

# Физико-Химическая И Регламентная Оптимизация Иммобилизации Рекомбинантных Антигенов Hcv На Полистироле В Ифа

Хаитбаев А.Х.<sup>1</sup>, Хамидов Ш.А.<sup>2</sup>, Садиқов И.И.<sup>2</sup>, Абдукаюмов А.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека, Ташкент, Узбекистан

<sup>2</sup> Институт ядерной физики АН РУз, Ташкент, Узбекистан

E-mail: polyphenol-10@yandex.ru

## Аннотация

Иммобилизация рекомбинантных антигенов HCV на полистироле является ключевым этапом твердофазного ИФА, определяющим аналитическое окно, фон и межсерийную воспроизводимость. Цель работы — научно обосновать выбор условий покрытия и стабилизации антигенного сорбента для анти-HCV ИФА на основе интеграции многофакторного физико-химического ранжирования и данных действующего производственного регламента набора «Рекомбинант-анти-ВГС-стрип». Исследование выполнено в аналитико-сопоставительном дизайне с применением MCDA для сравнения формуляций покрытия, режимов иммобилизации и блок-стабилизирующих систем; дополнительно проанализированы регламентированные характеристики тест-системы (антигенный состав, расчёт порога, критерии годности и нормативные показатели диагностической эффективности). Устойчивость выбора лидера оценивали вариацией весов критериев на  $\pm 20\%$ . Показано, что промышленный набор на основе антигенов NS3/NS4/NS5 и Core соответствует регламентным требованиям. В рамках модели наилучший интегральный профиль продемонстрировала формуляция А (карбонатный буфер pH 9,6 + 8 М мочевины; 9,30/10), сохранявшая 1-е место во всех сценариях устойчивости. Среди режимов иммобилизации лидировал холодовой режим 2–8 °С (~18 ч; 9,42/10), а среди блок-стабилизирующих систем — 0,175% обезжиренное молоко + 5% сахарозы (9,25/10) и 0,20% очищенный казеин + 5% трегалозы (9,06/10). Интеграция модельных и регламентных данных указывает на нормативно приемлемую работоспособность действующей технологии при наличии резерва модернизации на стадиях покрытия и стабилизации сухого сорбента; предложенный SOP следует рассматривать как научно обоснованный кандидат для последующей экспериментальной и серийной валидации.

**Ключевые слова:** HCV; ИФА; полистирол; иммобилизация белков; мочевины; карбамилирование; блокирование; стабилизация; производственный регламент; MCDA.

## Abstract

Immobilization of recombinant HCV antigens on polystyrene is a critical step in solid-phase ELISA, as it determines the analytical window, background signal, and inter-batch reproducibility. This study aimed to scientifically substantiate coating and stabilization conditions for an anti-HCV ELISA antigen sorbent by integrating multi-factor physicochemical ranking with the current manufacturing regulation for the “Recombinant-anti-HCV-Strip” kit. An analytical comparative design was employed. In the first block, a multi-criteria decision analysis (MCDA) model was used to compare five coating formulations, five immobilization regimes, and five blocking/stabilizing systems. In the second block, regulated kit specifications were analyzed, including antigen composition, cut-off calculation, run acceptance criteria, and normative diagnostic performance metrics. Ranking robustness was assessed by varying criterion weights by  $\pm 20\%$ . The industrial kit based on



NS3/NS4/NS5 and Core antigens was consistent with regulatory performance requirements. Within the applied model, Formulation A (carbonate buffer, pH 9.6, with 8 M urea; 9.30/10) showed the best overall profile and retained first rank across all robustness scenarios. The leading immobilization regime was overnight cold coating at 2–8 °C (~18 h; 9.42/10). The top blocking/stabilization systems were 0.175% non-fat milk + 5% sucrose (9.25/10) and 0.20% purified casein + 5% trehalose (9.06/10). Integrating model-based and regulatory evidence indicates that the current process meets normative functionality while retaining a rational modernization reserve at the coating and dry-sorbent stabilization stages. The proposed SOP should be considered a scientifically justified candidate for subsequent experimental and batch-level validation.

**Keywords:** HCV; ELISA; polystyrene; protein immobilization; urea; carbamylation; blocking; stabilization; manufacturing regulation; MCDA.

