ПОЛИТЕХ
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

На правах рукописи

Мороз Анна Сергеевна

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ВИРУСОВ ГЕПАТИТОВ *B* И *C* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИНЦИПОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДИЗАЙНА И ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Научный руководитель:

Аронова Екатерина Борисовна, кандидат технических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Лиознов Дмитрий Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, директор федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Останкова Юлия Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «29» сентября 2026 года в 14:00 на заседании диссертационного совета У.1.5.6.15 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 194021, г. Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, д. 48, ауд. 318.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 195251, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Академическое, ул. Политехническая, д. 29, литера Б и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ» www.spbstu.ru.

Автореферат разослан «_____» июля 2026 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета У.1.5.6.15
кандидат технических наук, доцент  Аронова Екатерина Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время вирусным гепатитом В (вызывается вирусом гепатита В – *HBV*) или вирусным гепатитом С (вызывается вирусом гепатита С – *HCV*) болеют около 325 миллионов человек во всем мире, из которых ежегодно умирает более 1,5 миллиона человек. По уровню смертности вирусные гепатиты занимают второе место в списке инфекционных болезней, уступая лишь туберкулёзу. Число инфицированных вирусными гепатитами людей по всему миру в 9 раз превышает количество ВИЧ-инфицированных. При этом более 80% больных вирусными гепатитами не имеют доступа к средствам диагностики, профилактики и лечения [Юсупов Ш.Р. и др., 2023]. Для привлечения внимания к проблеме, ежегодно во всём мире 28 июля отмечают Всемирный день борьбы с гепатитом, который позволяет повысить осведомлённость людей о методах диагностики и профилактики заболеваний.

Россия занимает пятое место в мире по числу инфицированных вирусным гепатитом С (ВГС), и для снижения этого показателя на территории Российской Федерации действует Распоряжение Правительства РФ от 2 ноября 2022 г. № 3306-р «Об утверждении плана мероприятий по борьбе с хроническим вирусным гепатитом С на территории РФ в период до 2030 г.». Утверждённый план направлен, в частности, на совершенствование системы выявления и профилактики ВГС. Гепатиту С уделяется особое внимание, поскольку в настоящее время не существует вакцины против данного вируса, а значит нет надёжного способа профилактики заболевания. Это связано с вариабельностью генома *HCV* и его высокой способностью к мутациям. Поэтому единственный путь к снижению уровня заболеваемости – это своевременная диагностика и подбор противовирусной терапии.

Несмотря на то, что с 2006 года по настоящее время вакцину от вирусного гепатита В (ВГВ) в России получили более 113 миллионов человек, и данная вакцина включена в календарь обязательных прививок, уровень заболеваемости остаётся по-прежнему высоким, хотя и снизился по причине эффективности вакцинопрофилактики – среди детей младше 5 лет распространённость инфекции снизилась на 76,8%, а среди людей всех возрастов – на 31,3%. Но с учетом снижения заболеваемости, показатель смертности от ВГВ в России в период с 2019 по 2022 годы увеличился на 15,1%, и поэтому гепатит В до сих пор является серьёзной проблемой, для решения которой необходимы качественные средства диагностики [Какорина Е.П. и др., 2022].

Метод ПЦР – широко используемый диагностический метод выявления *HBV* и *HCV*, поскольку является более чувствительным, чем широко применяемые серологические методы, так как предоставляет возможность обнаружить инфекционные агенты в биоматериале до момента наступления иммунного ответа. В то время как метод иммуноферментного анализа (ИФА) обладает диагностической чувствительностью 90%, метод ПЦР - более 96%. Более того, использование в диагностике ПЦР позволяет выявить наличие *HBV* и *HCV* в период так называемого «серологического окна», когда вирус уже присутствует в организме, но антитела к нему ещё не вырабатываются. Это явление длится от нескольких недель до нескольких месяцев и может приводить к ложноотрицательным результатам тестирования методами ИФА. Также метод ПЦР представляет возможность генотипирования, что особенно актуально при ВГС, поскольку некоторые генотипы *HCV* могут быть устойчивы к терапии, что важно учитывать при подборе лечения.

Степень разработанности темы исследования. Способам создания мультиплексных тест-систем для ПЦР-диагностики посвящены труды Tan B. и др. (2015), Cheung H.W. и др. (2022). Созданию диагностических тест-систем для выявления *HBV* и *HCV* рассмотрены в работах авторов Da Silva M.C.C. и др. (2022), Zanella I. и др. (2002),

Song J.E. и др. (2016), Aydogan S. и др. (2017). Создание отечественной тест-системы для диагностики *HCV* методом ПЦР в реальном времени описано в диссертации Ведерникова В.Е. (2011). Результаты исследований Сериковой Е.Н. и др. (2021) показывают способы увеличения чувствительности диагностической тест-системы для детектирования *HBV* при низкой вирусной нагрузке в образце. Необходимость введения в клиническую практику ПЦР-тестирования для выявления *HBV* и *HCV* в дополнение к серологической диагностике у потенциальных доноров крови обосновал Фазылов В.Х. и др. (2023).

В связи с вышесказанным, совершенствование диагностических систем для выявления *HBV* и *HCV* является одной из приоритетных задач клинической диагностики. Перспективным также является разработка высокочувствительных ПЦР-систем и их дальнейшее внедрение в клиническую практику. Это вызвано тем, что в медицинских учреждениях при проверке образцов крови на наличие гемотрансмиссивных инфекций имеется высокий риск получения ложноотрицательных результатов при использовании ПЦР-систем с низкой чувствительностью.

Связь работы с научными проектами. Экспериментальная часть работы частично выполнена в лаборатории ПЦР ГК «Алкор Био» (г. Санкт-Петербург) в рамках выполнения проектов ПЦР_Н_024 и ПЦР_Н_026 по разработке комплекса диагностических тест-систем для выявления гемотрансмиссивных инфекций.

Цель работы – разработать усовершенствованные тест-системы для диагностики *HBV* и *HCV* с высокими показателями чувствительности и специфичности с учётом термодинамических взаимодействий между праймерами, зондами, матрицей нуклеиновых кислот (НК) и нарабатываемых ампликонов.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- разработать методику подбора праймеров и зондов с учётом термодинамических характеристик матрицы НК и нарабатываемого ампликона;
- провести термодинамический анализ ДНК и РНК-матриц для обеспечения наибольшей эффективности взаимодействия праймеров с матрицей НК;
- снизить вероятность контаминации реакционных смесей и предотвратить ложноположительные результаты анализа с использованием фермента урацил-ДНК-гликозилазы;
- провести испытания разработанных тест-систем на клинических образцах плазмы крови человека, полученных от пациентов с подтверждёнными диагнозами;
- определить аналитические и диагностические характеристики разработанных тест-систем.

Научная новизна. Предложенная методика анализа вторичных структур на всей протяжённости получаемых ампликонов и на их фланкирующих участках позволила получить тест-системы с аналитическими и диагностическими характеристиками, превышающими на 10% - 66% характеристики аналогичных систем, зарегистрированных в России.

Разработаны системы праймеров и зондов для детекции *HBV* и *HCV*, создан экзогенный контрольный образец для определения качества пробоподготовки биологического материала.

Предложена методика разработки внутреннего контрольного образца (ВКО) для устранения ингибирования реакции амплификации системы детекции вирусов в мультиплексной ПЦР.

Научно-квалификационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.5.6. Биотехнология (отрасль - биологические науки), указанным в паспорте специальности п.9 «Медицинские биотехнологии…Средства диагностики вирусных болезней» и п.22 «Создание биоаналитических систем для медицинской диагностики и

медицинского анализа…Диагностические средства с применением геномных технологий».

Теоретическая и практическая значимость.

Разработанная диагностическая тест-система для выявления *HBV* имеет аналитическую чувствительность 5 международных единиц (МЕ)/мл при выделении вирусной ДНК из 1 мл плазмы крови человека, показатель диагностической специфичности 98,3% и значение диагностической чувствительности 96,4%. Тест-система для диагностики *HCV* показала аналитическую чувствительность 9 МЕ/мл при выделении вирусной РНК из 1 мл плазмы крови человека, показатель диагностической специфичности 98,3% и значение диагностической чувствительности 97,5%. Проверка аналитической специфичности тест-систем показала отсутствие неспецифических реакций с геномами близкородственных микроорганизмов.

Получены регистрационные удостоверения на разработанные тест-системы:

- «Набор реагентов для качественного определения ДНК вируса гепатита В методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени "Интифика ВГВ", по ТУ 21.20.23-578-98539446-2023», РЗН 2024/21947 от 29.01.2024;
- «Набор реагентов для качественного определения РНК вируса гепатита С методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени "Интифика ВГС", по ТУ 21.20.23-711-98539446-2023», РЗН 2024/23394 от 19.08.2024.

