к IgG человека, конъюгированные с фикоэритрином (PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG; One Lambda, Thermo Fisher Scientific, США).

К выбору антигенов подходили, исходя из цели создания мультиплекса. В данном случае основной целью работы была оценка популяционного иммунитета к вакциноуправляемым заболеваниям человека. Вакцины для профилактики заболеваний, вызываемых вирусами кори, краснухи и эпидемического паротита, зарегистрированные в России, являются живыми, поэтому были выбраны прежде всего нативные антигены. Также в разработку были включены и

рекомбинантные АГ. Вакцинные препараты для профилактики гепатита В содержат рекомбинантный поверхностный антиген вируса (HBsAg) одного из двух субгенотипов ауw и adw, поэтому они и были выбраны для четвертого компонента мультиплексной суспензии (табл. 1).

Для того, чтобы иметь возможность определять IgG одновременно к четырем патогенам в одной реакции, необходимо иметь набор из соответствующего количества так называемых «регионов» магнитных микросфер (MagPlex™-C). Магнитные микросферы MagPlex, составляющие основу технологии xMAP, имеют микроскопические размеры (диаметр — 6,5 мкм) и окрашены различными концентрациями 2–3 флуорохромов, что позволяет создавать до 500 различных вариантов, или регионов, а, следовательно, и мультиплексные суспензии для детекции до 500 мишеней в одном образце. Магнитные свойства микросфер упрощают выполнение протоколов иммунных анализов таким образом, что с помощью магнитного штатива, на который помещается 96-луночный полистироловый планшет, можно простым встряхиванием удалить ту или иную жидкость из лунки, при этом примагнитенные микросферы с иммунокомплексом останутся в ней.

Создание мультиплексной тест-системы включало в себя не только разработку набора микросфер, конъюгированных с антигенами, но и оценку работы этой мультиплексной суспензии на тестовых образцах — сыворотках крови человека. Панель сывороток должна включать образцы, охарактеризованные общепринятым, лицензированным методом. Мы использовали 98 образцов сывороток, охарактеризованных с помощью ИФА-тест-систем производства компании «Вектор-Бест» (Россия) и автоматических иммунологических анализаторов BioPlex

(краснуха, корь; Bio-Rad, США), Architect (краснуха, гепатит В; Abbott, США), Liason (эпидемический паротит; DiaSorin, Италия) и Immulite (краснуха; Siemens, Германия). Для сохранности сывороток и предотвращения многократных циклов замораживания–оттаивания все образцы были разведены в соотношении 1 : 2 предварительно автоклавированным 100 % глицерином и хранились при –20 °С.

Визуализацию иммунокомплексов «микросфера – антиген – IgG» осуществляли с помощью детектирующих антител. Для этого применяли широко используемый препарат козьих антител, конъюгированных с фикоэритрином, который избирательно взаимодействует только с тяжелыми цепями IgG человека (PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG).

Для количественного определения антител в сыворотке крови была построена калибровочная кривая, относительно которой в дальнейшем определяли концентрацию IgG для исследуемого образца в международных единицах в миллилитре (МЕ/мл). Существуют международные стандарты (International Standards, IS), содержащие известное количество иммуноглобулинов к тому или иному патогену, однако они поставляются в ограниченных количествах и поэтому использовались нами для калибровки вторичных стандартов (Secondary Standards, SS) на основе имеющихся сывороток. В эксперименте использовали IS Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) из коллекции Национального института биологических стандартов и контролей (NIBSC, Великобритания) (табл. 2). SS в свою очередь являлись внутренним стандартом для создаваемой мультиплексной суспензии, относительно которого в

дальнейшем отбирались калибровочные стандарты для каждого анализа [11]. Т. к. для эпидемического паротита стандартов IS ВОЗ не существует, в качестве SS использовали калибровочные образцы одной из коммерческих тест-систем. Также в состав иммунологических ИФА-тест-систем входят сыворотки человека для контроля качества работы тест-системы, добавляемые как отдельные образцы. В работе использовались контроли из коллекции NIBSC (табл. 2).

2. Сенсibilизация микросфер — получение моноплексных суспензий

При разработке тест-системы были использованы два способа сенсibilизации микросфер. Оба они основаны на реакциях карбодииимидной химии, и один является модификацией другого. Для нативных антигенов краснухи и паротита, а также для рекомбинантного антигена кори использовали протокол ковалентного связывания антигена с поверхностью микросферы при помощи двухэтапной карбодииимидной химической реакции. Такой способ рекомендован, если сенсibilизирующая молекула имеет размер более 10 кДа. Для молекул менее 10 кДа, каким являлись рекомбинантные HBsAg, микросферы были предварительно, посредством одноэтапной карбодииимидной химической реакции, модифицированы химическим спейсером — дигидразидом адипиновой кислоты (ADH), с которым уже на втором этапе также карбодииимидной химической реакцией проводилось связывание АГ со спейсером на поверхности микросфер. Это было необходимо

Таблица 1. Антигены-кандидаты для включения в тест-систему

Заболевание	Тип	Коммерческое название антигена	Производитель
Гепатит В	Рекомб.	Вирус гепатита В, подтип ауw (HbsAg)	«Биалекса», Россия
		Вирус гепатита В, подтип адw (HbsAg)	
Краснуха	Рекомб.	Белок Е1 вируса краснухи	«Биалекса», Россия
		Белок Е2 вируса краснухи	
		Белок С вируса краснухи	
	Нативн.	Rubella K1S grade antigen	Microbix Biosystems, Канада
		Rubella K2S grade antigen	Jena Bioscience, Германия
Корь	Рекомб.	Нуклеокапсидный белок вируса кори NCP	Биотехнологическая компания «Капель», Россия
		Measles grade 2 antigen	Microbix Biosystems, Канада
	Нативн.	Measles virus antigen (Premium)	Jena Bioscience, Германия
		Measles virus antigen	
Эпидемический паротит	Рекомб.	Нуклеокапсидный белок вируса паротита NCP	Биотехнологическая компания «Капель», Россия
	Нативн.	Mumps grade 2 antigen	Microbix Biosystems, Канада
		Mumps/Parotitis virus antigen	Jena Bioscience, Германия

Таблица 2. Стандарты и контрольные сыворотки, использованные при создании тест-системы

Заболевание	Название стандарта/контроля	Концентрация или кол-во антител	Источник
Гепатит В	WHO International Standard Second International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human	100 IU в вiale	NIBSC
	Anti-Hepatitis B Surface Antigen Quality Control Serum 1	219,0±16 IU/ml	NIBSC
Краснуха	WHO International Standard Anti Rubella Immunoglobulin, Human	1600 IU в вiale	NIBSC
	Anti-Rubella Quality Control Reagent Sample 1	25,5±2,9 IU/ml	NIBSC
Корь	WHO International Standard 3 rd International Standard for Anti-Measles	3 IU в вiale	NIBSC
	Anti-Measles Quality Control Reagent Sample 1	754,6 mIU/ml	NIBSC
Эпидемический паротит	Anti-Mumps Quality Control Reagent Sample 1	728,6 EU/ml	NIBSC

для поднятия маленького пептида над шероховатой поверхностью микросферы и обеспечения возможности реакции между АГ и анализом.