### Введение

Твердофазный иммуноферментный анализ остаётся одним из ключевых инструментов лабораторного скрининга антител к вирусу гепатита С, особенно в условиях массового обследования, донорского контроля и ограниченных ресурсов лабораторной инфраструктуры [1, 2, 9–15]. Надёжность ИФА определяется не только качеством рекомбинантных антигенов, конъюгата и субстратной системы, но и стабильностью стадии покрытия: пассивная сорбция белка на полистироле формирует аналитическое окно и одновременно определяет величину полезного сигнала и уровень неспецифического связывания.

Для антигенов HCV задача покрытия особенно чувствительна к составу буфера и режиму иммобилизации. Полипептиды NS3, NS4, NS5 и Core/NC34ab содержат участки повышенной гидрофобности, склонны к частичной самоассоциации и в ряде диагностических дизайнов требуют контролируемого раскрытия структуры для экспонирования линейных эпитопов [9–12, 19]. Использование мочевины и других хаотропных агентов способно повышать сольubilization и доступность антигенных детерминант, однако при щелочном pH одновременно возникает риск карбамилрования белков вследствие образования цианата [4, 5, 18].

Оптимизация условий покрытия приобретает практическую ценность лишь тогда, когда модельные решения сопоставляются с реально действующим производственным процессом. Поэтому в настоящей работе результаты MCDA проанализированы совместно с параметрами и критериями качества промышленной тест-системы «Рекомбинант-анти-ВГС-стрип», зафиксированными в производственном регламенте [20]. Такой подход позволяет оценивать физико-химические решения не изолированно, а в контексте диагностических требований, технологических ограничений и показателей годности готового набора.

Цель работы — сформировать научно обоснованную модель оптимизации иммобилизации рекомбинантных антигенов HCV на полистирольных планшетах ИФА, увязав результаты физико-химического ранжирования с данными производственного регламента, нормативными показателями качества и технологическими ограничениями промышленного набора.

Научная новизна исследования состоит в объединении в едином аналитическом контуре многофакторной физико-химической модели выбора условий покрытия, регламентированных показателей качества действующей тест-системы и вычислительной оценки устойчивости ранжирования альтернатив. Практическая значимость работы заключается в формировании технологически интерпретируемого SOP-контура покрытия и стабилизации антигенного сорбента с выделением критических контрольных точек, применимых при ревизии производственного процесса и планировании последующей экспериментальной валидации.



### Материалы и методы

Исследование носило аналитико-сопоставительный характер и включало два взаимодополняющих блока. Первый блок представлял собой модель многокритериального анализа решений (MCDA) для ранжирования формуляций покрытия, режимов иммобилизации и блок-стабилизирующих систем. Второй блок включал анализ производственного регламента набора «Рекомбинант-анти-ВГС-стрип» как источника нормативно подтверждённых производственных и диагностических показателей [20]. Прямая экспериментальная постановка на серийных панелях сывороток в данную работу не входила; следовательно, представленные интегральные оценки следует интерпретировать как аналитически обоснованные сравнительные показатели, предназначенные для выбора приоритетных направлений последующей лабораторной валидации.

Объектом исследования являлась твердофазная иммобилизация рекомбинантных антигенов HCV (NS3/NS4/NS5 и Core/NC34ab) на полистирольных планшетах высокой сорбционной способности. Предметом исследования служило влияние состава буфера покрытия, температурно-временного режима иммобилизации и состава блок-стабилизаторов на совокупность целевых критериев: растворимость антигенов, эффективность адсорбции, отношение сигнал/шум, сохранность линейных эпитопов, однородность покрытия, стабильность при подсушке и воспроизводимость результата.

В модели сравнивали пять формуляций покрытия (А–Е): карбонатные, боратные и Tris-системы с 4–8 М мочевины, а также двухэтапную схему с предварительной солюбилизацией в 6 М гуанидин-хлориде. Отдельно анализировали пять температурно-временных сценариев иммобилизации (2–8 °С/18 ч; 2–8 °С/4 ч; 20–25 °С/2 ч; 20–25 °С/18 ч; 37 °С/1 ч) и пять блок-стабилизирующих систем на основе обезжиренного молока, очищенного казеина, рыбного желатина, сахарозы и трегалозы.

