# ОПТИМИЗАЦИЯ КРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ANTI-HCV ELISA: ЭКСПЕРТНО-АНАЛИТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОКРЫТИЯ И ИНКУБАЦИИ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

**Хамидов Ш.А.**
*Институт ядерной физики АН РУз, Ташкент, Узбекистан*
**Садиков И.И.**
*Институт ядерной физики АН РУз, Ташкент, Узбекистан*
**Абдукаюмов А.М.**
*Институт ядерной физики АН РУз, Ташкент, Узбекистан*
**Рихсиев А.З.**
*Институт ядерной физики АН РУз, Ташкент, Узбекистан*
**Хаитбаев А.Х.**
*Национальный университет Узбекистана. Ташкент, Узбекистан*

**Аннотация.** Проведён структурированный экспертно-аналитический пересмотр балльных оценок альтернативных решений с опорой на рецензируемую литературу, инструкции коммерческих наборов и методические руководства. Оптимальным признано покрытие рекомбинантных антигенов (core, NS3, NS4, NS5) из карбонатного буфера pH 9,6 с 6–8 M мочевины; гуанидин-HCl уместен преимущественно в исследовательских форматах из-за технологических рисков. По иммобилизации лидируют «холодные» режимы 2–8 °C (18 ч; ускоренный 4–6 ч) с наивысшей полнотой адсорбции и минимальным фоном; при строгом контроле герметизации сопоставимый результат достигается при 37 °C, 1 ч, что операционно предпочтительно. Для стабилизации покрытия оптимальны молочно-казеиновые системы с дисахаридами (сахароза/трегалоза); Tween-20 рекомендуется ограничивать стадиями промывки/разведения. Режим первичной инкубации сыворотки 37 °C, 60 мин обеспечивает лучший баланс чувствительности, устойчивости к матричным эффектам и пропускной способности. Сформированный «оптимальный профиль» условий может служить референтной точкой при разработке и валидации отечественных anti-HCV ELISA.

**Ключевые слова:** HCV; анти-HCV антитела; ELISA; оптимизация протокола; карбонатный буфер; мочевина; блокирующие/стабилизирующие буферы; казеин; трегалоза; режим инкубации сыворотки.

**Abstract.** We conducted a structured expert-analytical reassessment of score-based evaluations for alternative protocol options, drawing on peer-reviewed literature, instructions for commercial kits, and technical guidelines. The optimal approach for coating recombinant antigens (core, NS3, NS4, NS5) was identified as


ISSN 3030-3907

application from a carbonate buffer at pH 9.6 containing 6–8 M urea; guanidine-HCl is considered primarily suitable for research-grade formats because of technological risks. For antigen immobilization, cold conditions at 2–8 °C (18 h; accelerated 4–6 h) achieved the highest completeness of adsorption with minimal background. Under strict plate sealing and humidity control, a warm rapid coating at 37 °C for 1 h yielded comparable performance and is operationally advantageous. For coating stabilization, milk/casein-based systems supplemented with disaccharides (sucrose/trehalose) were optimal; Tween-20 should be confined to wash and sample-dilution buffers rather than used in long-term coating storage solutions. A primary serum incubation of 37 °C for 60 min provided the best compromise between analytical sensitivity, robustness to matrix effects, and throughput. The resulting “optimal profile” of conditions can serve as a reference point for the development and validation of domestic anti-HCV ELISA systems.

**Keywords:** HCV; anti-HCV antibodies; ELISA; protocol optimization; carbonate buffer; urea; blocking/stabilizing buffers; casein; trehalose; serum incubation conditions.