2.1 Сенсibilизация микросфер двухэтапной карбодиимидной химической реакцией (для сенсibilизации 10⁶ микросфер)

Необходимые для процесса сенсibilизации микросфер растворы готовились в дистиллированной воде (дН₂О) с использованием следующих реактивов:

- NaH₂PO₄•H₂O для активационного буфера (0,1 М NaH₂PO₄, рН 6,2);
- MES гидрат для буфера для связывания (50 мМ MES, рН 5,0);
- фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением 0,02 % Tween-20, 0,1 % BSA, 0,05 % NaN₃, рН 7,4 (далее — PBS-TBN) — промывочный буфер;
- 1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимид гидрохлорид (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимид натрия соль (s-NHS) — концентрация 50 мг/мл для каждого реагента. Готовятся непосредственно перед использованием;

Необходимое оборудование:

- магнитный штатив для 1,5 мл пробирок типа Eppendorf;
- ультразвуковая ванна;
- центрифуга типа Vortex;
- лабораторный ротатор;
- автоматический счетчик клеток или камера Горяева и микроскоп;

- пробирки low-bind 1,5 мл типа Eppendorf.

Протокол двухэтапной карбодиимидной конъюгации:

– подготовка микросфер:

1. флакон с микросферами перемешать на ротаторе в течение 2 мин при 20 об./мин;
2. необходимое количество микросфер перенести в пробирку, «заводской» объем довести до 250 мкл дН₂О;
3. вортекс/соникация — 20 с, поместить на магнитный штатив (далее — магнит) на 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

– активация микросфер:

4. добавить в пробирку 80 мкл буфера для активации, вортекс — 20 с;
5. добавить по 10 мкл EDC и s-NHS, вортекс — 20 с;
6. оставить на 20 мин, перемешивая на вортексе по 20 с каждые 10 мин;

– отмывка № 1:

7. магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
8. добавить в пробирку 250 мкл буфера для связывания;
9. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
10. повторить п. 8 и 9;

– сенсibilизация микросфер:

11. добавить в пробирку 100 мкл буфера для связывания, вортекс/соникация — 20 с;
12. добавить в пробирку необходимое количество количество антигена (табл. 3);
13. довести буфером для связывания объем до 500 мкл;
14. поместить пробирку на ротатор на 120 мин. при 20 об./мин в темное место;

– отмывка № 2:

15. магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
16. добавить в пробирку 1000 мкл промывочного буфера;

17. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

18. повторить п. 16 и 17 еще 2 раза;
– завершение процедуры:

19. ресуспендировать микросферы в 1000 мкл буфера для хранения. Это может быть PBS-TBN или любой другой блокирующий буфер (определяется экспериментально);

20. измерить концентрацию микросфер на счетчике клеток или в камере Горяева. Исходя из этой цифры, рассчитать объем микросфер для приготовления в МИА;

21. сенсibilизированные микросферы хранить в темном месте на +4 °С и использовать в анализе через 16 ч (на следующий день).

*2.2 Сенсibilизация микросфер двукратной одноэтапной карбодиимидной химической реакцией через спейсер (для сенсibilизации 1,5*10⁶ микросфер)*

Необходимые для процесса сенсibilизации микросфер растворы готовили в дистиллированной воде (дН₂О) с использованием следующих реактивов:

- MES гидрат для буфера для связывания (0,1 М MES, рН 6,0);
- MES гидрат для промывочного буфера № 1 (0,1 М MES, рН 4,5);
- фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением 0,02 % Tween20, 0,1 % BSA, 0,05 % NaN₃, рН 7,4 (далее — PBS-TBN) — промывочный буфер №2;
- раствор ADH в концентрации 100 мг/мл в буфере для связывания;
- EDC в концентрации 100 мг/мл в дН₂О. Для п7 и для п19 готовить раствор отдельно.

Необходимое оборудование:

- магнитный штатив для 1,5 мл пробирок типа Eppendorf;
- ультразвуковая ванна;
- центрифуга типа Vortex;
- лабораторный ротатор;
- автоматический счетчик клеток или камера Горяева и микроскоп;

- пробирки low-bind 1,5 мл типа Eppendorf.

Протокол двукратной одноэтапной карбодиимидной конъюгации:

– подготовка микросфер:

1. флакон с микросферами перемешать на ротаторе в течение 2 мин при 20 об./мин;
2. необходимое количество микросфер перенести в пробирку, «заводской» объем довести до 250 мкл дН₂О;
3. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
4. добавить в пробирку 500 мкл буфера для связывания;
5. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;

– сенсibilизация микросфер спейсером:

6. добавить в пробирку 30 мкл ADH (1 мг вещества на 500 000 микросфер);
7. добавить в пробирку 30 мкл EDC (1 мг вещества на 500 000 микросфер);
8. довести объем до 500 мкл буфером для связывания;
9. поместить пробирку на ротатор на 60 мин при 20 об./мин в темное место;

– отмывка № 1:

10. магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
11. добавить в пробирку 500 мкл буфера для промывки №1;

12. магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
 13. повторить п. 11 и 12 еще 2 раза;
- завершение процедуры сенсибилизации микросфер спейсером:
14. ресуспендировать микросферы в 1 000 мкл буфера для промывки №1;
 15. измерить концентрацию микросфер на счетчике клеток или в камере Горяева. Исходя из этого числа, рассчитать количество антигена для связывания;
- сенсибилизация микросфер со спейсером:
16. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
 17. добавить в пробирку 100 мкл буфера для связывания, вортекс/соникация — 20 с;
 18. добавить в пробирку необходимое количество пептида (табл. 3);
 19. добавить в пробирку 30 мкл EDC (1 мг вещества на 500 000 микросфер);
 20. довести объем до 500 мкл буфером для связывания;
 21. поместить пробирку на ротатор на 120 мин при 20 об./мин в темное место;
- отмывка № 2:
22. магнит 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
 23. добавить в пробирку 1 000 мкл промывочного буфера № 2;
 24. вортекс/соникация — 20 с, магнит — 1 мин, удалить надосадочную жидкость;
 25. повторить п. 23 и 24 еще 2 раза;
- завершение процедуры:
26. ресуспендировать микросферы в 1 000 мкл буфера для хранения. Это может быть PBS-TBN или любой другой блокирующий буфер (определяется экспериментально). В данной тест-системе для моноплекса гепатита В используется PBS-TBN;
 27. измерить концентрацию микросфер на счетчике клеток или в камере Горяева. Исходя из этой цифры, рассчитать объем микросфер для приготовления в МИА;
 28. сенсибилизированные микросферы хранить в темном месте на +4 °С и использовать в анализе через 16 ч (на следующий день).

3. Протокол постановки мультиплексного непрямого (серологического) иммунного анализа

Прежде чем проверять параметры мультиплексной тест-системы, важно оценить работу каждой моноплексной суспензии по отдельности и подобрать оптимальные условия, общие для всех моноплексных систем. Такую оценку включает этап «Определение общего оптимального режима проведения МИА для всех моноплексов» (п. 3 на рис. 2). Для этого анализируются сыворотки по протоколу, описанному ниже.