Композитный балл для формуляций покрытия рассчитывали как сумму произведений «оценка × вес» по следующим критериям: солюбилизация — 0,25; адсорбция — 0,25; сигнал/шум — 0,20; доступность линейных эпитопов — 0,15; воспроизводимость — 0,10; риски и удобство работы — 0,05. Для режимов иммобилизации и блок-стабилизирующих систем использовали согласованные наборы критериев, включавшие полноту сорбции, контроль крайовых эффектов, сохранность эпитопов, стабильность при хранении и практичность. Анализ устойчивости ранжирования формуляций покрытия выполняли методом многократного случайного варьирования весов критериев в пределах  $\pm 20\%$  с последующей нормировкой суммы весов к 1; общее число вычислительных сценариев составило 200 000.

Регламентированные параметры использовали как технологические и аналитические граничные условия. Из производственного регламента были извлечены состав диагностического набора, антигенный профиль сорбента, алгоритм подготовки рабочих растворов, объёмы внесения реагентов, режимы инкубации, критерии годности постановки, формула расчёта порогового значения (cut-off), а также нормативные значения диагностической чувствительности и специфичности [20]. При наличии редакционных расхождений между краткой биологической схемой и детализированным описанием технологического процесса приоритет отдавали разделам, содержащим пошаговый алгоритм изготовления и критерии внутрилабораторного контроля качества.

### Результаты

#### 1. Нормативно-производственный профиль тест-системы

Анализ производственного регламента показал, что промышленный набор «Рекомбинант-анти-ВГС-стрип» построен на антигенной комбинации NS3/NS4/NS5 и Core, предназначен для 96 определений и включает полный набор реагентов, необходимых для



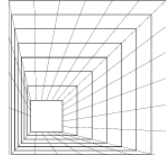
постановки анализа: контрольные сыворотки, концентрат конъюгата, буфер для промывки, растворы для разведения сывороток и конъюгата, субстратную ТМБ-систему и стоп-реагент [20]. Это позволяет оценивать оптимизацию покрытия не изолированно, а как часть завершённой диагностической платформы.

Согласно регламенту, набор обеспечивает диагностическую чувствительность не ниже 97% и специфичность не ниже 97%; для стандартной панели АТ(+/-) ВГС указаны 100% чувствительность и 100% специфичность, тогда как для референс-негативной панели — 97,2% специфичность [20]. Следовательно, действующий производственный процесс уже обеспечивает клинически приемлемый результат, однако сами нормативные показатели не раскрывают, насколько эффективно реализована стадия покрытия и существует ли резерв её дальнейшей физико-химической модернизации.

Важной опорной точкой для сравнительного анализа стали критерии валидности постановки реакции. В разных разделах регламентирующих материалов для положительного контроля фигурирует нижний предел 0,50–0,60 о.е.; для отрицательного контроля предел стабилен и составляет не более 0,20 о.е. [20]. С практической точки зрения это означает, что любая оптимизация покрытия и блокирования должна одновременно обеспечивать низкий фон, уверенный положительный сигнал и достаточный запас относительно порогового значения.

**Таблица 1.** Регламентированные характеристики промышленного набора «Рекомбинант-анти-ВГС-стрип», использованные как граничные условия анализа.

Параметр	Значение по регламенту	Аналитическое значение для настоящей работы
Антигенный состав сорбента	Рекомбинантные полипептиды NS3/NS4/NS5 и Core HCV	Определяет целевой набор эпитопов и ограничивает выбор буферов покрытия
Формат набора	96-луночный стрипированный планшет (12×8)	Требует контроля крайовых эффектов и стабильности между стрипами
Диагностическая чувствительность	≥97%; 100% относительно панели «Стандарт АТ(+/-) ВГС» и референс-положительной панели	Использована как минимально допустимый целевой уровень итоговой системы
Диагностическая специфичность	≥97%; 100% относительно стандартной панели и 97,2% относительно референс-негативной панели	Использована как ограничение при выборе блокирующих систем
Критерии валидности реакции	ОПср К- ≤ 0,20 о.е.; ОП К+ ≥ 0,50–0,60 о.е.	Нормативное окно для оценки фона и полезного сигнала
Алгоритм cut-off	ОПкр = ОПср К- + 0,15	Использован как ориентир для допустимого уровня фона
Регламент покрытия	0,1 мл смеси антигенов в карбонатно-бикарбонатном буфере; инкубация 18–20 ч	Служит базой для сопоставления с альтернативными режимами
Регламент блокирования	Двухэтапная «забивка»: желатин в PBS-T + сахара/лактоза	Подтверждает значимость сахар-содержащей