Зарегистрированные тест-системы внедрены в производство в ГК «Алкор Био».

Методы и результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, внедрены в учебный процесс Высшей школы биотехнологий и пищевых производств Института биомедицинских систем и биотехнологий ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» в рамках дисциплины «Лаборатория методов молекулярной диагностики», реализуемой для студентов, обучающихся по образовательной программе магистратуры 19.04.01_01 «Бионанотехнология».

Методология и методы исследования. Для *in silico* подбора и анализа праймеров и зондов применялись следующие цифровые инструменты: онлайн-ресурс Primer-BLAST (NCBI, США); онлайн-сервис OligoAnalyzer Tool Oligo 7 (Integrated DNA Technologies, США), а также программы Oligo Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc., США), Clustal Omega (EMBL-EBI, Великобритания) и UGENE (Unipro LLC, Россия). Разработка систем праймеров и зондов проводилась с использованием полных нуклеотидных последовательностей *HBV* и *HCV*, представленных в публичной базе данных GenBank (NCBI, США). При создании внутреннего контрольного образца выполнен молекулярный дизайн праймеров и зондов по усовершенствованной методике, использованной при разработке тест-систем для детекции *HBV* и *HCV*.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали дисперсионный анализ, анализ Бланда-Альтмана, для нормально распределенных величин применяли парный t-критерий Стьюдента ($P < 0,05$). Для визуализации статистической обработки построены ROC-кривые и график анализа соответствия Бланда-Альтмана. При статистической обработке экспериментальных данных применяли программы Microsoft Excel (Microsoft, США), Statistica 10.0 (StatSoft, США), MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия) и ресурс Web tool for ROC analysis (ГБУЗ «НПКЦ ДиТ ДЗМ», Россия).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Методика подбора специфичных праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени с учётом термодинамических характеристик ДНК или РНК-матрицы, а также нарабатываемого ампликона;
- Диагностические тест-системы для детекции *HBV* и *HCV* методом мультиплексной

ПЦР в реальном времени, включающие в себя все необходимые для проведения анализа реагенты и контрольные образцы;

- Использование фермента урацил-ДНК-гликозилазы позволило сократить вероятность контаминации реакционных смесей и предотвратить ложноположительные результаты анализа;
- Тест-системы соответствуют требованиям по стабильности при хранении в течение 1 года при температуре +4°С.

Степень достоверности результатов работы. Полученные результаты обладают высокой степенью достоверности, поскольку исследования проведены на современном аналитическом оборудовании, прошедшем внутреннюю аттестацию и внешнюю поверку в Федеральном бюджетном учреждении «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в г. Санкт-Петербурге, Ленинградской и Новгородской областях, Республике Карелия» (ФБУ «Тест-С.-Петербург»). Статистическая достоверность результатов обеспечивается выполнением измерений ключевых показателей в минимально необходимом количестве технических (не менее двух) и биологических (не менее трёх) повторностей, согласно ГОСТ Р 57175-2016 и ГОСТ Р ИСО 20395-2023. Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью, показана межлотовая воспроизводимость между различными сериями синтезированных праймеров и зондов, а также стабильность работы системы при масштабировании производства до промышленных серий. Результаты исследований подтверждены опытно-промышленной апробацией разработанных тест-систем.

Апробация работы. Основные результаты диссертации апробированы на конференции для молодых ученых «Биотехнологии и безопасность в техносфере» (Санкт-Петербург, 2022, 2023 гг., СПбПУ); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «БиоТех-2024» (Санкт-Петербург, 2024 г., СПбПУ); Всероссийской научной конференции «LifeSciencePolytech» (Санкт-Петербург, 2022 г., СПбПУ); XXXIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Стандарты и индивидуальные подходы в клинической трансфузиологии» (Москва, 2022 г., ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России); межрегиональной научно-практической конференции «AvaevLab. Истина микромира. Истина диагноза» (Тверь, 2023 г., ГБУЗ Центр специализированных видов медицинской помощи им. В.П. Аваева); XXVIII Всероссийской научно-практической конференции «Наукоемкие лабораторные технологии для клинической практики» (Москва, 2023 г., ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора); XIV Всероссийской конференции с международным участием «Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы» (Москва, 2024 г., ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), «Конкурсе молодых учёных» в рамках конгресса с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность» (Москва, 2023 и 2024 гг., ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), VIII Петербургском медицинском инновационном форуме с международным участием (Санкт-Петербург, 2025 г., НЦМУ «Центр персонализированной медицины»), а также на семинаре «Молекулярная биология и биотехнология» (Санкт-Петербург, 2025 г., СПбПУ).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, включая 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Структура и объём диссертации. Работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Работа изложена на 140 страницах, содержащих 17 таблиц, 50 рисунков и 6 приложений. Библиографический список включает 202 наименования цитируемых источников на русском и английском

языках.

Личный вклад автора работы заключается в проведенном литературном поиске и анализе отечественных и зарубежных источников, участии в выборе и проверке систем праймеров и зондов, планировании и проведении экспериментальных работ. Подбор условий реакции, проведение клинических испытаний, определение аналитических и диагностических характеристик тест-систем и статистическая обработка результатов исследования выполнялись автором самостоятельно.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении приводится динамика уровня заболеваемости и статистика смертности от ВГВ и ВГС, обоснование необходимости ранней диагностики этих заболеваний. Сформулированы цель и задачи исследования, представлены материалы и методы, обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования. Приведены основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов, апробация работы, публикации по теме исследования и личный вклад автора.

В первой главе представлен обзор отечественных и зарубежных литературных источников по теме исследования. Рассмотрено строение *HBV* и *HCV*, приведены особенности организации их геномов, предоставлена информация о частоте встречаемости различных генетических вариантов в России и в мире. Приведена информация о существующих методах диагностики ВГВ и ВГС, рассмотрены преимущества и недостатки каждого метода. Обоснован выбор метода ПЦР в реальном времени для создания диагностических тест-систем. Описаны критерии подбора праймеров и зондов для ПЦР-РВ, требования к разрабатываемым тест-системам.

Во второй главе обозначены объекты исследования, представлены материалы и методы, используемые для проведения экспериментальных работ. В качестве объектов исследования использованы НК *HBV* и *HCV*, полученные из клинических образцов плазмы крови пациентов с подтверждёнными диагнозами, а также с подтверждённым отсутствием диагноза; синтетические фрагменты геномов *HBV* и *HCV*, интегрированные в вектор pUC57. Выделение НК из биологических образцов плазмы крови человека проводили с использованием двух коммерческих наборов реагентов, принцип действия которых основан на сорбции ДНК и РНК на частицах магнитного сорбента. В исследуемые образцы плазмы крови человека также вносили плазмидный экзогенный ВКО для оценки эффективности выделения. Процесс автоматического выделения НК проводили на станции Auto-Pure96 (Allsheng, Китай).

Предметом экспериментальных исследований являлись термодинамические характеристики праймеров и зондов; аналитические и диагностические характеристики разработанных тест-систем; составы реакционных смесей для детекции *HBV* и *HCV*.

Специфичные тест-системы на *HBV* и *HCV* подобраны и проанализированы *in silico*. Подбор систем праймеров и зондов проводили в несколько этапов. На первом этапе работы провели биоинформатический поиск баз данных, содержащих полные нуклеотидные последовательности геномов *HBV* и *HCV* всех известных генотипов. В дальнейшем методами *in silico* произвели множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей для выявления наиболее консервативных участков вирусных геномов, удовлетворяющих условиям подбора специфичной системы праймеров и зондов. Использовали данные по частоте встречаемости нуклеотидных триплетов и тетраплетов в геноме анализируемых вирусов, чтобы обеспечить эффективность отжига 3'-концов праймеров на матрицу НК. При необходимости использовали включение модифицированных нуклеотидов в местах возможных полиморфизмов. После этого проводили подбор специфичных праймеров и зондов, используя анализ

термодинамических характеристик нуклеотидных последовательностей. Проводили анализ вторичных структур не только у праймеров и зондов, как рекомендовано в литературе, но и на всей протяжённости получаемых ампликонов и на их концевых участках. Также выполнили оценку распределения энергии Гиббса (ΔG) на протяжении всего участка отжига специфичных праймеров и зондов на матрице для оценки термодинамических свойств разрабатываемых систем.