Необходимые материалы:

- 96-луночный полистироловый планшет (далее — планшет);
- микропробирки объемом 0,5, 1,5 и 2 мл;
- набор охарактеризованных по наличию целевых IgG сывороток;
- суспензии готовых микросфер, конъюгированных с антигенами;
- стоковый 100-кратный раствор конъюгата детектирующих антител с фикоэритрином;
- фосфатно-солевой буферный раствор с PBS-TBN.

Необходимое оборудование:

- магнитная подставка для планшета Magnetic Plate Separator (Luminex);
- центрифуга типа Vortex;
- термошейкер;
- ультразвуковая ванна;
- анализатор MAGPIX (Luminex).

Протокол проведения анализа:

1. заранее включить нагрев термошейкера до +37 °С и анализатор MAGPIX;
2. приготовить разведение сыворотки 1 : 50 буферным раствором PBS-TBN в микропробирках;
3. приготовить суспензию микросфер из расчета 2 500 микросфер на одну реакцию (одну лунку в планшете) в объеме 50 мкл:
 - вортекс/соникация — 20 с,
 - отобрать нужный объем суспензии в новую пробирку и довести объем суспензии до расчетного буферным раствором PBS-TBN;
4. в планшет внести по 50 мкл готовой суспензии микросфер и 50 мкл разведенной сыворотки (в итоге сыворотки тестируются в разведении 1 : 100);
5. первая инкубация (30 мин, +37 °С): закрепить планшет в термошейкере и установить режим перемешивания 800 об./мин и таймер на 30 мин;
6. во время первой инкубации приготовить раствор детектирующих антител: отобрать нужное количество стокового раствора антител и приготовить разведение 1 : 100 PBS-TBN из расчета 50 мкл готового раствора детектирующих антител на лунку (итоговая концентрация антител в лунке — 2,5 мкг/мл).
7. снять планшет с термошейкера и установить на магнитную подставку на 2 мин, после чего, не убирая планшет с подставки, удалить жидкость из планшета;
8. отмывка PBS-TBN: в лунки планшета многоканальной пипеткой внести по 100 мкл PBS-TBN, перемешать содержимое лунок на термошейкере в течение 30 с, установить планшет на магнитную подставку на 2 мин, удалить жидкость из планшета, повторить процедуру отмывки еще раз;
9. ресуспендировать микросферы 50 мкл PBS-TBN на лунку;
10. в каждую лунку внести 50 мкл готового раствора детектирующих антител (п. 6);
11. вторая инкубация (30 мин, +37 °С): закрепить планшет в термошейкере и установить режим перемешивания 800 об./мин и таймер на 30 мин;
12. отмывка PBS-TBN: см. п. 8;
13. после отмывки внести по 100 мкл PBS-TBN в каждую лунку, перемешать содержимое лунок на термошейкере в течение 30 с;
14. установить планшет в анализатор MAGPIX и запустить анализ.

Важно отметить, что такие параметры, как температура и время инкубации, разведение сыворотки, концентрация детектирующих антител, варьируемы, и их изменение может привести к увеличению или же снижению интенсивности флуоресценции (MFI — единицы измерения флуоресцентного сигнала в методике). Нахождение выгодных для всех 4 моноплексных систем параметров — суть оптимизации тест-системы.

4. Оптимизация работы моноплексных суспензий

Оптимизация — это неотъемлемая часть создания мультиплексной суспензии. Она подразумевает подбор таких

условий для каждого из моноплексов, при которых выполняется ряд требований к тест-системам:

- низкие значения MFI для отрицательного контроля, когда в качестве аналита выступает например кроличья сыворотка либо сыворотки человека, в которых отсутствуют все иммуноглобулины;
- как можно больший диапазон значений сигнала между образцами сывороток, содержащими и не содержащими искомого антитела;
- соответствие результатов, полученных с помощью моноплексных суспензий, результатам, полученным референсным методом (ИФА).

Оптимизация затрагивает как общие факторы (температура и время инкубации, разведение сыворотки и раствор для разведения сыворотки, концентрация детектирующих антител), влияющие на все 4 моноплекса, так и частные факторы, которые могут быть для каждой моноплексной суспензии индивидуальными (тип блокирующего буфера для микросфер, концентрация антигена при конъюгации с микросферами, количество микросфер каждой моноплексной суспензии в лунке). По результатам оптимизации вышеперечисленных параметров нами были выбраны оптимальные условия для всех моноплексных суспензий (табл. 3).

Ввиду того, что некоторые выбранные антигены могут быть рекомбинантными, полученными путем экспрессии их в *Escherichia coli*, необходимо учесть, что препарат целевого антигена может содержать примеси антигенов этого микроорганизма. Антитела к этой бактерии, потенциально находящиеся в каждой сыворотке человека, могут добавить ложноположительный сигнал в общее значение MFI. Для того чтобы избежать подобного эффекта, в состав буфера для разведения сывороток включали лизат *E. coli* (3 %), который связывает специфичные к ней иммуноглобулины в исследуемой сыворотке [5].

Еще одним важным пунктом оптимизации тест-системы является оценка кросс-реактивности каждого моноплекса. Желательно в процессе создания тест-системы провести такой тест как можно раньше. Эксперименты на кросс-реактивность показывают, например, насколько исследуемая моноплексная тест-система с антигеном к вирусу кори специфична в отношении детекции антител IgG к

вирусу кори и не взаимодействует с антителами к другим инфекциям.

Постановка эксперимента на кросс-реактивность осуществляется по протоколу, описанному выше, при выбранных условиях (табл. 3). Так, сыворотку без антител IgG к вирусу кори, но с антителами IgG к остальным патогенам тестируют с моноплексной суспензией микросфер, конъюгированных с антигеном вируса кори. Таким же образом с помощью аналогично подобранных сывороток поступают с остальными моноплексными суспензиями. Если результаты показывают MFI на уровне предела чувствительности (LOD), то можно утверждать, что моноплексная суспензия не обладает перекрестной реактивностью, в обратном случае потребуется замена АГ.

На данном этапе разработки мультиплексной тест-системы была протестирована панель из 70 сывороток для детекции антител IgG к вирусам краснухи, кори и эпидемического паротита с помощью оптимизированных моноплексных суспензий. Проведение анализа осуществляли в соответствии с выбранными условиями (табл. 3). Результаты отображены на рис. 3–5 для метода МИА в единицах MFI, поскольку процедура калибровки и превращение тест-системы в количественную только предстоит. Для сравнения использовали результаты, полученные для той же панели сывороток, но с помощью метода ИФА («ВектоРубелла-IgG», «ВектоКорь-IgG», «ВектоПаротит-IgG»; «Вектор-Бест»).