		стабилизации сухого сорбента
Измерение ОП	450 нм или 450/620 нм	Соответствует стандартному режиму оценки конечной реакции

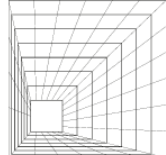
## 2. Сравнение формуляций покрытия А–Е

Наибольший композитный балл среди анализируемых формуляций покрытия показал вариант А — карбонатный буфер рН 9,6 с 8 М мочевины (9,30/10). Близкие, но более низкие значения были получены для формуляции С (боратный буфер рН 9,2 + 8 М мочевины; 8,92/10) и формуляции В (карбонатный буфер рН 9,6 + 6 М мочевины; 8,80/10). Формуляция D на основе Tris-буфера с 4 М мочевины уступала по растворимости и уровню сигнала, тогда как двухэтапная схема E с  $\text{CuHCl}$  проигрывала по адсорбции и технологической устойчивости при последующей подсушке.

Разрыв между лидирующей формуляцией А и ближайшим конкурентом С составил 0,38 балла, а между А и В — 0,50 балла. Следовательно, преимущество карбонат-уреа варианта является выраженным, но не абсолютным; это важно для корректной интерпретации результатов и указывает на необходимость последующей лабораторной проверки именно тех преимуществ, которые модель связывает с лучшей сольюбилизацией и более высокой доступностью линейных эпитопов.

**Таблица 2.** Формуляции покрытия антигенов HCV и интегральные оценки по критериям качества (0–10).

№	Состав (буферные условия)	Сольюбилизация	Адсорбция	Сигнал /шум	Доступность эпитопов	Воспроизводимость	Риски/удобство	Итоговая оценка
1	А) Карбонатный буфер рН 9,6 + 8 М мочевины	9,5	9,2	9,3	9,6	9,0	8,5	9,30
2	С) Боратный буфер рН 9,2 + 8 М мочевины	9,2	8,8	8,9	9,1	8,6	8,3	8,92
3	В) Карбонатный буфер рН 9,6 + 6 М	8,5	9,0	8,7	9,0	8,8	9,0	8,80



	мочевин ы							
4	E) 6 M GuHCl → разведен ие до ~0,5 M + карбона тный буфер pH 9,6	9,0	8,2	8,4	9,2	8,0	7,5	8,54
5	D) Tris- буфер pH 9,0 + 4 M мочевин ы (+EDTA /DTT)	7,5	7,8	8,0	8,5	8,2	9,1	7,98

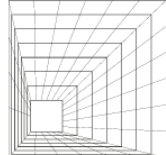
### 3. Устойчивость ранжирования формуляций покрытия

Чтобы оценить, не является ли лидерство формуляции А следствием «тонкой настройки» весов критериев, был выполнен вычислительный анализ устойчивости ранжирования при независимой вариации каждого веса на  $\pm 20\%$  с последующей нормировкой суммы весов к единице. Расчёт выполняли по исходной матрице критериев для формуляций покрытия.

Показано, что формуляция А сохраняла первое место во всех 200 000 вычислительных сценариев. Во всех случаях второе место занимала формуляция С, а минимальный отрыв А от ближайшего конкурента составил 0,369 композитного балла. Таким образом, лидерство А не зависит от малых колебаний весов критериев и отражает её доминирование по наиболее нагруженным показателям — солибилизации, отношению сигнал/шум и доступности линейных эпитопов.

**Таблица 3.** Вычислительная устойчивость ранжирования формуляций покрытия при вариации весов критериев на  $\pm 20\%$ .