**Annotatsiya**. Muqobil echimlarning bal baholarini ekspertlar tomonidan ko'rib chiqilgan adabiyotlar, tijorat to'plamlari ko'rsatmalari va uslubiy qo'llanmalar asosida tuzilgan ekspert-tahliliy qayta ko'rib chiqish o'tkazildi. 6-8 M karbamid bilan pH 9,6 karbonat buferidan rekombinant antijenlarni (core, NS3, NS4, NS5) qoplash maqbul deb tan olingan; guanidin-HCl asosan texnologik xavflar tufayli tadqiqot formatlarida mos keladi.ulosa. Muqobil echimlarning bal baholarini ekspertlar tomonidan ko'rib chiqilgan adabiyotlar, tijorat to'plamlari ko'rsatmalari va uslubiy qo'llanmalar asosida tuzilgan ekspert-tahliliy qayta ko'rib chiqish o'tkazildi. 6-8 M karbamid bilan pH 9,6 karbonat buferidan rekombinant antijenlarni (core, NS3, NS4, NS5) qoplash maqbul deb tan olingan; guanidin-HCl asosan texnologik xavflar tufayli tadqiqot formatlarida mos keladi. Immobilizatsiya bo'yicha eng yuqori adsorbsiya to'liqligi va minimal fon bilan 2-8 °C (18 soat; tezlashtirilgan 4-6 soat) "sovuq" rejimlar etakchi hisoblanadi; sızdırmazlığı qat'iy nazorat qilish bilan, taqqoslanadigan natijaga 37 °C, 1 soat ichida erishiladi, bu operatsion jihatdan afzaldir. Qoplamani barqarorlashtirish uchun disaxaridlar (saxaroza/trehaloza) bo'lgan sut-kazein tizimlari maqbuldir; Tween-20 yuvish/suyultirish bosqichlarini cheklash tavsiya etiladi. 37 °C, 60 min sarum birlamchi inkubatsiya rejimi sezgirlik, matritsa ta'siriga chidamlilik va o'tkazuvchanlikning yaxshi muvozanatini ta'minlaydi.ızdırmazlığı qat'iy nazorat qilish bilan, taqqoslanadigan natijaga 37 °C, 1 soat ichida erishiladi, bu operatsion jihatdan afzaldir. Qoplamani barqarorlashtirish uchun disaxaridlar (saxaroza/trehaloza) bo'lgan sut-kazein tizimlari maqbuldir; Tween-20 yuvish/suyultirish bosqichlarini cheklash tavsiya etiladi. 37 °C, 60 min sarum



ISSN 3030-3907

birlamchi inkubatsiya rejimi sezgirlik, matritsa ta'siriga chidamlilik va o'tkazuvchanlikning yaxshi muvozanatini ta'minlaydi. Shartlarning shakllangan "maqbul profili" mahalliy anti-HCV ELISA-ni ishlab chiqish va tasdiqlashda mos yozuvlar nuqtasi bo'lib xizmat qilishi mumkin.

**Kalit so'zlar**: HCV; anti-HCV antikorlari; ELISA; protokolni optimallashtirish; karbonat buferi; karbamid; blokirovka qiluvchi / barqarorlashtiruvchi tamponlar; kazein; trehaloza; sarum inkubatsiya rejimi.

**Введение**

Вирус гепатита С (HCV) остаётся одной из основных причин хронического гепатита, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, формируя существенную долю глобальной смертности от хронических заболеваний печени [1–3]. По оценкам ВОЗ, в 2022–2024 гг. порядка 50 млн человек живут с хронической HCV-инфекцией, ежегодно регистрируется около 1 млн новых случаев, а сотни тысяч смертей связаны с осложнениями HCV-индуцированного поражения печени [1,2]. На этом фоне стратегия элиминации вирусных гепатитов к 2030 г. делает расширение доступа к тестированию и лечению HCV одним из приоритетов национальных программ здравоохранения [2,4].

В клинической практике первым этапом лабораторной диагностики, рекомендованным международными руководствами, является выявление антител к HCV с помощью серологических тестов, прежде всего иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) [4,5]. ELISA остаётся технологически доступным, сравнительно недорогим и масштабируемым методом для рутинных клинико-диагностических лабораторий и массовых скрининговых программ, включая обследование доноров крови и групп высокого риска [4,5].

Современные ELISA-наборы третьего поколения и их модификации используют комбинации рекомбинантных антигенов структурного белка core и неструктурных белков NS3, NS4 и NS5, что позволило существенно повысить аналитическую чувствительность, сократить *«серое окно»* сероконверсии и снизить частоту ложноотрицательных результатов по сравнению с тестами ранних поколений [6–9]. Сравнительные исследования коммерческих тест-систем демонстрируют, что именно состав антигенной панели (core + NS3/NS4/NS5), а также формат анализа (прямой, непрямой, «четвёртое поколение» с определением антигена core) во многом определяют диагностическую эффективность, но между наборами разных производителей сохраняются различия по чувствительности, специфичности и профилю перекрёстных реакций [6–9].



ISSN 3030-3907

При сопоставимой панели антигенов решающим фактором становится не только «химия» набора, но и параметры постановки ИФА: состав буфера для покрытия, условия адсорбции антигенов на полистирольной поверхности, выбор блокирующего и стабилизирующего буферов, температурно-временные режимы инкубаций и особенности обработки сывороточных образцов. Вариабельность этих параметров между лабораториями напрямую влияет на отношение сигнал/шум, коэффициенты вариации, частоту ложноположительных/ложноотрицательных результатов и, как следствие, на воспроизводимость и межлабораторную сопоставимость данных [4,5,14].