Можно отметить, что дифференциация сывороток, содержащих и не содержащих антитела IgG к вирусу краснухи, с помощью моноплексной суспензии соответствует таковой в системе ИФА (рис. 3). Что же касается кори и паротита, то тут можно отметить достаточно высокие значения MFI для сывороток, не содержащих антитела IgG, которые близки, а в некоторых случаях превышают значения «серой зоны» (рис. 4–5). Это пример того, что моноплексные суспензии для детекции IgG к вирусам кори и эпидемического паротита требуют дополнительной оптимизации.

Безусловно, без этапа калибровки моноплексных тест-систем для детекции антител IgG к вышеперечисленным вирусам нельзя сравнивать результаты этих двух методов номинально, но все же их получение позволяет

Таблица 3. Некоторые оптимальные условия проведения анализа с помощью создаваемой тест-системы

Параметр		Моноплексная суспензия			
Вирус		Корь	Паротит	Краснуха	Гепатит В
Антиген	Название	Нуклеокапсидный белок вируса кори NCP	Mumps/Parotitis virus antigen (нативный)	Rubella K2S grade antigen (нативный)	HbsAg рекомбинантный, подтипы ayw и adw
	Концентрация, мкг/млн микросфер	5	10	10	20 (10 HbsAg ayw + 10 HbsAg adw)
Буфер для забивки микросфер		PBS-TBN			
Разведение сыворотки, буфер для разведения		1 : 100, PBS-TBN + лизат <i>E. coli</i>			
Концентрация детектирующих антител (Goat Anti-Human IgG)		2,5 мкг/мл			
Режим инкубации		<ul style="list-style-type: none"> • первая инкубация — 30 мин, вторая инкубация — 30 мин • температура инкубации — +37 °C • режим перемешивания — 800 об./мин 			
Кол-во микросфер в лунке каждого моноплекса		2 500			

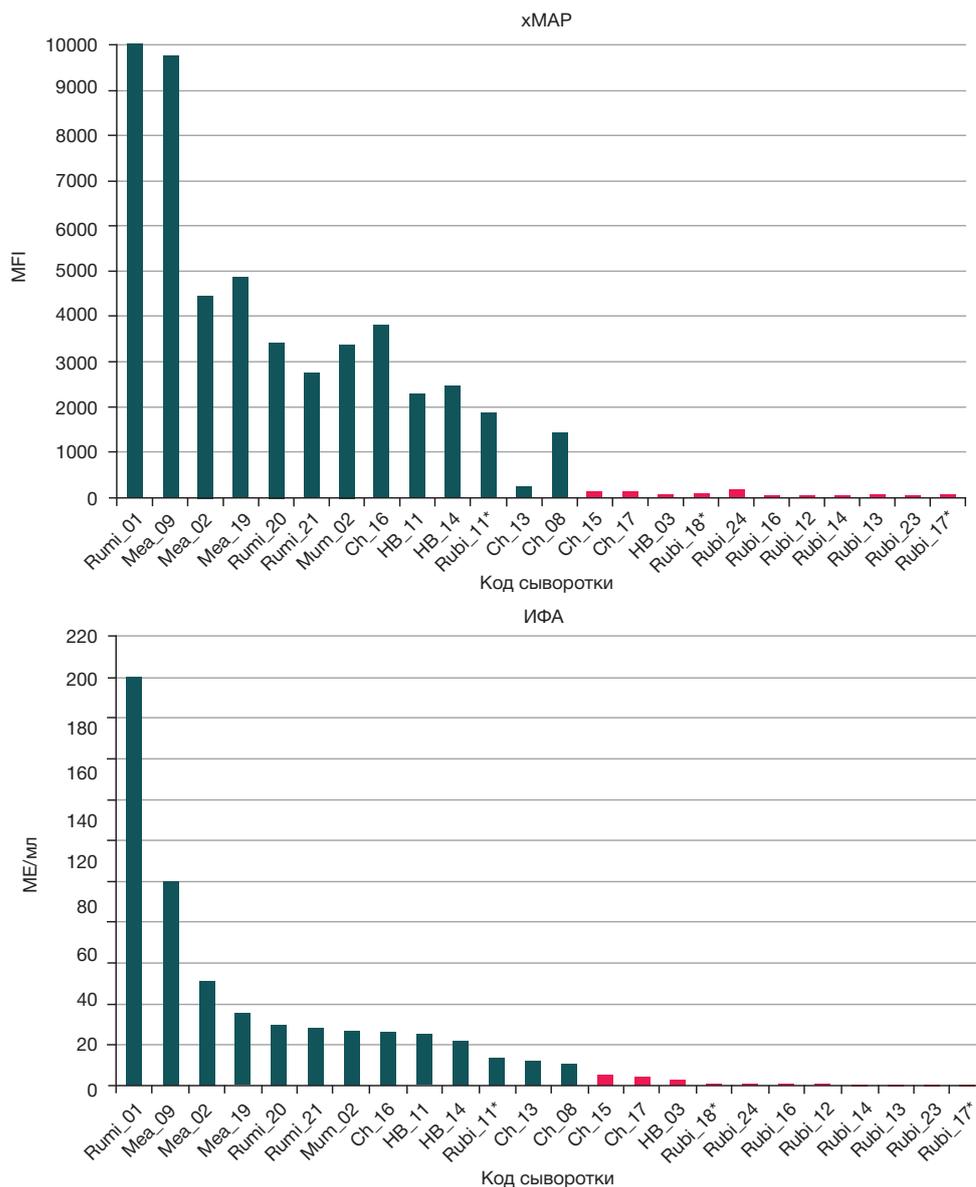


Рис. 3. Результаты определения антител IgG к вирусу краснухи в сыворотках крови человека методами xMAP и ИФА

до объединения моноплексов в мультиплексную суспензию судить о качестве работы моноплексной суспензии и решить, что дополнительная оптимизация не требуется и данная моноплексная тест-система готова к калибровке.

Созданные пулы сывороток были предварительно протестированы в постановках с моноплексными суспензиями в разведении от 1 : 100 до 1 : 409 600 4-кратным шагом. В результате были получены кривые, позволяющие также предварительно оценить потенциал этих пулов для использования в качестве вторичных стандартов (рис. 6).

III. Получение мультиплексных суспензий

После того, как каждая моноплексная суспензия прошла стадию оптимизации, предварительное тестирование на панели сывороток в сравнении с методом ИФА и был выбран единый режим проведения анализа, необходимо объединить моноплексные суспензии в мультиплекс и выяснить, как результаты, полученные в мультиплексной тест-системе, коррелируют с таковыми, полученными с помощью моноплексных суспензий по отдельности. Для

этого осуществляют постановку, где панель сывороток анализируют параллельно с помощью мультиплексной суспензии и с помощью моноплексных суспензий [4], по результатам которой проводят корреляционный анализ.

Создаваемая тест-система для детекции антител IgG к вирусам кори, краснухи, эпидемического паротита и гепатита В в настоящий момент находится на стадии сравнения качественных характеристик моноплексных и мультиплексной суспензий в выбранных условиях. Далее приводится схема с описанием действий по валидации мультиплексной суспензии без примеров по выбранным патогенам.