Показатель устойчивости ранжирования формуляций покрытия	Значение
Базовый лидер при исходных весах критериев	Формуляция А (9,30/10)
Число вычислительных сценариев при вариации весов $\pm 20\%$	200 000
Доля сценариев, в которых А сохраняла 1-е место	100,0%
Доля сценариев с парой лидеров А/С на 1–2 местах	100,0%
Минимальный отрыв А от С по композитному баллу	0,369
Минимальный отрыв А от В по композитному баллу	0,446



#### 4. Оптимизация режима иммобилизации

Наиболее высокий интегральный балл среди температурно-временных сценариев иммобилизации продемонстрировал холодовой режим 2–8 °С в течение ~18 ч (9,42/10). Быстрый холодовой режим 2–8 °С/4 ч также оставался сильной альтернативой (8,92/10), тогда как ускоренные режимы при комнатной температуре и особенно при 37 °С последовательно уступали по критериям однородности покрытия, контролю крайовых эффектов и риску химических артефактов.

Особый интерес представляет сопоставление этих результатов с производственным регламентом. В детализированном описании технологического процесса промышленного набора указана инкубация планшета после нанесения смеси антигенов в течение 18–20 ч при 37 °С [20], тогда как сокращённая биологическая схема того же документа содержит указание на 18–20 ч при 20 °С. Наличие редакционной неоднородности не позволяет считать температурный режим однозначно стандартизованным на уровне краткого описания документа и, тем самым, дополнительно повышает ценность модельного анализа: более мягкий холодовой режим выглядит предпочтительным как с точки зрения однородности покрытия, так и с точки зрения минимизации побочных химических процессов.

**Таблица 4.** Режимы иммобилизации (температура/время) и композитные оценки (0–10).

Условия иммобилизации	Полнота адсорбции	Сигнал/шум	Однородность (CV)	Сохранность эпитопов	Контроль края	Риск артефактов	Итоговая оценка
2–8 °С, 18 ч (эталон)	9,4	9,3	9,5	9,6	9,4	9,2	9,42
2–8 °С, 4 ч (быстрый холод)	8,8	8,6	9,0	9,2	9,1	9,0	8,92
20–25 °С, 2 ч	8,5	8,2	8,0	8,1	7,8	7,6	8,12
20–25 °С, 18 ч	8,9	8,4	8,3	7,5	7,0	6,5	8,01
37 °С, 1 ч	8,6	8,0	7,6	7,2	6,8	6,2	7,63

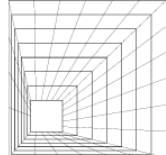
#### 5. Блокирование и стабилизация сухого сорбента

Лидирующей блок-стабилизирующей системой стала комбинация 0,175% обезжиренного молока с 5% сахарозы (9,25/10). Практически сопоставимый результат был получен для 0,20% очищенного казеина + 5% трегалозы (9,06/10). Варианты без сахаров систематически снижали стабильность при хранении и подсушке; комбинация BSA + Tween-20 имела наименьший балл (7,90/10) вследствие роста риска фона и снижения стабильности.

Сопоставление с регламентом показало, что в действующей промышленной технологии принцип сахар-содержащей стабилизации уже частично реализован: после основного блокирования в технологический контур введены сахароза и лактоза. Тем самым регламент косвенно подтверждает корректность концепции «стеклообразной» матрицы при подсушке, а MCDA-модель уточняет, какие белковые основы выглядят наиболее перспективными.

**Таблица 5.** Блокирующие/стабилизирующие системы и композитные оценки (0–10).

Состав системы	Блокирование	Сохранность	Сохранность	Стабильность при	Риск перекрытия	Практичность/стоимость	Итоговая

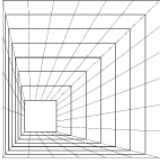


		антиген а	эпитопо в	хранени и	стных реакций		оценк а
0,175% обезжир енное молоко + 5% сахароз ы	9,2	9,3	9,0	9,6	8,9	9,5	9,25
0,20% очищен ный казеин + 5% трегалоз ы	9,0	9,0	9,1	9,3	9,2	8,6	9,06
0,10% рыбный желатин + 5% сахароз ы	8,6	8,7	8,8	9,1	9,1	8,4	8,79
1,0% обезжир енное молоко без сахаров	8,7	8,0	8,1	6,8	8,5	9,7	8,15
1,0% BSA + 0,05% Tween- 20 без сахаров	8,2	7,6	7,9	6,9	8,8	8,8	7,90

#### 6. Сопоставление действующего регламента и оптимизированного SOP

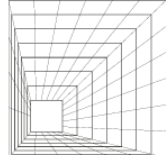
Сравнительный анализ показал, что регламентированная промышленная технология и модельно оптимизированный сценарий не находятся в противоречии по конечной цели, но различаются по физико-химической стратегии её достижения. Регламент отражает технологию, доказавшую клиническую работоспособность, тогда как модель показывает резерв модернизации на уровне солиubilизации антигенов, температурного режима покрытия и стабилизации сухого сорбента.