При проведении ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) результаты амплификации оценивали по количеству циклов ПЦР, минимально необходимому для детектирования амплификатором флюоресцентного сигнала, специфичного для исследуемого аналита. Концентрацию НК для определения аналитической чувствительности диагностических тест-систем определяли при помощи цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) на оборудовании QX200 (Bio-Rad Laboratories, США). Состав реакционных смесей для проведения ПЦР подбирали путём титрования составных компонентов. Реакционные смеси также подвергли процессу лиофильной сушки для увеличения стабильности ПЦР-смесей при хранении. При проведении процесса лиофилизации использовался сублиматор модели 100-5 (Zirbus-technology GmbH, Германия). Для получения стабильных и устойчивых лиофилизатов проводили подбор состава смеси реагентов для лиофильной сушки как на основе литературных данных, так и экспериментально. При подборе состава реакционной смеси провели титрование таких ключевых компонентов в её составе, как трегалоза, желатин и декстран. В качестве фермента в итоговой реакционной смеси использовали безглицериновую Taq-полимеразу, приготовленную в трегалозном буфере, поскольку глицерин хорошо удерживает влагу, что мешает процессу низкотемпературной сушки. После подбора состава реакционной смеси и избавления от глицерина, экспериментально подтвердили стабильность и воспроизводимость работы систем праймеров и зондов на матрице НК. Проверили, что чувствительность праймеров не снизилась в процессе лиофильной сушки, как и активность полимеразы после длительного воздействия низкой температуры. Для первых экспериментов по лиофилизации готовили тестовые малые объёмы ПЦР-смесей (5-10 мл), затем провели масштабирование процесса, в ходе которого приготовили большие объёмы реакционной смеси (100 мл, 1 л), разаликвотировали смеси в планшеты по 30 мкл на реакцию, затем лиофильно высушили. Для оценки качества полученных лиофилизатов и контроля качества исходных ПЦР-смесей использовался метод ПЦР в реальном времени. Для проведения ПЦР-РВ использовали амплификатор CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

Для разработанных тест-систем определены аналитические и диагностические характеристики. Аналитическую специфичность, обеспечивающуюся отсутствием взаимодействий праймеров и зондов с геномами близкородственных микроорганизмов, определяли *in silico* с использованием веб-инструментов Primer-BLAST (NCBI, США), Oligo Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc., США) и UGENE (Unipro LLC, Россия). При определении аналитической специфичности *in silico* показано отсутствие потенциальной возможности амплификации подобранных систем праймеров и зондов на матрицах НК близкородственных микроорганизмов и других возбудителей гемотрансмиссивных инфекций, а также на ДНК *Homo sapiens*.

Аналитическую чувствительность тест-систем определяли *in vitro* с использованием стандартных образцов с известной концентрацией НК. Концентрацию НК определяли при помощи цкПЦР. Аналитическая чувствительность разработанных тест-систем составила 50 МЕ/мл при выделении ДНК из 100 мкл плазмы крови (для *HBV*) и 100 МЕ/мл при выделении РНК из 100 мкл плазмы крови (для *HCV*).

Для оценки диагностической чувствительности и специфичности проводили ПЦР с использованием разработанной тест-системы для определения *HBV* и *HCV*. Объём

вносимого в реакционную смесь образца НК составил 10 мкл. Полученные результаты сопоставляли с данными, полученными при помощи зарегистрированного коммерческого набора, использованного при валидации клинических образцов. Диагностические характеристики полученных тест-систем определяли с использованием наборов «РеалБест ВГВ ПЦР» (форма 2) и «РеалБест ВГС ПЦР» (форма 2) (АО «Вектор-Бест», Россия) в лиофильном формате в индивидуальных прозрачных микропробирках объёмом 0.2 мл, и для обоих ПЦР-тест-систем образцы выделенной НК вносили в оба варианта реакционных смесей параллельно сразу же после процесса выделения НК из образцов плазмы крови человека. Диагностическая чувствительность составила 96,4% (при определении *HBV*) на выборке из 415 образцов плазмы крови и 97,5% (при определении *HCV*) на выборке из 118 образцов плазмы крови. Диагностическая специфичность составила 98,3% (для *HBV*) на выборке из 360 образцов плазмы крови и 98,3% (для *HCV*) на выборке из 118 образцов плазмы крови.

Статистическая обработка и визуализация экспериментальных данных проводилась с применением методов математической статистики при помощи программ Microsoft Excel (Microsoft, США), Statistica 10.0 (StatSoft, США), MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия) и ресурс Web tool for ROC analysis (ГБУЗ «НПКЦ ДиТ ДЗМ», Россия).

Общие этапы разработки тест-систем для определения *HBV* и *HCV* представлены на рисунке 1.

В третьей главе описаны результаты подбора праймеров и зондов, определены наименее стабильные области геномов *HBV* и *HCV*, потенциально приводящие к снижению сродства праймеров и зондов с матрицей, и при молекулярном дизайне тест-систем избегали этих областей. Отражены результаты определения аналитических и диагностических характеристик разработанных тест-систем, их робастности и прецизионности. Предоставлены результаты разработки ВКО. Приведены экспериментальные результаты по лиофилизации реакционных ПЦР-смесей. Представлены результаты экспериментов по стабильности реакционных смесей. Представлен анализ полученных результатов и статистическая обработка экспериментальных данных.

Разработан ВКО в виде искусственно синтезированной уникальной последовательностью нуклеотидов, которая не имеет гомологии с последовательностями геномов исследуемых вирусов, с геномом человека и возбудителей инфекций, встречающихся в крови человека.

Анализ термодинамических свойств подобранных праймеров и зондов проиллюстрирован на примере использования двух прямых праймеров для определения *HCV*, F-16 и F-20 с характеристиками, представленными в Таблице 1.

По большинству характеристик праймеры схожи, но для праймера F-16 обращает на себя внимание низкая ΔG гомодимера, наличие тугоплавкой шпильки и стабильного полигуанидинового квадруплекса внутри ампликона, что потенциально может привести к затруднению прохождения совмещенной реакции обратной транскрипции и последующей амплификации, необходимой для детекции *HCV*.

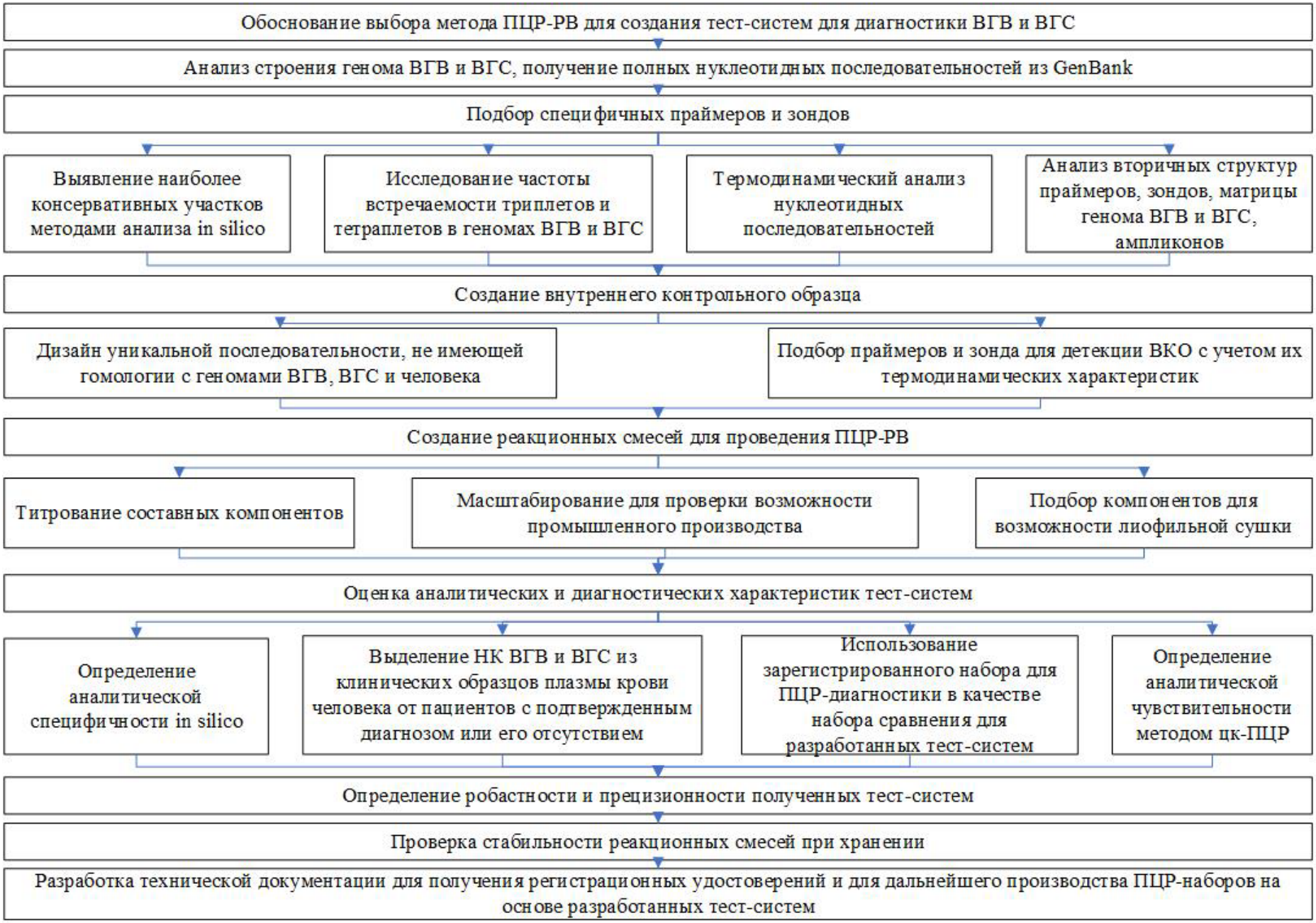


Рисунок 1 – Этапы разработки тест - систем для определения *HBV* и *HCV*

Таблица 1 – Термодинамические характеристики специфичных прямых праймеров для детекции *HCV*