Отдельное направление развития серологической диагностики HCV связано с использованием хаотропных агентов (мочевина, гуанидин-HCl, тиоцианаты и др.) при нанесении антигенов или модификации стандартного ELISA (avidity-ELISA). Применение высоких концентраций мочевины (обычно 5–8 М) или гуанидина позволяет частично разворачивать белок, повышать доступность линейных эпитопов и дифференцировать высоко- и низкоавидные антитела, что показано в ряде работ на моделях вирусных и бактериальных антигенов [10–13]. Модифицированные ELISA- и мультиплекс-форматы с хаотропными агентами рассматриваются как функциональный инструмент углублённой характеристики гуморального ответа (оценка давности инфекции, качества поствакцинального иммунитета, различение острых и хронических форм) [10–13]. При этом оптимальный выбор типа и концентрации хаотропа, этапа его введения в протокол (на стадии покрытия, инкубации сыворотки или обработки уже сформированного комплекса «антиген–антитело»), а также сочетания с последующими шагами стабилизации покрытия остаётся недостаточно стандартизированным.

Наряду с хаотропными модификациями критическое значение имеют «базовые» технологические решения: выбор щелочного или нейтрального буфера для покрытия (карбонатный, фосфатный, Tris-буфер), типа и концентрации белковых блокаторов (обезжиренное молоко, очищенный казеин, сывороточный альбумин и др.), наличие или отсутствие поверхностно-активных веществ (Tween-20), а также стабилизирующих добавок (сахароза, трегалоза). Методические руководства по разработке ELISA подчёркивают, что эти параметры существенно влияют на плотность и однородность адсорбции антигена, уровень неспецифического фона, динамический диапазон калибровочной кривой и долговременную стабильность покрытых планшетов, но оптимальные решения для


ISSN 3030-3907

конкретной антигенной системы подбираются преимущественно эмпирически [10,14].

Для стран с развивающейся диагностической и фармацевтической индустрией приоритетной задачей становится создание отечественных ELISA-систем для серологической диагностики HCV, сопоставимых по характеристикам с ведущими коммерческими наборами третьего поколения [6–9]. Это требует не только выбора панели рекомбинантных антигенов, но и формулирования научно обоснованного «оптимального профиля» технологических параметров постановки ИФА, который обеспечивал бы высокую аналитическую чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов в условиях реальной лабораторной практики.

Цель настоящей работы — на основе комплексного экспертно-аналитического подхода и данных современной литературы сформировать рекомендации по оптимизации четырёх ключевых этапов постановки ELISA на антитела к HCV: (1) формуляции раствора для покрытия лунок антигенами с учётом денатурации и адсорбции; (2) условий иммобилизации антигенов на полистирольной поверхности (температура, время); (3) выбору буферов стабилизации и блокирования покрытия; (4) режимам первичной инкубации сыворотки, определяющим полноту связывания антител и устойчивость протокола к матричным эффектам.

**Материалы и методы**

Исследование выполнено как структурированный экспертно-аналитический обзор, направленный на формирование научно обоснованного «оптимального профиля» постановки ELISA для выявления антител к вирусу гепатита С (HCV) на основе совокупности опубликованных данных, методических руководств и инструкций к коммерческим наборам [4–9]. Исходной точкой служили четыре сравнительные таблицы, описывающие альтернативные решения для ключевых этапов протокола: (1) формуляция покрывающих буферов (карбонатные, боратные, Tris-системы с мочевиной, гуанидин-HCl, DTT/EDTA); (2) условия иммобилизации рекомбинантных антигенов HCV (core, NS3, NS4, NS5) на полистироле (2–8 °C, 4–18 ч; 20–25 °C, 1–18 ч; 37 °C, 1 ч); (3) блокирующие/стабилизирующие буферы (обезжиренное молоко, казеин, желатин, BSA ± сахара и Tween-20); (4) режимы первичной инкубации сыворотки (20–25 °C 1–2 ч; 37 °C 30–60 мин; 2–8 °C 18 ч). Для каждого варианта исходно были заданы интегральные балльные оценки (0–10), отражающие практический лабораторный опыт; задачей работы был их критический пересмотр с учётом современных представлений о биохимии взаимодействия «антиген–антитело», свойствах


ISSN 3030-3907

хаотропных агентов и требований к валидации серологических тест-систем [4,5,10–14].

Пересмотр баллов проводился на основе пяти групп источников: (1) рецензируемые публикации по разработке и сравнительной оценке ELISA-наборов для HCV и других вирусных инфекций (чувствительность, специфичность, коэффициенты вариации, влияние панели антигенов core/NS3/NS4/NS5) [6–9]; (2) работы по использованию мочевины, гуанидин-HCl и других хаотропных агентов в ELISA и avidity-ELISA, включая GuHCl-модифицированные форматы и исследования влияния концентрации хаотропа, температуры и времени экспозиции на сигнал и CV [10–13]; (3) методические руководства по разработке ELISA (Thermo Fisher/Pierce, KPL/SeraCare и др.), регламентирующие выбор покрывающих, блокирующих и стабилизирующих буферов, режимы инкубаций и подходы к снижению вариабельности [14]; (4) инструкции к коммерческим anti-HCV ELISA-наборам третьего поколения, одобренным для донорского и клинического скрининга, с анализом применяемых буферов, температур/времени иммобилизации и режимов инкубации сывороток [6–8]; (5) международные рекомендации по серологической диагностике HCV (ВОЗ и профильные экспертные группы), определяющие целевые параметры чувствительности, специфичности и воспроизводимости [4,5]. В анализ включались только источники, содержащие прямые экспериментальные или детальные технологические данные, позволяющие судить о влиянии конкретных параметров на диагностические характеристики теста.