Для целей технологической ревизии принципиально важно не просто указать на «лидирующий вариант», а показать, какие именно параметры могут быть изменены, какого эффекта ожидают от этих изменений и какие риски следует контролировать на этапе внедрения. Такая постановка повышает научную и производственную применимость результатов и переводит обсуждение из плоскости формального ранжирования в плоскость управляемой модернизации процесса.



**Таблица 6.** Сопоставление действующей регламентной технологии и предложенного обновления SOP покрытия/стабилизации.

Параметр	Действующее условие по регламенту	Предлагаемое условие	Ожидаемый эффект	Риск внедрения	Что валидировать дополнительно
Буфер покрытия	Карбонатно-бикарбонатный буфер pH около 9,2; chaotrope не указан	Карбонат pH 9,6 + 8 М мочевины (А) или карбонат pH 9,6 + 6 М мочевины (В) как более мягкая альтернатива	Рост солюбилизации и доступности линейных эпителиальных клеток; расширение аналитического окна	Карбамилирование при щелочном pH и длительном контакте с мочевиной	OD/S/CO на панелях, межсерийный CV, стабильность сорбента, доля ложноположительных результатов
Режим покрытия	Инкубация 18–20 ч; в документах присутствуют редакционные расхождения по температуре	Холодовой режим 2–8 °С, ~18 ч	Снижение химических артефактов, испарения и крайовых эффектов; рост однородности	Удлинение производственного цикла; требования к холодильной дисциплине	Междневной CV, однородность по планшету, устойчивость партии
Блокирование/стабилизация	Желатин/PBS-T с последующим введением сахарозы и лактозы	Низкобелковый блок + 5% сахароза или 5% трегалоза	Снижение неспецифического связывания и повышение стабильности при подсушке/хранении	Матрикс-эффект блокатора на фоне и перекрестной реактивности	Специфичность на негативных и перекрестно-реагирующих панелях; дрейф фона при хранении
Критерии годности реакции	ОП <sub>ср К-</sub> ≤ 0,20; ОП <sub>ср К+</sub> ≥ 0,50–0,60; ОП <sub>ср</sub> =	Сохраняются без изменения как жёсткий	Сопоставимость модернизированного	Выход за gate означает смену теста,	Подтверждение критериев годности на каждой серии и каждой



	ОПср К- + 0,15	gate качества	процесса с регламентом	а не его улучшение	модификации SOP
--	-------------------	------------------	---------------------------	-----------------------	--------------------

### Обсуждение

Интеграция модельных и регламентных данных принципиально меняет интерпретацию результатов. Если рассматривать только композитные баллы MCDA, можно прийти к чрезмерно прямолинейному выводу о наличии уже готовой «оптимальной технологии». Однако привязка к регламенту показывает иную картину: действующая промышленная система уже соответствует нормативным требованиям по диагностической эффективности, а модельно оптимизированный контур следует интерпретировать как научно обоснованный резерв модернизации, а не как замену клинически подтверждённой технологии.

Лидерство формуляции А (карбонатный буфер pH 9,6 + 8 М мочевины) согласуется с фундаментальными представлениями о сорбции белков на полистироле: умеренно щелочной pH способствует адсорбции, а высокая концентрация мочевины повышает сольubilизацию и уменьшает агрегацию рекомбинантных антигенов. Именно по этой причине А обходит формуляцию В, несмотря на близость карбонатной основы: снижение концентрации мочевины с 8 до 6 М уменьшает потенциал раскрытия белка и экспозиции линейных эпитопов. Формуляция С остаётся сильным конкурентом, однако по сумме критериев уступает карбонатной системе по адсорбции и воспроизводимости.