Ранее на этапе оптимизации упоминалась такая характеристика тест-системы, как специфичность. Определение специфичности тест-системы является неотъемлемой частью валидации (см. п. 3 на рис. 2). Однако на этапе получения мультиплексной тест-системы специфичность определяется иначе, нежели кросс-реактивность. Проводят тесты гомологичного и гетерологичного ингибирования сывороток антигенами [3, 7–11]. Для теста на ингибирование необходимо выбрать сыворотку с заведомо известным высоким содержанием антител IgG ко всем 4 патогенам.

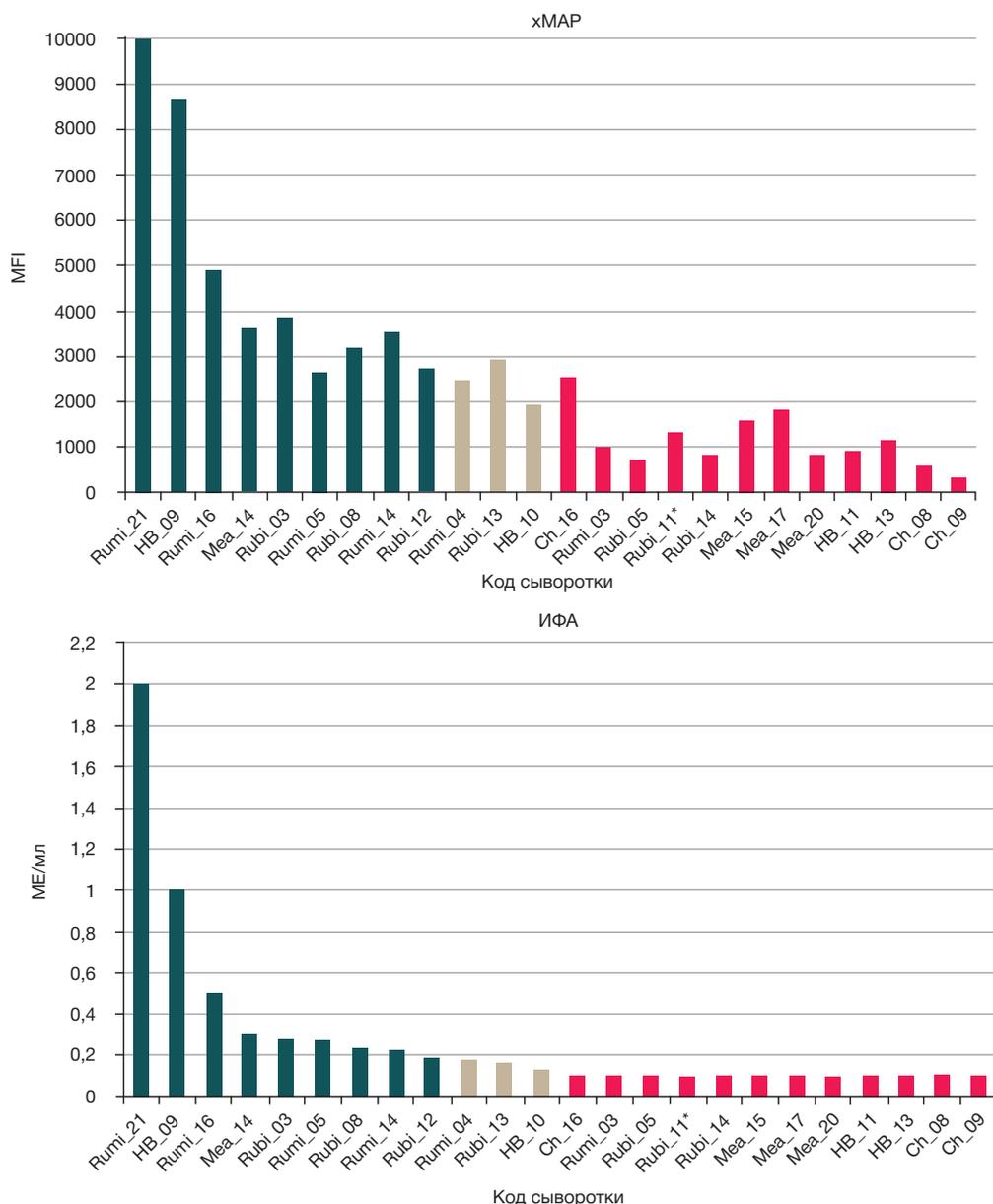


Рис. 4. Результаты определения антител IgG к вирусу кори в сыворотках крови человека методами xMAP и ИФА

Из выбранной сыворотки отбирают 4 алиquotы, каждая из которых подвергается предварительной инкубации с одним из 4 АГ. После преинкубации с антигенами к сывороткам добавляют мультиплексную суспензию микросфер. Параллельно в постановку включают контроль, в качестве которого выступает та же самая сыворотка, но без преинкубации с АГ. Гомологичное ингибирование в данном случае показывает специфичность моноплекса в составе мультиплексной системы в отношении гомологичного антигена, а гетерологичное ингибирование является показателем неспецифичной реакции моноплексных суспензий в отношении гетерологичных антигенов. Приемлемые пределы гомологичного и гетерологичного ингибирования — 80–120 % и менее 30 % соответственно.

Если тест-система демонстрирует специфичность в установленных пределах, то следующим шагом является стандартизация тест-системы — ее калибровка по международным стандартам (табл. 2). Для начала нужно отобрать сыворотки с высоким содержанием антител IgG для каждого патогена, сформировать из них положительный пул, возможно, будущий вторичный стандарт. Далее, в

рамках одной постановки осуществить раститровку международного стандарта и созданного положительного пула сывороток 4-кратным шагом (в соответствии с рекомендациями [11]), начиная с разведения 1 : 100, с каждой из 4 моноплексных суспензий по протоколу, приведенному ранее, в единых выбранных условиях. По результатам данной постановки проводится построение калибровочных кривых по известным значениям международных стандартов (в МЕ/мл) и полученным в ходе данного эксперимента значениям для тех же стандартов, но в единицах MFI для каждой моноплексной суспензии. Благодаря полученным калибровочным кривым выясняются концентрации каждого аналита в положительном пуле сывороток, после чего проводится построение кривых раститровки и делаются выводы о том, подходит ли данный пул для вторичного стандарта, необходимо ли его предварительное разведение.