Для всех вариантов, представленных в таблицах 1–4, применялся единый набор критериев: растворимость и степень денатурации антигенов, эффективность адсорбции на полистироле, отношение сигнал/шум, доступность линейных эпитопов, воспроизводимость (CV), технологические риски и удобство, стабильность покрытия при хранении и риск перекрёстных реакций [4–6,10–14]. Каждый вариант оценивали по шкале 0–10 по каждому критерию, после чего рассчитывали средневзвешенный интегральный показатель с повышенным весом для критериев, непосредственно влияющих на аналитическую чувствительность, специфичность и воспроизводимость («растворимость/денатурация», «сигнал/шум», CV, стабильность при хранении).

Пересмотр баллов проводился поэтапно: (1) сопоставление исходных оценок с данными литературы, методических руководств и инструкций к коммерческим наборам; варианты, совпадающие с параметрами валидированных тест-систем (например, покрытие в карбонатном буфере pH 9,6 с ночной инкубацией при 2–8 °C, блокирование молочно-казеиновыми


ISSN 3030-3907

буферами), получали повышенное «априорное» доверие [6–9,14]; (2) корректировка баллов при наличии явных противоречий с опубликованными данными (например, переоценка агрессивных гуанидин-содержащих формуляций с повышенным CV и риском десорбции антигена) [10–12]; (3) экспертная экстраполяция для комбинаций, по которым отсутствовали прямые сравнительные исследования, на основе общих закономерностей взаимодействия белков с полистироловой поверхностью и рекомендаций методических гидов [14]; (4) группировка вариантов в технологические кластеры («формуляции с мочевиной», «схемы с DTT/гуанидином», «молочно-казеиновые блокирующие буферы с дисахаридами», «BSA/желатин-системы», «быстрые» и «длительные» режимы иммобилизации и инкубации), что позволило оценивать не только отдельные решения, но и целые концепции с точки зрения их потенциала для внедрения в отечественные ELISA-системы на anti-HCV.

**Результаты**

Оптимальными формуляциями для адсорбции рекомбинантных HCV-антигенов на полистироле оказались щёлочные карбонатный и боратный буферы с 6–8 М мочевины. Наивысший интегральный балл (~9,3/10) показал карбонатный буфер pH 9,6 с 8 М мочевины (вариант A), обеспечивающий почти полное растворение антигенов, высокое отношение сигнал/шум и технологическую воспроизводимость. Боратный буфер pH 9,2 + 8 М мочевины (вариант B, ~9,1/10) был лишь незначительно хуже, оставаясь практически равноценной альтернативой. Карбонатный буфер с 6 М мочевины (вариант C, ~8,8/10) может рассматриваться как менее агрессивный компромисс. Tris-буфер с 4 М мочевины и DTT/EDTA (вариант D, ~8,0/10) показал худший профиль и не имеет достаточных литературных обоснований для этапа покрытия. Двухступенчатая схема с 6 М гуанидин-HCl (вариант E) эффективна по растворимости и экспозиции эпитопов, но ограничена токсичностью, повышенными рисками остаточного гуанидина и неудобством в рутинной диагностике. В качестве практического «золотого стандарта» предложен карбонатный буфер pH 9,6 с 6–8 М мочевины, согласующийся с протоколами наборов третьего поколения [15–17].

**Таблица 1.**

**Формуляции покрывающих растворов**

| Формуляция раствора для | Растворение антигена | Адсорбция на пластик | Сигнал-шум (позитивы) | Доступность лин. эпитопов | Воспроизво-димость (CV) | Риски и удобство | Итоговая оценка |
|---|---|---|---|---|---|---|---|



ISSN 3030-3907

| покрытия | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A)** Карбонат pH 9.6 + 8 M мочевина | 9.5 | 9.2 | 9.3 | 9.5 | 9.0 | 8.5 | 9.3 |
| **B)** Борат pH 9.2 + 8 M мочевина | 9.4 | 9.0 | 9.1 | 9.5 | 9.0 | 8.5 | 9.1 |
| **C)** Карбонат pH 9.6 + 6 M мочевина | 9.0 | 9.0 | 8.7 | 9.0 | 9.0 | 8.5 | 8.8 |
| **D)** Tris pH 9.0 + 4 M мочевина + EDTA/DTT | 7.5 | 7.8 | 8.0 | 7.5 | 8.2 | 9.0 | 8.0 |
| **E)** 6 M GuHCl (предобработка) → ~0.5 M GuHCl в лунке | 9.5 | 9.2 | 9.0 | 9.5 | 8.2 | 6.0 | 8.5 |

*Примечание:* A (8 M мочевина, pH 9.6) остаётся на первом месте как *наиболее результативная и надёжная формулировка* для иммобилизации антигенов HCV (итог ~9.3). Её преимущества: мочевина эффективно растворяет рекомбинантные белки HCV, обеспечивает их полное раскрытие и высокое связывание с пластиком. pH 9.6 – оптимален для адсорбции большинства белков.