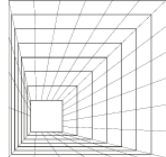
Двухэтапный  $\text{GuHCl}$ -вариант Е показал хорошую сольubilизацию, но проиграл на стадии последующей сорбции и подсушки. Вероятно, причина состоит в том, что предварительная денатурация в гуанидин-хлориде не даёт эквивалентного выигрыша в формировании стабильного антигенного слоя на полистироле и создаёт дополнительные технологические сложности. Tris-система D, напротив, выглядит удобной в обращении, но уступает по ключевым аналитическим критериям, что ограничивает её практическую ценность в условиях задачи.

Отдельного внимания заслуживает управление риском карбамилрования в щелочной мочеvine. Распад мочевины с образованием цианата способен приводить к модификации N-концов и  $\epsilon$ -аминогрупп лизина, что потенциально влияет на конформацию антигенов, сохранность эпитопов и воспроизводимость покрытия [4, 5, 18]. Следовательно, преимущество формуляции А может быть реализовано только при соблюдении технологических мер контроля: использовании свежеприготовленных и охлаждённых растворов мочевины, сокращении времени контакта белка с щелочной мочевиной средой до нанесения на планшет, применении деионизованной мочевины и, при необходимости, аммонийсодержащих ловушек цианата.

Преимущество холодого режима 2–8 °C в течение ~18 ч представляется физико-химически и технологически обоснованным. Низкая температура замедляет побочные химические процессы, снижает испарение по периферии планшета и уменьшает выраженность крайовых эффектов. Именно поэтому быстрый холодого режим 2–8 °C/4 ч можно рассматривать как резервный, но не основной: он сохраняет часть преимуществ низкой температуры, однако уступает по полноте сорбции и стабильности антигенного слоя.

Результаты по блок-стабилизации подтверждают практическую ценность сахарсодержащих систем. Добавление сахарозы или трегалозы повышает вероятность формирования защитной стеклообразной матрицы при подсушке и тем самым способствует сохранению иммунореактивности сухо иммобилизованных белков [6–8, 16, 17]. Это хорошо согласуется с тем фактом, что регламентированная технология уже содержит сахарный компонент на стадии стабилизации, хотя использует иной белковый блок.

Ограничением настоящей работы является отсутствие прямой экспериментальной верификации предложенного SOP на репрезентативных панелях сывороток с расчётом



диагностической чувствительности, специфичности, внутрисерийной и межсерийной вариации, а также доли ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Соответственно, статья должна рассматриваться как аналитико-технологическое исследование, формирующее научную основу для последующей лабораторной и серийной валидации, но не заменяющее её.

#### Заключение

Производственный регламент набора «Рекомбинант-анти-ВГС-стрип» подтверждает, что тест-система на основе антигенов NS3/NS4/NS5 и Core обладает нормативно приемлемыми диагностическими характеристиками и формирует устойчивую точку отсчёта для оценки любых модификаций технологического процесса.

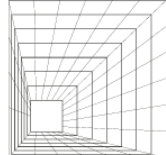
Наиболее предпочтительной в рамках применённой модели и регламентных ограничений является формуляция покрытия А (карбонатный буфер pH 9,6 + 8 М мочевины), а наиболее перспективным режимом иммобилизации — холодовой режим 2–8 °С в течение около 18 ч. Для блока-стабилизации наилучший интегральный профиль показали системы 0,175% обезжиренного молока + 5% сахарозы и 0,20% очищенного казеина + 5% трегалозы.

Вычислительный анализ устойчивости ранжирования показал, что лидерство формуляции А не зависит от умеренных вариаций весов критериев, что усиливает доверие к МСДА-результатам и подтверждает их технологическую состоятельность.

Предлагаемый SOP следует рассматривать как научно и технологически обоснованный кандидат для последующей экспериментальной валидации на панелях сывороток, а также для ревизии серийного производственного процесса с контролем фона, аналитического окна, межсерийной воспроизводимости и стабильности сухого сорбента.