Для стандартизации мультиплексной суспензии проводят такую же постановку с раститровкой IS и SS в параллели, но уже в мультиплексной суспензии микросфер. Калибровочные кривые сравнивают с таковыми для моноплексов, полученными на предыдущем этапе, делают

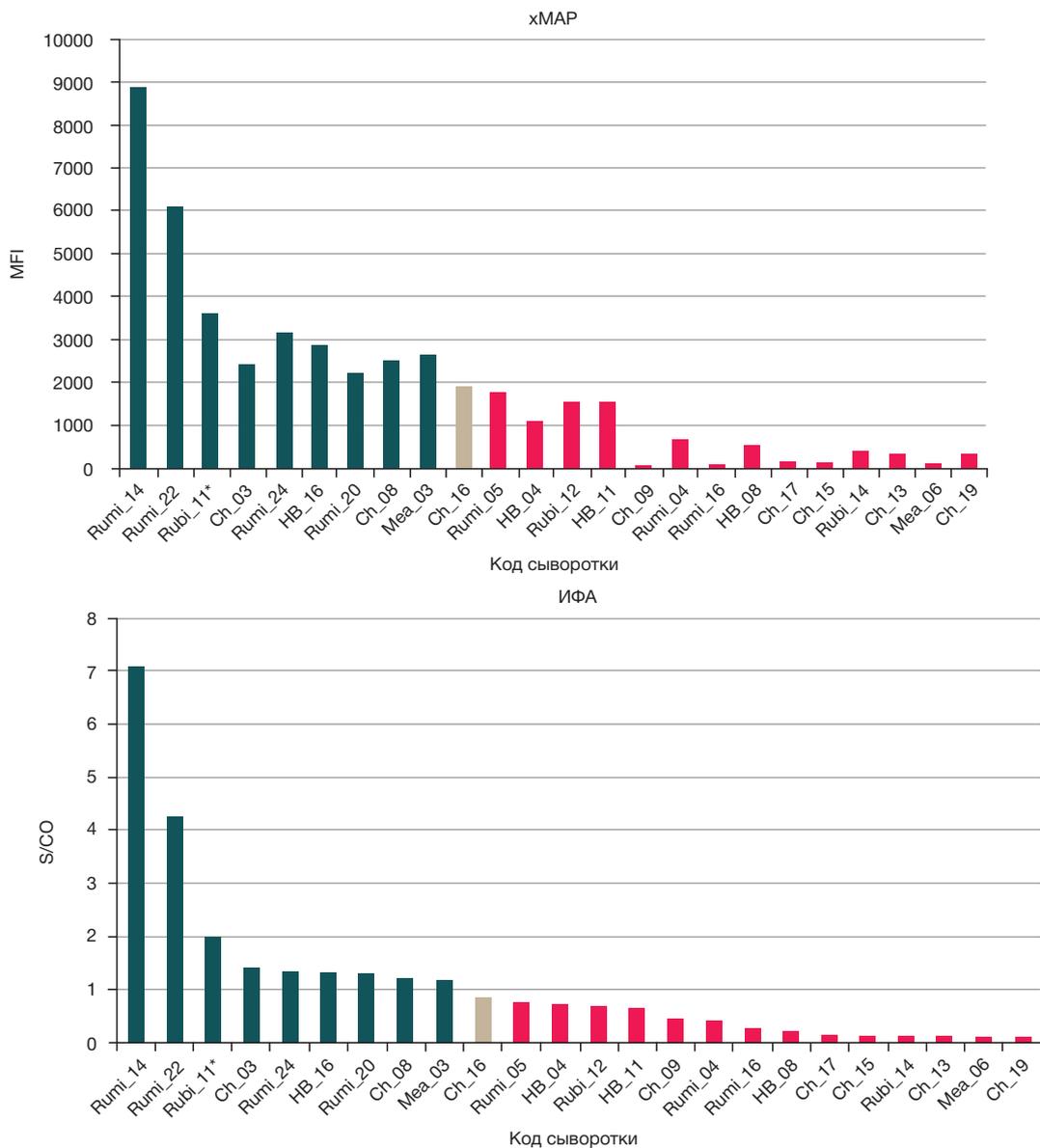


Рис. 5. Результаты определения антител IgG к вирусу эпидемического паротита в сыворотках крови человека методами xMAP и ИФА

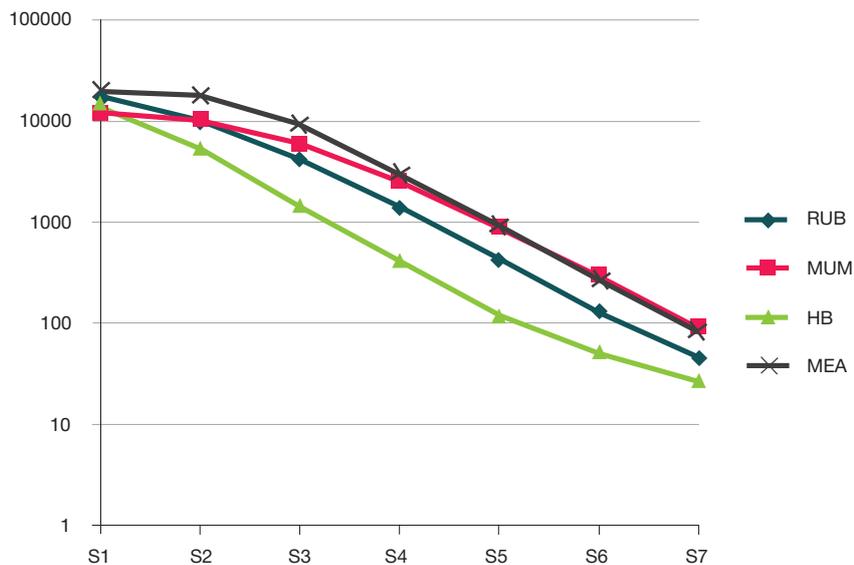


Рис. 6. Кривые разведения пулов сывороток с высоким содержанием антител к вирусам краснухи (RUB), кори (MEA), эпидемического паротита (MUM) и гепатита В (HB)

вывод об их корреляции. А также сравнивают кривые раститровки IS и SS, после чего делают заключение о пригодности кривой раститровки SS в качестве калибровочной кривой для мультиплексной суспензии.

Далее следует выбор оптимальной математической модели, которая бы наиболее точно описывала полученную калибровочную кривую и применялась в дальнейшем для расчета концентраций антител методом МИА, выраженных уже в международных единицах.

IV. Определение аналитических параметров, валидация и определение диагностической значимости тест-системы

Валидация — серия экспериментов, проводимых с целью достоверной оценки аналитических параметров тест-системы с помощью аттестованного аналитического метода. Цель валидации — удостовериться в возможности успешного использования разработанной тест-системы по назначению, а также определить ограничения при ее использовании в рутинной практике. Аналитических параметров у теста существует довольно много, и часть из них определяется и улучшается практически с самого начала разработки, например описанный выше тест на кросс-реактивность. Получается, что вообще любой эксперимент с сыворотками с заведомо известной концентрацией аналита (по данным какого-либо сертифицированного метода) в рамках создания тест-системы в какой-то степени является частью процесса валидации, или, другими словами, невозможно точно сказать, когда заканчивается создание тест-системы и начинается валидация.

Здесь будут рассмотрены основные аналитические параметры в контексте разрабатываемой тест-системы, а также предполагаемую схему ее валидации.

Чувствительность — это в широком смысле слова способность детектировать определенный аналит, а выразить ее можно через минимальную концентрацию этого аналита, достоверно детектируемую тест-системой. Выделяют аналитическую чувствительность тест-системы, когда делают несколько повторов нулевой пробы (без аналита) и

среднее значение полученных результатов плюс 2–3 стандартных отклонения образуют описываемую характеристику. Ее еще называют пределом чувствительности, обнаружения или детекции (LOD). Другими словами, пределом обнаружения можно назвать минимальную концентрацию аналита, достоверно детектируемую (но необязательно количественно) рассматриваемой тест-системой. Выделяют верхний и нижний пределы количественного определения (ULOQ и LLOQ — upper & lower limit of quantification), т. е. максимальное и минимальное количества аналита, которые можно детектировать при определенных параметрах точности и воспроизводимости.