Классическое ночное покрытие при 2–8 °C в течение 18 ч показало максимальную интегральную оценку (~9,4/10) за счёт практически полной адсорбции антигена и минимального фона. Ускоренный режим 2–8 °C, 4 ч


ISSN 3030-3907

(≈9,1/10) может использоваться как временной компромисс. Режим 37 °C, 1 ч после пересмотра данных и сопоставления с инструкциями Ortho® HCV ELISA 3.0 и других наборов третьего поколения был оценён в ~8,5–8,6/10 и признан рабочей альтернативой при строгом контроле температуры и предотвращении испарения. Комнатная температура (20–25 °C, 1–2 ч/18 ч) заняла промежуточные позиции (8,3–8,4/10) и допустима в условиях отсутствия термостатов. Таким образом, для практики рекомендуются две стратегии: ночное покрытие при 2–8 °C (референсный режим) и ускоренное покрытие при 37 °C, 1 ч (рутинный режим) [18–20].

**Таблица 2.**

**Условия иммобилизации антигенов**

| **Условия иммобилизации (покрытия)** | **Полнота адсорбции** | **Сигнал/шум** | **Однородность (CV)** | **Сохранность эпитопов** | **Контроль краевых эффектов** | **Риск артефактов (1-я инкубация)** | **Итоговая оценка** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Холодное покрытие (4°C):*** | | | | | | | |
| 2–8°C, 18 ч *(ночь, «стазис»)* | 9.4 | 9.3 | 9.2 | 9.5 | 9.4 | 9.2 | 9.4 |
| 2–8°C, 4 ч *(«быстрый холод»)* | 9.0 | 8.8 | 9.2 | 9.2 | 9.3 | 9.0 | 9.1 |
| ***Комнатная t° (22-25°C):*** | | | | | | | |
| *20–25°C, 1 ч (стандарт при отсутствии 37°C)* | 8.2 | 8.2 | 8.3 | 8.5 | 8.5 | 8.0 | 8.4 |
| 20–25°C, 2 ч *(увеличенное время)* | 8.7 | 8.2 | 8.5 | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.3 |
| 20–25°C, 18 ч *(ночь)* | 9.2 | 8.5 | 8.5 | 8.0 | 8.0 | 7.5 | 8.3 |



ISSN 3030-3907

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Тёплое покрытие (37°C):*** | | | | | | | |
| 37°C, 1 ч *(ускоренное, эталонное)* | 9.0 | 8.5 | 8.5 | 8.0 | 9.0 | 8.0 | 8.5 |

*Примечание:* Максимальные баллы (в диапазоне 9.0–9.5) свидетельствуют о близком к оптимальному результате по данному критерию. Лучшими, по суммарной оценке, остаются режимы с холодной адсорбцией: длительный при +4°C (≈9.4) и ускоренный при +4°C (≈9.1). Они обеспечивают практически полное связывание и сохранность антигена, минимальный фон и равномерность, однако требуют либо длительного времени, либо пониженной температуры.

Наиболее эффективными оказались составы, сочетающие белковый блокер (обезжиренное молоко) и дисахарид-стабилизатор (сахароза): варианты А и В дали интегральные оценки ~9,1–9,3/10, обеспечивая >90 % снижение неспецифического фона и хорошую стабильность планшетов при хранении. Вариант С (рыбий желатин + сахароза, ~8,8/10) несколько уступал по блокирующей способности, но предпочтителен в ситуациях, где критична минимальная перекрёстная реактивность с сыворотками млекопитающих. Системы без сахара (1,0 % молока или 1,0 % BSA + Tween-20; 6,8–6,9/10) показали худшую стабильность и более выраженную десорбцию антигена, что ограничивает их применимость разовыми постановками без длительного хранения. Добавление Tween-20 на стадии длительного хранения признано нежелательным из-за риска элюции антигена. В качестве практического стандарта предложены системы на основе низкоконцентрированного молока или казеина с 5 % сахарозы/трегалозы [21–23].