Анализируемый параметр	Праймер F-16	Праймер F-20
Температура плавления олигонуклеотида, ºС	66.15±0.67	66.75±0.73
Соотношение гуанин/цитозин, %	48.00	60.90
Соотношение аденин/гуанин, %	56.00	56.50
Энергия Гиббса для 3’-конца праймера, ккал/моль	-6.92±0.07	-5.65±0.11
Энергия Гиббса всего олигонуклеотида, ккал/моль	-19.86±0.20	-19.73±0.26
Энергия Гиббса наиболее тугоплавкой шпильки, ккал/моль	-0.73±0.04	-0.57±0.03
Температура плавления наиболее тугоплавкой шпильки, ºС	34.5±0.59	48.1±0.85
Энергия Гиббса для гомодимера праймера, ккал/моль	-12.05±0.32	-3.00±0.15
Энергия Гиббса для наиболее тугоплавкой шпильки внутри ампликона, ккал/моль	-2.92±0.06	-6.73±0.34
Температура плавления самой тугоплавкой шпильки внутри ампликона, ºС	57.75±0.89	46.49±0.97
Квадруплекс из полигуанидина в составе ампликона	есть	нет

Также термодинамический анализ данных прямых праймеров показал значительную неравномерность распределения энергии Гиббса по всей протяжённости праймера F-16, что может привести к его нестабильному отжигу и снижению эффективности реакции амплификации, по сравнению с праймером F-20, что отражено на рисунке 2.

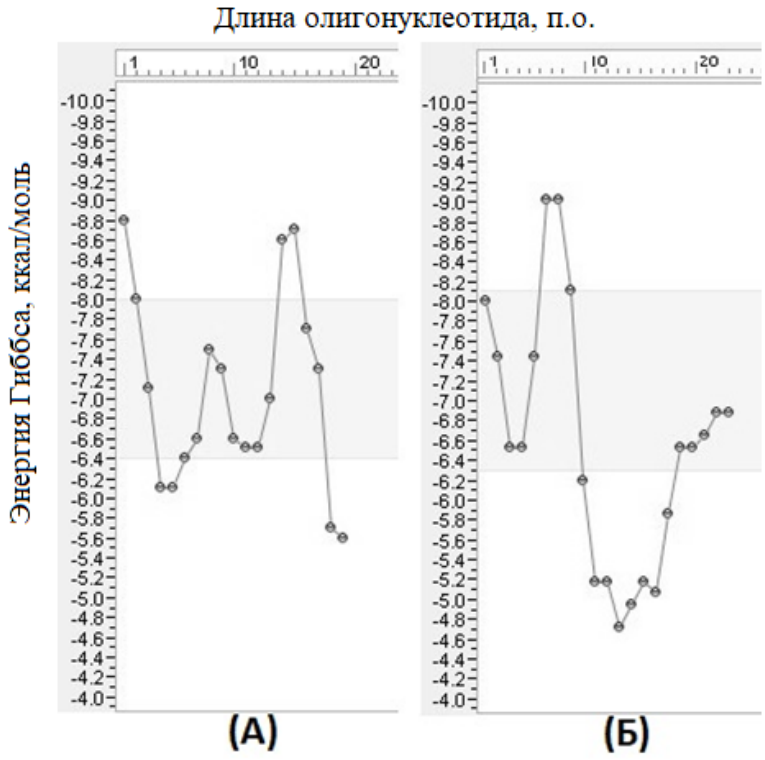


Рисунок 2 – График распределения энергии Гиббса всего олигонуклеотида для оценки термодинамической стабильности для праймера F-20 (А) и F-16 (Б). Выделенная область показывает допустимое отклонение распределения энергии Гиббса, при котором наблюдается максимальное сродство праймера и матрицы НК

Проанализировано влияние термодинамических характеристик праймеров F-16 и F-20 на чувствительность и специфичность ПЦР-системы при детекции фрагмента НК *HCV* в образцах с высокой ($2.5 \cdot 10^4$ МЕ/мкл) и низкой ($5 \cdot 10^2$ МЕ/мкл) вирусной нагрузкой. Результаты представлены на рисунке 3.

Выявлено, что для образца с высокой вирусной нагрузкой использование в ПЦР-системе праймера F-16 приводит к значительному увеличению цикла регистрации флуоресценции по сравнению с использованием праймера F-20 (ΔCt=5.44), что может интерпретироваться как снижение вирусной нагрузки в тестируемом образце, хотя количество вирусных геномов в обоих случаях одинаково. Для образца с низкой вирусной нагрузкой использование прямого праймера F-16 привело к ложноотрицательному результату из-за формирования стабильной вторичной структуры, мешающей прохождению амплификации.

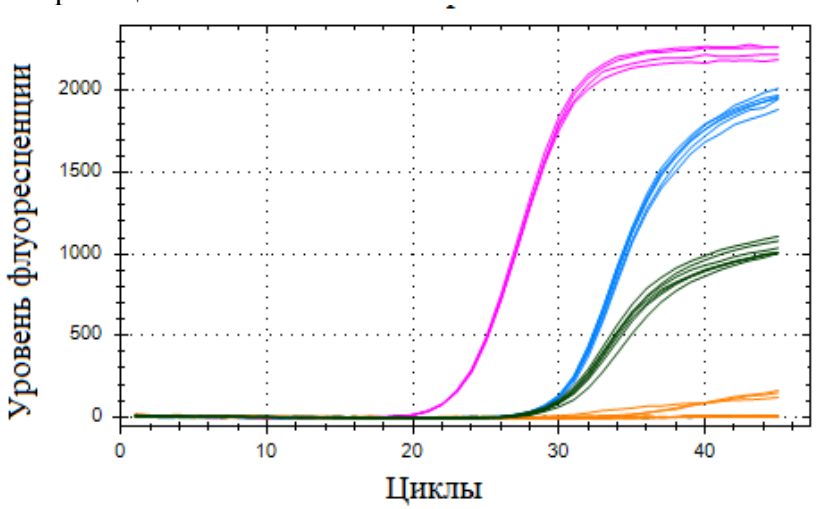


Рисунок 3 – Кривые амплификации при проверке влияния термодинамических характеристик праймеров на чувствительность и специфичность системы *HCV*. Малиновым и голубым цветом - кривые амплификации образца с высокой вирусной нагрузкой с праймером F-20 и F-16 соответственно. Зелёным и оранжевым цветом - кривые амплификации образца с низкой вирусной нагрузкой с прямым праймером F-20 и F-16 соответственно.

При использовании праймера F-16 отмечается падение эффективности всей ПЦР-системы, что характеризуется малыми углами наклона кривых накопления флуоресценции и снижением интенсивности флуоресцентного сигнала. На эффективность ПЦР также влияет то, что праймер F-16 отжигается на участок с прочной вторичной структурой у ампликона, в то время как праймер F-20 не затрагивает этот участок.

Для оценки возможности снижения вероятности контаминации при использовании ПЦР-тест-систем для определения *HBV* и *HCV* проводили эксперименты по совмещению разработанных систем с ферментом урацил-ДНК-гликозилазой, которая способна распознавать и разрушать двухцепочечные фрагменты ДНК с 2’-дезоксиуридин-5’-трифосфатом (dUTP) в составе ампликона. В работе использовался фермент урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ) производства ГК «Алкор Био».

Проверка влияния УДГ на возможную контаминацию проходила в два этапа. Первым этапом в результате проведения ПЦР-РВ с использованием праймеров и зондов для определения *HBV* и *HCV* нарабатывали ампликоны с dUTP и готовили последовательные десятикратные разведения этих ампликонов. Полученные разведения ампликонов оценивали по значению порогового цикла Ct, который также определяли методом ПЦР-РВ, при котором в качестве матрицы использовали не НК *HBV* и *HCV*, а ранее наработанные двухцепочечные ампликоны с dUTP в составе. Вторым этапом проверяли работу фермента УДГ на полученных ампликонах, оценивали, насколько эффективно УДГ их разрушает. Оценка работы фермента проводилась путем ПЦР-РВ в сравнении с системой без добавления УДГ в реакционную смесь при использовании в качестве матрицы ампликонов с dUTP. В результате наблюдалось смещение кривых

амплификации для системы с УДГ на 12 циклов относительно кривых амплификации для системы без УДГ в составе, что отражено на рисунке 4. Отсутствие амплификации у 10^{-8} разведения ампликонов позволяет исключить возникновение контаминации при работе с разработанной ПЦР-тест-системой совместно с ферментом УДГ, т.к. как правило при амплификации в ПЦР-РВ контаминация определяется после 26 цикла реакции. Полученный результат показывает высокую эффективность работы фермента УДГ в составе реакционной смеси.