Существует также понятие функциональной чувствительности — минимальной концентрации аналита, при детекции которой в нескольких повторах коэффициент вариации будет меньше определенного значения (10–20 %).

Прецизионность — степень разброса результатов в серии измерений, выполненных с помощью данной тест-системы в отношении одного и того же образца, представляемая в виде коэффициента вариации (CV %). Он отражает степень разброса результатов, полученных в одинаковых условиях. Существует определенная иерархия уровней этого показателя. Выделяют прецизионность внутривыставочную (вариабельность результатов в дублях/повторах в рамках одного запуска; считается приемлемой на уровне менее 10 %), межвыставочную (вариабельность результатов в рамках нескольких запусков методики; считается приемлемой на уровне менее 20 %), между лотами различных реагентов, между приборами и между различными исследователями, а также выделяют понятие воспроизводимости — прецизионности результатов использования методики между разными лабораториями.

Специфичность — в случае иммунологического метода это способность антитела реагировать только с одним антигеном, причем один из этой пары по совместительству является искомым аналитом. Мера способности антитела реагировать с другими веществами помимо антигена/аналита называется кросс-реактивностью.

Правильность — степень соответствия значения, полученного с использованием методики, и истинного значения измеряемой величины. Обязательная характеристика всех

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C1	Б	Б	Б	Б	Б	Б	C1	C1	C1
B	C2	C2	C2	Б	Б	Б	Б	Б	Б	C2	C2	C2
C	C3	C3	C3	O+Б (1)	O+Б (1)	O+Б (1)	O+M (1)	O+M (1)	O+M (1)	C3	C3	C3
D	C4	C4	C4	O+Б (2)	O+Б (2)	O+Б (2)	O+M (2)	O+M (2)	O+M (2)	C4	C4	C4
E	C5	C5	C5	O+Б (3)	O+Б (3)	O+Б (3)	O+M (3)	O+M (3)	O+M (3)	C5	C5	C5
F	C6	C6	C6	O+Б (4)	O+Б (4)	O+Б (4)	O+M (4)	O+M (4)	O+M (4)	C6	C6	C6
G	C7	C7	C7	O+Б (5)	O+Б (5)	O+Б (5)	O+M (5)	O+M (5)	O+M (5)	C7	C7	C7
H	C8	C8	C8	O+Б (6)	O+Б (6)	O+Б (6)	O+M (6)	O+M (6)	O+M (6)	C8	C8	C8

Рис. 7. Схема-дизайн постановки для валидации разработанной тест-системы. C1–8 — лунки для анализа стандартов-калибраторов и построения калибровочной кривой, Б — лунки для анализа стандартного дилуэнта, O+Б (образец+буфер) — образцы с аналитом в серии разведений со стандартным дилуэнтном, O+M (образец+матрикс) — образцы с аналитом в серии разведений с исходным матриксом образца (например, кроличьей сывороткой или сывороткой человека, лишенной антител)

количественных методик, определяемая путем постановки пробы с известной количественной характеристикой аналита в оцениваемой тест-системе. Отношение измеренного к ожидаемому называют степенью извлечения (recovery).

Линейность — способность с помощью методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрациям (количеству) анализируемого вещества в образце. Для установления линейности методики готовят серию стандартных растворов аналита в диапазоне концентраций 50–130 % путем разведения исходного стандартного раствора и проводят их количественное определение согласно разработанной методике. По результатам строится калибровочный график линейной зависимости найденных концентраций от введенных концентраций (в нормализованных координатах). Для оценки степени линейности рассчитывается коэффициент корреляции (r^2), угол наклона кривой (slope), значение точки пересечения с осью ординат (y-intercept).

Диапазон применения тест-системы — это интервал между наибольшей (ULOQ) и наименьшей (LLOQ) концентрацией аналита в анализируемом образце, для которого данная методика имеет приемлемый уровень *прецизионности, правильности и линейности*.

Помимо аналитических параметров для оценки диагностической значимости разработанной тест-системы при сравнении с референсным методом определяют также и диагностические показатели: диагностическую чувствительность — частоту обнаружения аналита в образцах, содержащих его по результатам применения референсного метода (в %); диагностическую специфичность — частоту отрицательного результата наличия аналита в образцах, не содержащих его по результатам применения референсного метода (в %) и др.

Для всех рассмотренных выше параметров существуют методики оценки в рамках валидационной схемы. На рис. 7 показан дизайн такой схемы, отражающей один запуск, в рамках которого можно получить практически все характеристики тест-системы. В лунках рядов 1–3 и 10–12 анализируются калибраторы в стандартном буфере для разведения (PBS-TBN). Мы получаем по 6 повторов 8 разведений калибровочных образцов. Эти данные будут содержать информацию о калибровочной кривой, внутрисюстановочной прецизионности, верхнем и нижнем пределах количественного определения аналита. В лунках, обозначенных буквой Б — лунках-бланках, анализируется

стандартный буфер для разведения (PBS-TBN) без аналита. Среднее значение этих 12 лунок можно использовать для определения фонового сигнала, предела детекции. В рядах 4–6 С–Н исследуются образцы с аналитом в серии разведений со стандартным буфером для разведения (PBS-TBN) в 3 повторах (О+Б — образец+буфер), а в рядах 7–9 С–Н — образцы с аналитом в серии разведений с исходным матриксом образца (например, кроличьей сывороткой или сывороткой человека, лишенной антител) (О+М — образец+матрикс). Полученная информация поможет оценить правильность методики, степень извлечения в используемом разбавителе, а также линейность и внутрисюстановочную прецизионность. Для оценки межпюстановочной прецизионности необходимо провести несколько описанных постановок. Для оценки специфичности проводят тесты на кросс-реактивность и ингибирование, описанные выше.

После проведения валидации планируется провести определение диагностической значимости тест-системы в сравнении с коммерческими ИФА-тест-системами. Для этих целей параллельно будет проанализировано не менее 400 сывороток — по 100 для каждой инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мультиплексный иммунный анализ на основе технологии xMAP за последнее десятилетие успел зарекомендовать себя как быстрый, чувствительный и точный метод прямого, непрямого серологического, а также конкурентного иммунного анализа. В исследованиях по оценке популяционного иммунитета к вакциноуправляемым заболеваниям человека мультиплексные иммунологические тест-системы уже продемонстрировали эффективность одновременно детекции нескольких аналитов, быстроту проведения анализа и аналитические свойства, не уступающие свойствам стандартных методов. Создаваемая нами тетраплексная тест-система позволит осуществить масштабный скрининг иммунного статуса населения России в отношении кори, краснухи, эпидемического паротита и гепатита В, вакцинация против которых предусмотрена национальным календарем прививок. Представленный протокол может быть использован для разработки других тест-систем для оценки уровня содержания антител против других вакциноуправляемых и социально значимых инфекций.