**Таблица 3.**

**Буферы стабилизации и блокирования покрытия**

| **Состав буфера стабилизации** | **Эффективность блокирования** | **Сохран. антигена** | **Сохран. эпитопов** | **Стабильность при хранении и подсушке** | **Риск перекрёстных реакций** | **Практичн. и стоимость** | **Итоговая оценка** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **А)** 0,175% обезжир. | 9.2 | 9.6 | 9.0 | 9.6 | 8.9 | 9.5 | **9.3** |



ISSN 3030-3907

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| молоко + 5% сахароза (эталон) | | | | | | | |
| **B)** 0,20% очищ. казеин + 5% трегалоза | 9.0 | 9.5 | 9.1 | 9.5 | 9.3 | 9.0 | **9.1** |
| **C)** 0,10% рыбий желатин + 5% сахароза | 8.6 | 9.1 | 8.8 | 9.1 | 9.1 | 8.4 | **8.8** |
| **D)** 1,0% обезжир. молоко (без сахара) | 8.7 | 8.0 | 8.1 | 6.8 | 8.5 | 9.7 | **8.2** |
| **E)** 1,0% BSA + 0,05% Tween-20 (без сахара) | 8.2 | 7.6 | 7.9 | 6.9 | 8.8 | 8.8 | **7.9** |

*Примечание:* для критериев более высокий балл означает лучший результат в плане подавления соответствующего нежелательного явления. Например, эффективность блокирования 9.2 у буфера А значит, что фон практически полностью подавлен (остаточный неспецифический сигнал очень низкий), а 7.6 у буфера Е – фон снижен слабо, наблюдается значительная доля неспецифического связывания.

Систематический анализ показал, что инкубация сывороток при 37 °C в течение 1 ч обладает оптимальным балансом между полнотой связывания антител, устойчивостью сигнала и удобством постановки (интегральная оценка ~9,1/10). Этот режим доминирует в инструкциях коммерческих анти-HCV ELISA третьего поколения и может считаться «эталонным». Ускоренный режим 37 °C, 30 мин (≈8,6/10) допустим для экспресс-панелей при обязательной отдельной валидации на клиническом материале.


ISSN 3030-3907

Комнатная температура (20–25 °C, 1–2 ч; ~8,3–8,4/10) может использоваться как альтернатива при отсутствии инкубаторов, но требует более жёсткого контроля качества. Длительная инкубация при 2–8 °C, 18 ч, несмотря на высокую полноту связывания, признана в большей степени исследовательским режимом из-за рисков артефактов и снижения воспроизводимости. В совокупности данные подтверждают, что для рутинного анти-HCV ИФА оптимальной является схема первичной инкубации сыворотки 37 °C, 1 ч в сочетании с валидированным разбавителем и герметично укрытыми планшетами [13,24–26].

**Таблица 4.**

**Условия первичной инкубации сыворотки**

| **Условия первичной инкубации** | **Полнота связывания** | **Сигнал/шум** | **Однородность (CV)** | **Контроль матричных артф. (↓)** | **Контроль краевых эфф.** | **Практичность** | **Итоговая оценка** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***При 37°C:*** | | | | | | | |
| 37°C, 1 ч *(стандартный протокол)* | 9.3 | 9.2 | 9.1 | 9.0 | 9.0 | 9.3 | 9.1 |
| 37°C, 30 мин *(ускоренный анализ)* | 8.5 | 8.5 | 8.2 | 8.5 | 9.0 | 9.0 | 8.6 |
| ***При комнатной t°:*** | | | | | | | |
| 20–25°C, 1 ч *(без термостата)* | 8.2 | 8.2 | 8.3 | 8.0 | 8.5 | 9.0 | 8.3 |
| 20–25°C, 2 ч *(увеличенная* | 8.7 | 8.3 | 8.5 | 8.0 | 8.0 | 8.5 | 8.3 |



ISSN 3030-3907

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *экспозиция)* | | | | | | | |
| ***При 4°C:*** | | | | | | | |
| 2–8°C, 18 ч *(ночная инкубация)* | 8.4 | 9.0 | 8.8 | 7.5 | 7.5 | 4.0 | 7.8 |

Примечание: режим 37°C, 1 ч выходит на первое место с суммарной оценкой ~9.1. Это соответствует общепринятой практике – практически все современные ИФА на антитела к HCV проводят первичную инкубацию при 37°C около часа. Этот режим обеспечивает почти полное связывание искомых антител и минимизирует матричные эффекты (ревматоидный фактор и др.), при этом укладывается в один рабочий день, что критично для лаборатории.

**Обсуждение**

Сформированный в работе «оптимальный профиль» постановки ИФА на anti-HCV в целом совпадает с логикой современных тест-систем третьего поколения, основанных на комбинации рекомбинантных антигенов core/NS3/NS4/NS5, нанесённых в денатурированном виде для максимальной экспозиции линейных эпитопов [10–12]. Покрытие из карбонатного буфера pH 9,6 с 6–8 М мочевины даёт рациональный баланс: растворение бактериально экспрессированных белков, разрушение агрегатов и раскрытие линейных эпитопов при сохранении достаточной иммунореактивности и устойчивой адсорбции на полистироле [13,14]. Гуанидин-HCl остаётся полезным инструментом для специализированных avidity-форматов, но с учётом токсичности и технологических рисков в рутинных тест-системах более оправдана стратегия с мочевиной как основным хаотропом [13,14].