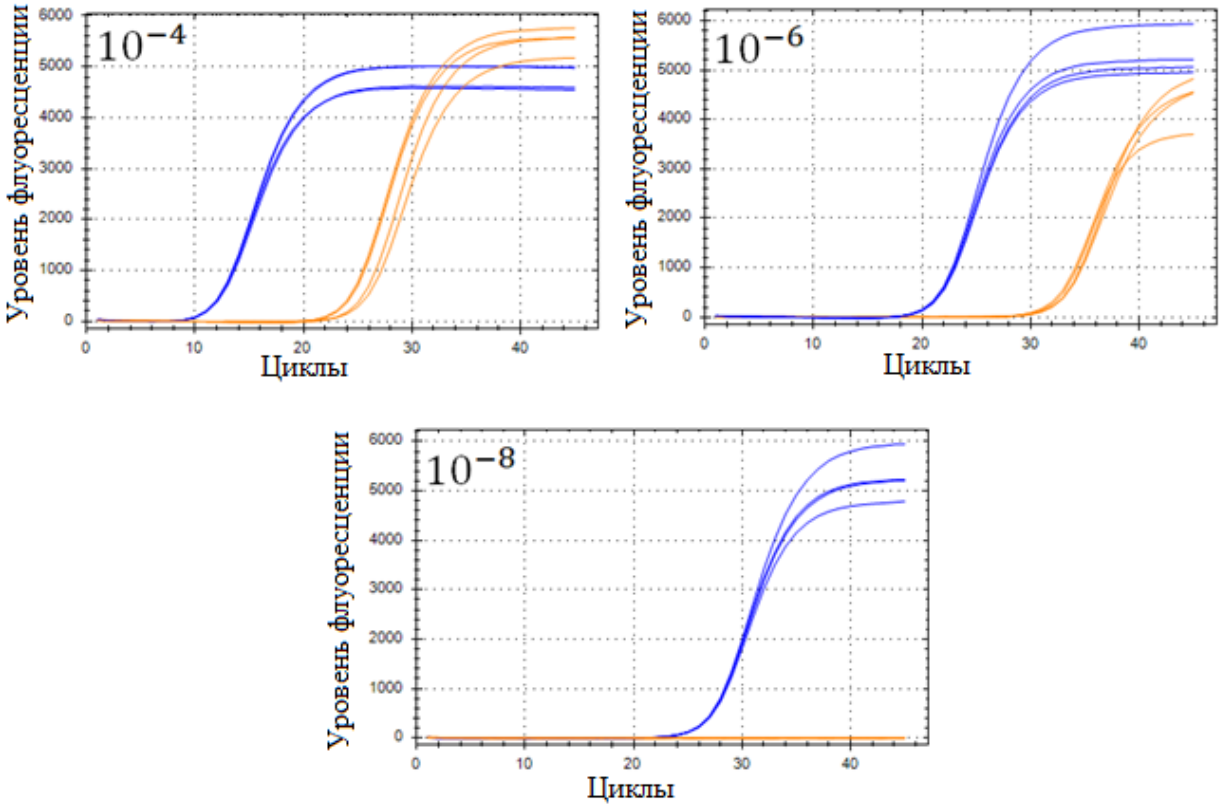


Рисунок 4 – Кривые амплификации при проверке влияния эффективности УДГ с десятикратными разведениями (10^{-4}, 10^{-6} и 10^{-8}) *HBV* ампликонов с dUTP (синим цветом обозначены кривые амплификации для системы без добавления УДГ, оранжевым – с добавлением УДГ).

Для проверки стабильности при хранении в реальном времени разработанных тест-систем, ПЦР-смеси заложены на температуру хранения +4ºС и в качестве контрольных смесей на -20ºС. Проверка реакционных смесей методом ПЦР-РВ выполнена по следующему графику: 0 суток (день приготовления реакционных смесей), затем 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев хранения ПЦР-смесей. Для тест-систем на *HBV* и *HCV* контроль стабильности по вышеуказанной схеме эксперимента пройден. Все тестовые образцы реакционных смесей продемонстрировали аналитические сигналы, схожие с таковыми для контрольной смеси. На рисунках 5 и 6 представлены результаты контроля стабильности ПЦР-смесей на *HBV* и *HCV* при хранении в реальном времени на температуре +4ºС и -20ºС в качестве контрольной ПЦР-смеси. Представлены данные для последнего 12 месяца контроля стабильности. При этом выход матриц *HBV* и *HCV* при использовании контрольной смеси регистрируется раньше для сильно концентрированных матриц, и смещается в пределах $\Delta Ct \pm 0.5$ цикла для слабо концентрированных матриц.

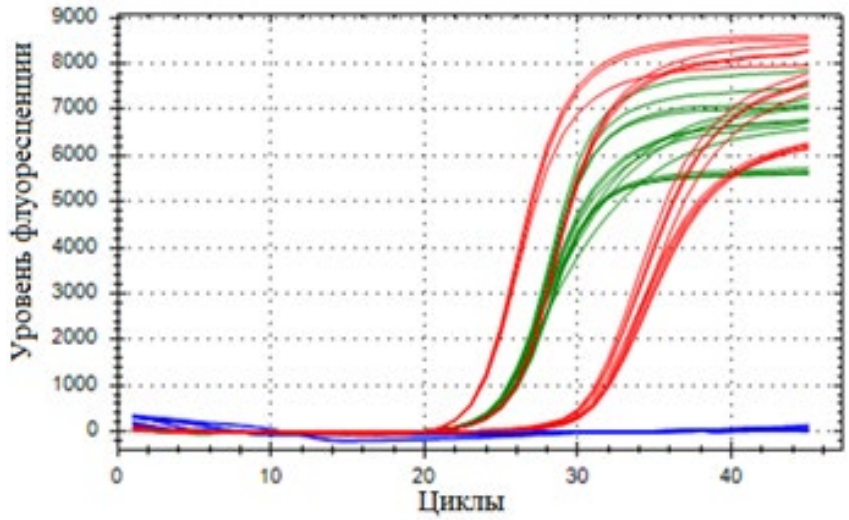


Рисунок 5 – Кривые амплификации по результатам хранения в реальном времени реакционной смеси для определения *HBV* в течение 12 месяцев. Красным цветом обозначены кривые амплификации ДНК *HBV* в препарате НК; зелёным цветом кривые амплификации экзогенного ВКО; синим цветом – сигнал для отрицательного контрольного образца (ОКО)

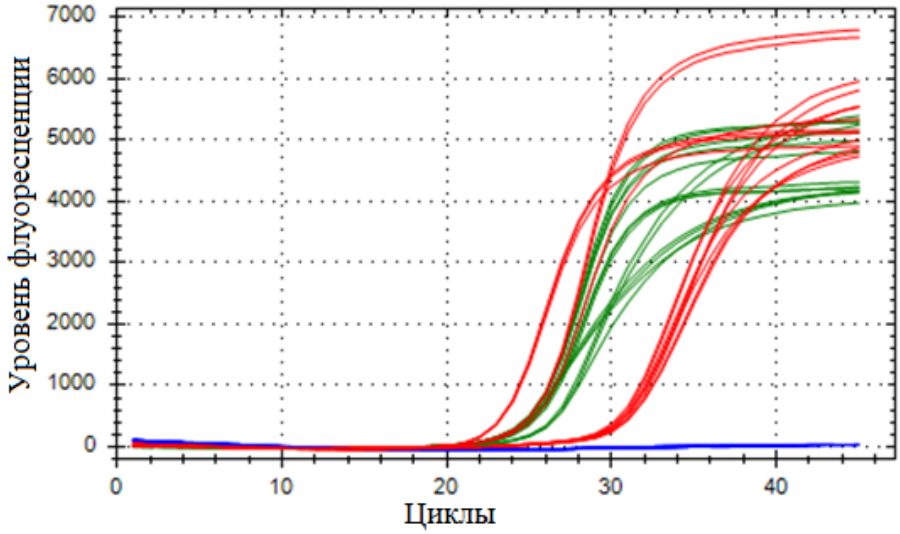


Рисунок 6 – Кривые амплификации по результатам хранения в реальном времени реакционной смеси для определения *HCV* в течение 12 месяцев. Красным цветом обозначены кривые амплификации РНК *HCV* в препарате НК; зелёным цветом кривые амплификации экзогенного ВКО; синим цветом – сигнал для ОКО

По результатам амплификации 415 истинно положительных образцов ДНК *HBV* на разработанной тест-системе выявили 400 положительных результатов. За истинно положительные принимали те образцы, которые оказались положительными при анализе коммерческой зарегистрированной тест-системой «РеалБест ВГВ ПЦР». Из 415 образцов 15 обладали высокой (приблизительно 10^4 МЕ/мкл) вирусной нагрузкой, 225 – средней (приблизительно 10^3 МЕ/мкл), а 175 – низкой (10^2 МЕ/мкл и ниже) вирусной нагрузкой. С использованием этих данных рассчитали диагностическую чувствительность тест-системы, которая составила 96,4%. Расчёт диагностической чувствительности (ДЧ) проводился по формуле согласно ГОСТ Р 57175-2016:

$$\text{ДЧ} = \frac{a}{b} * 100\% \quad (1)$$

Где: a – количество выявленных положительных образцов;

b –количество истинно положительных образцов.