#### Список литературы

1. Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871–874. doi:10.1016/0019-2791(71)90454-X.
2. Butler J.E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *J Immunol Methods*. 1992;150(1–2):77–90. doi:10.1016/0022-1759(92)90066-3.
3. Gardas A., Lewartowska A. Coating of proteins to polystyrene ELISA plates in the presence of detergents. *J Immunol Methods*. 1988;106(2):251–255. doi:10.1016/0022-1759(88)90137-0.
4. Sun S., Zhou J.-Y., Yang W., Zhang H. Inhibition of protein carbamylation in urea solution using ammonium-containing buffers. *Anal Biochem*. 2014;446:76–81. doi:10.1016/j.ab.2013.10.024.
5. You Y., Many G., Nakayasu E.S. Protein carbamylation and proteomics: from artifacts to elucidation of biological functions. *Front Anal Sci*. 2024;4:1512573. doi:10.3389/frans.2024.1512573.
6. Nguyen V., Leclerc N., Wolff C.M., Kennel P., Fonteneau P., Deyes R., Warter J.-M., Poindron P. Protection of immunoreactivity of dry immobilized proteins on microtitration plates in ELISA: application for detection of autoantibodies in myasthenia gravis. *J Biotechnol*. 1999;72(1–2):115–125. doi:10.1016/S0168-1656(99)00099-1.
7. Choi H.J., Bondy B.J., Yoo D.G., Compans R.W., Kang S.M., Prausnitz M.R. Stability of influenza vaccine coated onto microneedles. *Biomaterials*. 2012;33(14):3756–3769. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.054.
8. Kanojia G., Raeven R.H.M., van Riet E., et al. The evaluation of spray and freeze-drying for production of stable virus-like particles as vaccine ingredients. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163109. doi:10.1371/journal.pone.0163109.
9. Barrera J.M., Francis B., Ercilla G., et al. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang*. 1995;68(1):15–20. doi:10.1111/j.1423-0410.1995.tb02538.x.



10. Chien D.Y., Choo Q.L., Ralston R., et al. Diagnosis of hepatitis C virus infection using an immunodominant chimeric polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10011–10015. doi:10.1073/pnas.89.21.10011.
11. 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(1):137. doi:10.1186/s12985-021-01608-x.
12. Warkad S.D., Nimse S.B., Song K.-S., et al. HCV screening: antigen and antibody detection technologies. *Sensors (Basel).* 2019;19(19):4257. doi:10.3390/s19194257.
13. Kesli R., Goksugur S.B., Karabay O., Terzi Y. Evaluation and comparison of three anti-HCV screening tests in blood donors. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1420–1429. doi:10.1177/147323000903700516.
14. Thakur V., Guptan R.C., Arankalle V.A., Sarin S.K. Low specificity of the third generation ELISA for HCV detection in voluntary blood donors in India. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(2):172–176. doi:10.1046/j.1440-1746.2003.02927.x.
15. Zilouchian H., Faqah O., Kabir M.A., et al. Current and future diagnostics for hepatitis C virus infection. *Chemosensors.* 2025;13(2):31. doi:10.3390/chemosensors13020031.
16. Ramachandran S., Fu E., Lutz B., Yager P. Long-term dry storage of an enzyme-based reagent system for ELISA in point-of-care devices. *Analyst.* 2014;139(7):1456–1462. doi:10.1039/C3AN02098G.
17. Li J., Wang H., Wang L., Yu D., Zhang X. Stabilization effects of saccharides in protein formulations: a review of sucrose, trehalose, cyclodextrins and dextrans. *Eur J Pharm Sci.* 2024;192:106625. doi:10.1016/j.ejps.2023.106625.
18. Gorisse L., Pietrement C., Vuiblet V., et al. Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(5):1191–1196. doi:10.1073/pnas.1517096113.
19. Kheirabad A.K., Khoshnoodi J., et al. Evaluation of a novel ELISA model to detect E2 antigen and antibodies against core, NS3, NS4 and NS5 antigens of HCV. *Hepat Mon.* 2020;20(9):e106273. doi:10.5812/hepatmon.106273.
20. Регламент производства на набор реагентов для определения антител к вирусу гепатита С методом иммуноферментного анализа («Рекомбинант-анти-ВГС-стрип»). ПР 42Уз-03873/Кст 64.–05957850–2023; ГП «Радиопрепарат», Институт ядерной физики АН РУз; 2013.