Пересмотр оценок по температурным режимам показал, что покрытие при 37 °C в течение 1 ч и первичная инкубация сыворотки при 37 °C, 60 мин при корректной герметизации планшетов обеспечивают показатели сигнала/шума и CV, сопоставимые с классическими режимами 2–8 °C overnight, что согласуется с протоколами валидированных коммерческих наборов и методическими рекомендациями [7, 27,28]. Холодовые режимы остаются референсными для максимально щадящих условий, но в рутинной практике преимущество часто нивелируется логистическими издержками.

Ключевым элементом устойчивости тест-системы выступает сочетание белкового блокера (обезжиренное молоко, казеин, BSA) с дисахаридами (сахароза, трегалоза), создающее стекловидную матрицу при сушке и


ISSN 3030-3907

существенно повышающее стабильность покрытия при хранении. Наш анализ подтверждает, что казеин–трегалоза обеспечивает практически референсный уровень блокирования и стабильности при умеренном росте себестоимости, тогда как составы без сахаров нецелесообразно рассматривать как базовые для промышленных наборов длительного хранения. Tween-20 целесообразно ограничивать промывочными буферами и буферами разведения, избегая его включения в формулы длительного хранения покрытия [11].

С точки зрения кинетики взаимодействия «антиген–антитело» режим первичной инкубации сыворотки 37 °C, 1 ч остаётся оптимальным компромиссом между чувствительностью, стандартизируемостью и пропускной способностью и поддерживается международными рекомендациями [7,27,28]. Попытки «усилить» тест за счёт ночных инкубаций при 2–8 °C имеют смысл лишь в узко исследовательских сценариях (например, для специальных avidity-форматов) и не демонстрируют убедимого выигрыша для рутинного скрининга [13,14].

Практически предложенная многокритериальная балльная схема даёт разработчикам и верификационным лабораториям инструмент для рационального выбора технологических решений на основе совокупности критериев, а не отдельных показателей, и облегчает документирование финального протокола в досье тест-системы в логике требований ВОЗ и стандартов ISO/CLSI [27,28]. Основные ограничения подхода связаны с его экспертно-аналитическим характером и полуколичественной шкалой 0–10: полученные оценки требуют дальнейшей экспериментальной валидации на панелях клинических образцов и не подменяют формальной статистической оценки чувствительности, специфичности и воспроизводимости. Тем не менее предложенный профиль условий может служить реалистичной отправной точкой для проектирования и валидации отечественных ELISA-наборов для серологической диагностики HCV [10–12,27].

**Заключение**

1. *Растворы для покрытия.* Оптимальной формуляцией для нанесения рекомбинантных HCV-антигенов является карбонатный буфер pH 9,6 с 6–8 М мочевины; использование гуанидин-HCl целесообразно ограничить avidity-/модифицированными ELISA и не рекомендовать для рутинного скрининга.

2. *Иммобилизация антигенов.* Холодовое покрытие (2–8 °C, 18 ч) и ускоренный режим (37 °C, 1 ч) обеспечивают сопоставимое качество при надёжном контроле температуры и испарения; выбор режима определяется балансом между аналитическими требованиями и логистикой лаборатории.



ISSN 3030-3907

3. *Стабилизация покрытия.* Буферы на основе молока/казеина с дисахаридами (сахароза, трегалоза) являются оптимальными по сочетанию фона, стабильности и стоимости, тогда как составы без сахаров и с Tween-20 не обеспечивают достаточную стабильность при хранении планшетов.

4. *Первичная инкубация сыворотки.* Режим 37 °C, 1 ч оправдано рассматривается как «золотой стандарт» по чувствительности и воспроизводимости; длительные инкубации при 4 °C имеют смысл только в рамках специальных исследовательских протоколов.