По результатам амплификации 360 истинно отрицательных образцов на

разработанной тест-системе выявили 354 отрицательных результата. За истинно отрицательные принимали те образцы, которые оказались отрицательными при анализе коммерческой зарегистрированной тест-системой «РеалБест ВГВ ПЦР». С использованием этих данных рассчитали диагностическую специфичность тест-системы, которая составила 98,3%. Расчёт диагностической специфичности (ДС) проводился по формуле согласно ГОСТ Р 57175-2016:

$$\text{ДС} = \frac{c}{d} * 100\% \quad (2)$$

Где: c – количество выявленных отрицательных образцов;

d –количество истинно отрицательных образцов.

Для выявления соответствия результатов, полученных для разработанных тест-систем для определения *HBV* и *HCV*, использован анализ полученных данных методом соответствия Бланда-Альтмана. Результаты показаны на рисунке 7. Указанный на графике жёлтой и зелёной пунктирной линией коридор показывает отклонение на величину, равную двум стандартным отклонениям от среднего значения.

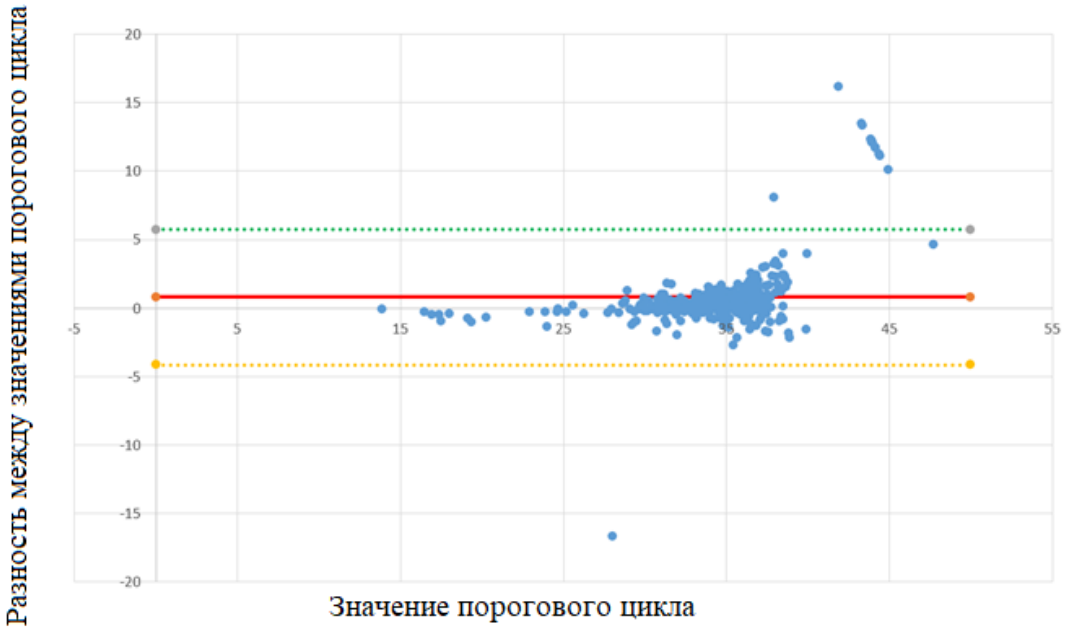


Рисунок 7 – График распределения значений Ct клинических образцов между тест-системой на *HBV* и набором «РеалБест ВГВ ПЦР»

В результате анализа по методу Бланда-Альтмана обнаружено небольшое количество выбросов (ложноотрицательных результатов) для разработанной нами тест-системы, наблюдающихся при анализе образцов ДНК с низким содержанием ДНК *HBV* (Ct>35). С уменьшением количества матрицы ДНК в образце чувствительность разработанной тест-системы снижается в сравнении с набором «РеалБест ВГВ ПЦР». Однако при учёте разности объёма, вносимого на ПЦР образца нормировочное значение Ct составляет +0.737 цикла – при этом наблюдается расхождение в большинстве наблюдаемых результатов между тест-системами в пределах Ct±0.5 цикла. Следовательно, различия между тест-системами, согласно выбранному критерию, отсутствуют.

Для лучшей визуализации полученных результатов и в качестве сравнительного метода статистической обработки экспериментальных данных по анализу клинических образцов для диагностической системы на *HBV* построена ROC-кривая, изображённая на рисунке 8. На оси ординат показано значение чувствительности теста, а вдоль оси абсцисс нанесено значение специфичности теста, вычитаемое из единицы. На график выведено значение AUC с доверительными интервалами, рассчитанное двумя способами: по

методу «самонастройки» (также известному как бутстрэп), а также по методу ДеЛонга. С использованием этого статистического метода установлено, что значение диагностической чувствительности для тест-системы для определения *HBV* соответствует 96,4% (доверительнй интервал (ДИ) 94,6% - 98,2%), что согласуется с ранее полученным расчётным значением 96,4%. Значение диагностической специфичности для тест-системы для определения *HBV* методом анализа ROC-кривой определено как 98,5% (ДИ 97,2% - 99,7%), что отличается на 0,2% от расчётного значения 98,3%, при этом ранее полученное значение входит в ДИ, определённый при помощи ROC-анализа. Показатель AUC (площадь под ROC-кривой), отражающий диагностическую эффективность метода, составляет 97,4% (ДИ 96,3% - 98,5%), что соответствует высокому показателю эффективности (>90%).

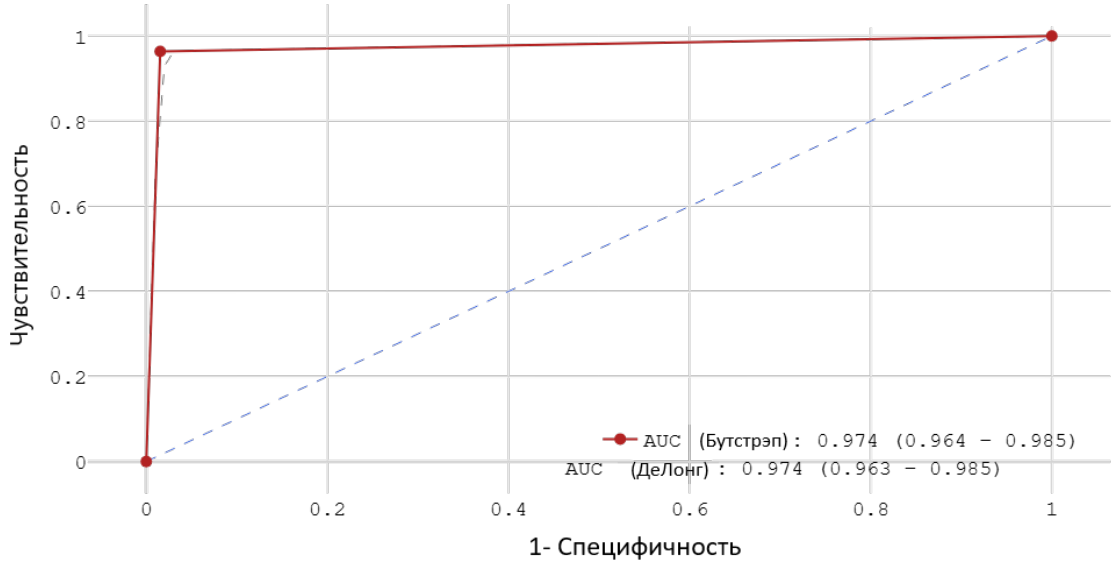


Рисунок 8 – ROC-кривая для значений Ct клинических образцов, положительных и отрицательных на *HBV*

Аналогичным методом определяли диагностические характеристики тест-системы для диагностики *HCV*. По результатам амплификации 118 истинно положительных образцов РНК *HCV* на разработанной тест-системе выявили 115 положительных результатов. За истинно положительные принимали те образцы, которые оказались положительными при анализе коммерческой зарегистрированной тест-системой «РеалБест ВГС ПЦР». Из 118 образцов 17 обладали высокой (приблизительно 10^4 МЕ/мкл) вирусной нагрузкой, 89 – средней (приблизительно 10^3 МЕ/мкл), а 12 – низкой (10^2 МЕ/мкл и ниже) вирусной нагрузкой. С использованием этих данных рассчитали диагностическую чувствительность тест-системы, которая составила 97,5%.