Литература

1. Luminex. The xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 3-е изд. [Интернет]; [дата обращения: 5 мая 2017 г.]. Доступно по ссылке: <http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook>.
2. Biagini RE, Schlottmann SA, Sammons DL, Smith JP, Snawder JC, Striley CA, et al. Method for simultaneous measurement of antibodies to 23 pneumococcal capsular polysaccharides. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Sep; 10 (5): 744–50. PubMed PMID: 12965898.
3. Caboré RN, Piérard D, Huygen K. A Belgian Serosurveillance/Seroprevalence Study of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Using a Luminex xMAP Technology-Based Pentaplex. Vaccines (Basel). 2016 May 10; 4 (2). pii: E16. DOI: 10.3390/vaccines4020016.
4. Crestani S, Leitolis A, Lima LF, Krieger MA, Foti L. Enhanced target-specific signal detection using an Escherichia coli lysate in multiplex microbead immunoassays with E. coli-derived recombinant antigens. J Immunol Methods. 2016 Aug; 435: 17–26. DOI: 10.1016/j.jim.2016.05.002.
5. Elberse KE, Tcherniaeva I, Berbers GA, Schouls LM. Optimization and application of a multiplex bead-based assay to quantify serotype-specific IgG against Streptococcus pneumoniae polysaccharides: response to the booster vaccine after immunization with the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2010 Apr; 17 (4): 674–82. DOI: 10.1128/CVI.00408-09.
6. Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine Streptococcus pneumoniae serotypes. J Immunol Methods. 2005 Jan; 296 (1–2): 135–47. DOI: 10.1016/j.jim.2004.11.006.
7. van Gageldonk PG, van Schaijk FG, van der Klis FR, Berbers GA. Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of serum antibodies to Bordetella pertussis, diphtheria and tetanus. J Immunol Methods. 2008 Jun 1; 335 (1–2): 79–89. DOI: 10.1016/j.jim.2008.02.018.
8. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM, et al. A multiplexed fluorescent microsphere

- immunoassay for antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Am J Clin Pathol*. 2002 Apr; 117 (4): 589–96. DOI: 10.1309/4KEH-AGY7-UT5H-41XJ.
9. Pickering JW, Martins TB, Schroder MC, Hill HR. Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae Type b. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Jul; 9 (4): 872–6. PubMed PMID: 12093688.
 10. Smits GP, van Gageldonk PG, Schouls LM, van der Klis FRM, Berbers GAM. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of IgG serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Mar; 19 (3): 396–400. DOI: 10.1128/CVI.05537-11.
 11. Wild DG, редактор. The immunoassay handbook. 4-е изд. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. Oxford, UK: Elsevier; 2013. 1036 с.
 12. Hnasko RM, редактор. ELISA: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology; vol. 1318. New York: Humana Press; 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5.
 13. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al, редакторы. Assay Guidance Manual [Интернет]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. [дата обращения: 2017 Oct 9]. Доступно по ссылке: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>.
 14. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Май 2001. [Интернет]; [дата обращения: 9 октября 2017 г.]; [25 с.]. Доступно по: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>.
 15. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on validation of bioanalytical methods: Draft. Лондон; 19 ноября 2009 г. [Интернет]; [дата обращения: 9 октября 2017 г.]; [17 с.]. Доступно по ссылке: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf.
 16. Юргель Н. В., Младенцев А. Л., Бурдейн А. В., Гетьман М. А., Малин А. А., Косенко В. В., редакторы. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). Часть I. В кн.: Руководство для предприятий фармацевтической промышленности (методические рекомендации). Часть I–III. М.: Спорт и Культура–2000; 2007. 192 с.

References

1. Luminex. The xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 3rd ed. [Internet]; [cited 2017 May 5]. Available from: <http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook>.
2. Biagini RE, Schlottmann SA, Sammons DL, Smith JP, Snawder JC, Striley CA, et al. Method for simultaneous measurement of antibodies to 23 pneumococcal capsular polysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Sep; 10 (5): 744–50. PubMed PMID: 12965898.
3. Caboré RN, Piérard D, Huygen K. A Belgian Serosurveillance/Seroprevalence Study of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Using a Luminex xMAP Technology-Based Pentaplex. *Vaccines (Basel)*. 2016 May 10; 4 (2). pii: E16. DOI: 10.3390/vaccines4020016.
4. Crestani S, Leitolis A, Lima LF, Krieger MA, Foti L. Enhanced target-specific signal detection using an Escherichia coli lysate in multiplex microbead immunoassays with E. coli-derived recombinant antigens. *J Immunol Methods*. 2016 Aug; 435: 17–26. DOI: 10.1016/j.jim.2016.05.002.
5. Elberse KE, Tcherniaeva I, Berbers GA, Schouls LM. Optimization and application of a multiplex bead-based assay to quantify serotype-specific IgG against Streptococcus pneumoniae polysaccharides: response to the booster vaccine after immunization with the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Apr; 17 (4): 674–82. DOI: 10.1128/CVI.00408-09.
6. Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine Streptococcus pneumoniae serotypes. *J Immunol Methods*. 2005 Jan; 296 (1–2): 135–47. DOI: 10.1016/j.jim.2004.11.006.
7. van Gageldonk PG, van Schaijk FG, van der Klis FR, Berbers GA. Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of serum antibodies to Bordetella pertussis, diphtheria and tetanus. *J Immunol Methods*. 2008 Jun 1; 335 (1–2): 79–89. DOI: 10.1016/j.jim.2008.02.018.
8. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM, et al. A multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Am J Clin Pathol*. 2002 Apr; 117 (4): 589–96. DOI: 10.1309/4KEH-AGY7-UT5H-41XJ.
9. Pickering JW, Martins TB, Schroder MC, Hill HR. Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae Type b. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Jul; 9 (4): 872–6. PubMed PMID: 12093688.
10. Smits GP, van Gageldonk PG, Schouls LM, van der Klis FRM, Berbers GAM. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of IgG serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Mar; 19 (3): 396–400. DOI: 10.1128/CVI.05537-11.
11. Wild DG, editor. The immunoassay handbook. 4th ed. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. Oxford, UK: Elsevier; 2013. 1036 p.
12. Hnasko RM, editor. ELISA: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology; vol. 1318. New York: Humana Press; 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5.
13. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al, editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. [cited 2017 Oct 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>.
14. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Май 2001. [Интернет]; [cited 2017 Oct 9]; [25 p.]. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>.
15. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on validation of bioanalytical methods: Draft. London; 19 Nov 2009. [Интернет]; [cited 2017 Oct 9]; [17 p.]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf.
16. Yurgel' NV, Mladentsev AL, Burdeyn AV, Get'man MA, Malin AA, Kosenko VV, editors. Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv (metodicheskie rekomendatsii). Part I. In: Rukovodstvo dlya predpriyatij farmatsevticheskoy promyshlennosti (metodicheskie rekomendatsii). Parts I–III. Moscow: Sport i Kul'tura–2000; 2007. 192 p. Russian.