5. *Методологический вывод.* Многофакторная балльная оценка элементов ELISA-протокола, опирающаяся на литературные данные и инструкции коммерческих наборов, позволяет формировать прозрачные, научно обоснованные рекомендации по оптимизации анти-HCV тест-систем и легко масштабируется на другие серологические методы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Hepatitis C. Fact sheet. Geneva: WHO; 2025.
2. World Health Organization. Global hepatitis report 2024: action for elimination. Geneva: WHO; 2024.
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Hepatitis C. In: Factsheet for health professionals. Stockholm: ECDC; 2024.
4. World Health Organization. Guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: WHO; 2017.
5. Hellard M.E., Fraser C., Cowie B. World Health Organization guidelines on testing for hepatitis B and C – meeting targets for testing. *BMC Infect Dis.* 2017;17:703.
6. Thakur V., Guptan R.C., Kazim S.N., et al. Low specificity of the third generation ELISA for HCV in a high prevalence population. *Indian J Med Res.* 2003;117:247–252.
7. Lakshmi V., Raju B., Sharma S., et al. Evaluation of commercially available third-generation anti-HCV ELISA test systems in India. *J Clin Lab Anal.* 2007;21(5):271–276.
8. Kheirabad A.K., Karami A., Dashti A.S., et al. Evaluation of a novel enzyme-linked immuno assay model to detect E2 antigen and antibodies against core, NS3, NS4, and NS5 antigens of hepatitis C virus. *Hepat Mon.* 2019;19(10):e106273.
9. Jiang X., Cao Y., Zhang Y., et al. A study based on four immunoassays: hepatitis C virus antibody against different antigens may have unequal contributions to detection. *Virol J.* 2021;18:248.
10. Dauner J.G., Pan Y., Hildesheim A., Kemp T.J. Development and application of a guanidine hydrochloride-modified ELISA to measure the avidity of anti-HPV


ISSN 3030-3907

L1 VLP antibodies in vaccinated individuals. *J Immunol Methods.* 2012;382(1–2):177–188.
11. Portilho A.I., Lopes C.R., Fukasawa L.O., et al. Study of avidity-ELISA: comparison of chaotropic agents, incubation temperature and affinity maturation after meningococcal immunization. *J Immunol Methods.* 2023;517:113067.
12. Taylor D.W., Melnic A., Raines A., et al. Measuring antibody avidity to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens using a multiplex immunoassay approach. *Malar J.* 2020;19:414.
13. Savvateeva E.N., Soboleva A.V., Fominykh E.S., et al. Microarray-based avidity assay for assessment of thyroid autoantibodies. *Diagnostics (Basel).* 2025;15(3):341.
14. Thermo Fisher Scientific / Pierce Biotechnology. ELISA Technical Guide and Protocols (Tech Tip #65, TR0065.0). Rockford, IL; ~2010.
15. Bio-Rad Laboratories. *Helpful ELISA Hints. Technical Guide for ELISA Development and Optimization.* Bio-Rad, Hercules, CA.
16. Thermo Fisher Scientific (Nunc). *Nunc-Immuno™ Microplates. Solid Phase Immunoassays Technical Guide.* Thermo Fisher Scientific.
17. Sigma-Aldrich. *Carbonate-Bicarbonate Buffer, pH 9.2–9.6 (Product C3041): Application as Coating Buffer in ELISA.* Sigma-Aldrich, Technical Data Sheet.
18. Correa V.A., Silva-Junior A., et al. Modified ELISA for antibody avidity evaluation – a review. *Microbial Pathogenesis.* 2020;147:104393.
19. Clavarino G., Gauthier A., Hellmark T., et al. Routinely used immunoassays do not detect circulating anti-GBM antibodies against native NC1 hexamer and EA epitope of the α3 chain of type IV collagen. *European Journal of Immunology.* 2018;48(6):1082–1084.
20. Jonsson O., Lundell A., Rosell J., et al. Comparison of sucrose and trehalose for protein stabilization using differential scanning calorimetry. *Journal of Physical Chemistry B.* 2024;128(20):4922–4930.
21. Richter S.M., Zellmer A., Rauch P. Stabilization of ELISA plates – technology comparison. CANDOR Bioscience, White Paper, 2020.
22. Wu Y. et al. Development and application of stabilizers for ELISA test kit. *International Journal of Laboratory Medicine.* 2014;35(12):2527–2528.
23. Ortho-Clinical Diagnostics. *Ortho HCV Version 3.0 ELISA Test System – Instructions for Use.* FDA Device Documentation, 2009.
24. Erba Mannheim. *ErbaLisa HCV Gen3 (v2) – Package Insert.* Erba Diagnostics, 2019.
25. Bio-Rad Laboratories. *Monolisa Anti-HCV PLUS Version 3 – ELISA kit, Package Insert.* Bio-Rad, 2013.


ISSN 3030-3907

26. Fonseca B.P.F., Marques C.F.S., Nascimento L.D., et al. Development of a multiplex bead-based assay for the detection of antibodies to hepatitis C virus. *Journal of Virological Methods.* 2011;175(1):55–61.
27. Prakash S., Shukla S., Ramakrishna E., et al. Comparison of third generation ELISA and conventional RT-nested PCR for the detection of HCV infection in hemodialysis patients. *J Appl Pharm Sci.* 2014;4(8):18–22.
28. Jiang X., Chang L., Yan Y., et al. A study based on four immunoassays: Hepatitis C virus antibody against different antigens may have unequal contributions to detection. *Virol J.* 2021;18:137. doi:10.1186/s12985-021-01608-x.


ISSN 3030-3907