По результатам амплификации 118 истинно отрицательных образцов на разработанной тест-системе выявили 116 отрицательных результата. За истинно отрицательные принимали те образцы, которые оказались отрицательными при анализе коммерческой зарегистрированной тест-системой «РеалБест ВГС ПЦР». С использованием этих данных рассчитали диагностическую специфичность тест-системы, которая составила 98,3%.

Для выявления соответствия результатов, полученных с использованием тест-системы для определения *HCV* и коммерческого набора сравнения «РеалБест ВГС ПЦР», использован анализ полученных данных методом соответствия Бланда-Альтмана. Результаты показаны на рисунке 9. Указанный на графике жёлтой и зелёной пунктирной линией коридор показывает отклонение на величину, равную двум стандартным отклонениям от среднего значения.

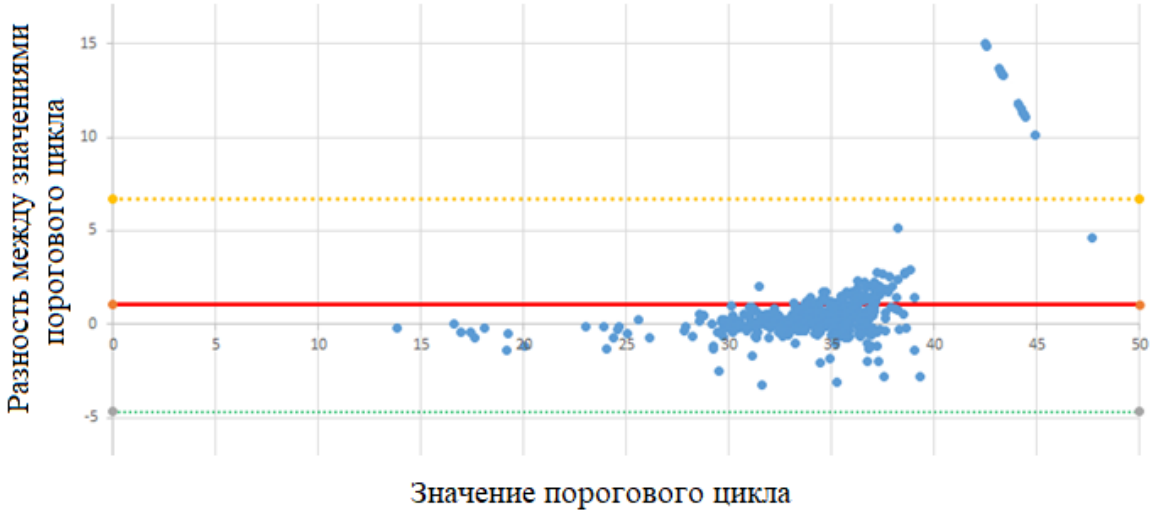


Рисунок 9 – График распределения значений Ct клинических образцов между тест-системой на *HCV* и набором «РеалБест ВГС ПЦР»

В результате анализа Бланда-Альтмана для тест-системы для определения *HCV* обнаружено небольшое количество ложноотрицательных результатов, наблюдающихся при анализе образцов РНК с низким содержанием РНК *HCV* (Ct>35). Но с учётом разности вносимых на ПЦР объёмов РНК различия между тест-системами, согласно выбранному критерию, отсутствуют.

Для диагностической тест-системы на *HCV* построена ROC-кривая, изображённая на рисунке 10. На оси ординат показано значение чувствительности теста, а вдоль оси абсцисс нанесено значение специфичности теста, вычитаемое из единицы. На график выведено значение AUC с доверительными интервалами, рассчитанное двумя способами: по методу «самонастройки» (также известному как бутстрэп), а также по методу ДеЛонга. С использованием этого статистического метода определено значение диагностической чувствительности 97,5% (ДИ 94,6% - 100,0%), что согласуется с ранее полученным расчётным значением 97,5%. Значение диагностической специфичности определено как 98,3% (ДИ 94,6% - 100,0%), что согласуется с ранее полученным расчётным значением 98,3%. Показатель AUC (площадь под ROC-кривой), отражающий диагностическую эффективность метода, составляет 97,9% (ДИ 96,1% - 99,6%), что соответствует высокому показателю эффективности (>90%).

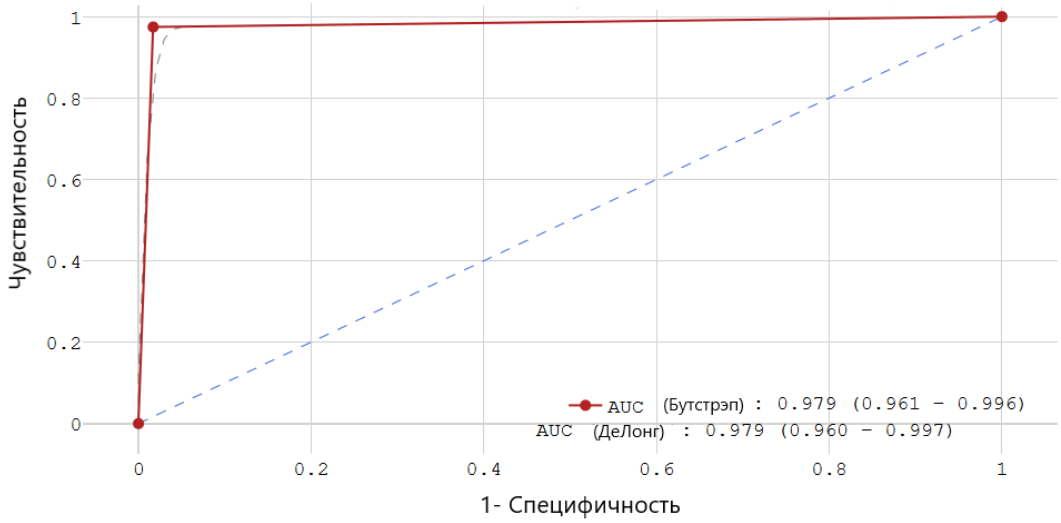


Рисунок 10 – ROC-кривая для значений Ct клинических образцов, положительных и отрицательных на *HCV*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные с учётом термодинамических характеристик праймеров, зондов, матрицы НК и ампликонов ПЦР-тест-системы имеют высокую эффективность, чувствительность и специфичность реакции как при моноплексных реакциях, так и в мультиплексном формате при совмещении с системой ВКО. Полученные результаты показывают, что для увеличения аналитических и диагностических характеристик при создании мультиплексных ПЦР-систем необходимо учитывать не только термодинамические характеристики вторичных структур самих праймеров и зондов, как рекомендовано в литературе, но и вторичные структуры матриц НК и нарабатываемых ампликонов. Ещё одним важным параметром оценки, обуславливающим более стабильный отжиг праймеров и зондов на матрицу НК, является равномерность распределения энергии Гиббса по всей длине праймеров и зондов.

На основании выполненной работы можно сделать следующие выводы:

1. Разработана методика подбора праймеров и зондов с учётом термодинамических характеристик матрицы НК и нарабатываемого ампликона, с использованием которой предложены усовершенствованные диагностические тест-системы для определения *HBV* и *HCV*, совмещённые с системой ВКО для оценки качества пробоподготовки биологических образцов. Праймеры и зонды, созданные методом молекулярного дизайна, показали более высокие (на 10% и выше) значения чувствительности, специфичности и эффективности ПЦР, чем варианты, разработанные по стандартным рекомендациям, при создании которых учитывали вторичные структуры только самих праймеров и зондов.

2. Выполнен термодинамический анализ ДНК *HBV* и РНК *HCV* в регионах отжига праймеров и зондов для обеспечения наибольшей эффективности взаимодействия праймеров с матрицей НК. Все разработанные варианты праймеров и зондов не образуют тугоплавких вторичных структур, наиболее тугоплавкая шпилька, образуемая праймерами, имеет температуру плавления T_m=48.1°C, и она разрушается при температуре отжига праймеров во время ПЦР, равной 60°C. В составе матриц НК присутствуют тугоплавкие вторичные структуры, которые необходимо выявлять и избегать в процессе разработки ПЦР-тест-систем. Обнаружена тугоплавкая шпилька внутри ампликона с температурой плавления T_m=57.7°C, которая может не разрушиться при температуре отжига праймеров из-за особенностей нагрева термоблока амплификатора, что приведёт к снижению эффективности ПЦР или к полному отсутствию амплификации. Кроме тугоплавкой шпильки, найдена вторичная структура в виде квадруплекса из полигуанидина в составе нарабатываемого ампликона. Эта структура из-за своей высокой стабильности мешает процессу наработки целевого фрагмента НК, поскольку не разрушается при высоких температурах, что также ведёт к потере эффективности ПЦР.

3. Установлено, что использование фермента УДГ не влияет на чувствительность и специфичность реакции, но выполняет функцию предотвращения контаминации реакционной смеси, происходящей вследствие внутрилабораторного распространения ампликонов, полученных во время предыдущих ПЦР-исследований. Получено значение смещения порогового цикла регистрации флуоресцентного сигнала при использовании фермента УДГ относительно контрольной реакционной ПЦР-смеси без УДГ в составе ΔCt=12.0.

4. Проведены испытания разработанных ПЦР-тест-систем с использованием клинических образцов плазмы крови человека, полученных от пациентов с подтверждёнными диагнозами, а также с подтверждённым отсутствием диагноза. Для разработанной тест-системы на *HBV* использована выборка из 415 истинно положительных и 360 истинно отрицательных образцов, для тест-системы на *HCV* –

выборка из 118 истинно положительных и 118 истинно отрицательных образцов. В качестве референтных наборов сравнения использованы коммерческие наборы, имеющие РУ, «РеалБест ВГВ ПЦР» и «РеалБест ВГС ПЦР». Показана высокая корреляция результатов, получаемых с использованием вышеуказанных коммерческих наборов и с применением разработанных тест-систем. Проведён анализ Бланда-Альтмана, показывающий отсутствие различий между исследуемыми тест-системами согласно выбранному критерию (значению порогового цикла Ct).

5. Определены аналитические и диагностические характеристики разработанных тест-систем. При определении аналитической специфичности *in silico* показано отсутствие потенциальной возможности амплификации подобранных систем праймеров и зондов на матрицах НК близкородственных микроорганизмов и других возбудителей гемотрансмиссивных инфекций, а также на ДНК *Homo sapiens*. Аналитическая чувствительность разработанных тест-систем составила 50 МЕ/мл при выделении ДНК из 100 мкл плазмы крови или 5 МЕ/мл при выделении из 1 мл плазмы крови (для *HBV*) и 100 МЕ/мл при выделении РНК из 100 мкл плазмы крови или 9 МЕ/мл при выделении из 1 мл плазмы крови (для *HCV*). Диагностическая чувствительность составила 96,4% для тест-системы *HBV* и 97,5% для тест-системы *HCV*. Диагностическая специфичность составила 98,3% для тест-системы *HBV* и 98,3% для тест-системы *HCV*. Полученные расчётные значения подтверждены путём построения ROC-кривых и перерасчёта значений ДЧ и ДС с использованием ROC-анализа ($P < 0,05$).

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Система контроля качества пробоподготовки и результатов анализа при диагностике вирусных гепатитов В и С методом ПЦР в реальном времени / **А. С. Мороз**, В. А. Торопов, В. Н. Большаков, Е. Б. Аронова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т. 28, № 3. – С. 38-44. – DOI 10.29296/25877313-2025-03-05

2. Диагностические характеристики тест-системы для определения вирусного гепатита В методом ПЦР в реальном времени по результатам анализа клинических образцов / **А. С. Мороз**, В. А. Торопов, А.С. Романов, М.К. Идутова, А.В. Лисок, В. Н. Большаков, Е. Б. Аронова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2025. – Т.28, № 12. – С. 84-89. – DOI 10.29296/25877313-2025-12-10

3. Подбор состава компонентов лиофильной формы ПЦР-тест-системы для выявления вируса гепатита В/ **А. С. Мороз**, Э. С. Грибченко, М.К. Идутова, В. Н. Большаков, Е. Б. Аронова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2026. – Т. 29, № 5. – С. 129-135. – DOI 10.29296/25877313-2026-05-03

Публикации в изданиях, индексируемых в РИНЦ:

4. **Курочкина, А. С.** Выявление вируса гепатита В в плазме крови методом ПЦР в реальном времени / А. С. Курочкина, Е. Б. Аронова // Биотехнологии и безопасность в техносфере: Сборник материалов Всероссийской конференции: в 2 частях, Санкт-Петербург, 02–03 марта 2022 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 2022. – С. 67-70

5. **Мороз, А. С.** Исследование влияния замены компонентов ПЦР- смеси для определения ДНК вирусного гепатита В методом ПЦР в реальном времени / А. С. Мороз, М. А. Мерхасина, Е. Б. Аронова // LifeSciencePolytech: Тезисы докладов Всероссийской научной очно-заочной конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых, Санкт-Петербург, 17–19 ноября 2022 года. – Санкт-Петербург: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-

Петербургский политехнический университет Петра Великого", 2023. – С. 39

6. **Мороз, А. С.** Особенности молекулярной диагностики гепатитов В и С / А. С. Мороз, Е. Б. Аронова, В. Н. Большаков // Биотехнологии и безопасность в техносфере: Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции, Санкт-Петербург, 11–12 апреля 2023 года. – Санкт-Петербург: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2023. – С. 198-199

7. Использование технологии лиофильной сушки при разработке ПЦР-тест-системы для диагностики вируса гепатита В / **А. С. Мороз**, М. К. Идутова, А. В. Лисок [и др.] // Молекулярная диагностика: Сборник трудов XI Международной научно-практической конференции, Москва, 14–16 ноября 2023 года. – Москва: АО "Сайенс Медиа Проджектс", 2023. – С. 18

8. Особенности молекулярной диагностики вирусных гепатитов В и С / **А. С. Мороз**, М. К. Идутова, В. А. Торопов [и др.] // Наукоемкие лабораторные технологии для клинической медицины: Материалы XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 20–22 марта 2023 года / Под редакцией В. В. Долгова. – Москва: Блок-Принт, 2023. – С. 126-127

9. Мультиплексная тест-система для диагностики вирусных гепатитов В и С методом ПЦР в реальном времени / **А. С. Мороз**, В. А. Торопов, М. К. Идутова [и др.] // Вирусные гепатиты - достижения и новые перспективы: Сборник тезисов XIV Всероссийской конференции с международным участием, Москва, 12–13 сентября 2024 года. – Москва: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, 2024. – С. 69-70

10. **Мороз, А. С.** Оценка стабильности ПЦР-тест системы для диагностики вируса гепатита В при хранении в лиофилизированной форме / А. С. Мороз // БиоТех-2024: тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 16–19 апреля 2024 года. – Санкт-Петербург: Политех-Пресс, 2024. – С. 56

11. Мерхасина, М. А. Оценка робастности тест-системы для определения РНК вирусного гепатита С методом ПЦР в реальном времени / М. А. Мерхасина, **А. С. Мороз**, Е. Б. Аронова // БиоТех-2024: тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 16–19 апреля 2024 года. – Санкт-Петербург: Политех-Пресс, 2024. – С. 55

12. Мерхасина, М. А. Оценка аналитической чувствительности тест-системы для определения РНК вирусного гепатита с методом ПЦР в реальном времени / М. А. Мерхасина, **А. С. Мороз**, Е. Б. Аронова // БиоТех-2024: тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 16–19 апреля 2024 года. – Санкт-Петербург: Политех-Пресс, 2024. – С. 54

13. Сравнение различных отечественных наборов выделения нуклеиновых кислот при исследовании плазмы крови на наличие вируса гепатита В / **А. С. Мороз**, Н. В. Березенкова, В. А. Торопов [и др.] // Интерпретация результатов лабораторных исследований: Материалы XXIX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 01–03 апреля 2024 года. – Москва: Блок-Принт, 2024. – С. 196-197

14. Мерхасина, М. А. Оценка стабильности тест-системы для определения РНК вирусного гепатита С методом ПЦР в реальном времени при отложенном старте / М. А. Мерхасина, **А. С. Мороз** // БиоТех-2024: тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 16–19 апреля 2024 года. – Санкт-Петербург: Политех-Пресс, 2024. – С. 11

Список сокращений и условных обозначений:

Ct –количество циклов репликации, необходимое для формирования флюоресцентного сигнала, специфичного для исследуемого аналита
HBV – вирус гепатита В
HCV – вирус гепатита С
ВГВ – вирусный гепатит В
ВГС – вирусный гепатит С
ВКО – внутренний контрольный образец
ДИ – доверительный интервал
ИФА – иммуноферментный анализ
МЕ – международная единица
НК – нуклеиновая кислота
ОКО – отрицательный контрольный образец
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
УДГ – урацил-ДНК-гликозилаза
цкПЦР – цифровая капельная полимеразная цепная реакция