



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118447** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 01655**

(22) Дата подання заявки: **21.02.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.08.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.08.2017, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

**Комісаренко Сергій Васильович (UA),
Колибо Денис Володимирович (UA),
Редчук Тарас Анатолійович (UA),
Галкін Олександр Юрійович (UA),
Олійник Олена Сергіївна (UA),
Романюк Світлана Іванівна (UA),
Сіромолот Андрій Андрійович (UA),
Чудіна Тетяна Олександрівна (UA),
Луговська Наталія Едуардівна (UA),
Фещенко Юрій Іванович (UA),
Рекалова Олена Михайлівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ,
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01030 (UA)**

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ІМУНОФЕРМЕНТНА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

(57) Реферат:

Тест-система імуноферментна для кількісного визначення антитіл до *Mycobacterium tuberculosis* у сироватці або плазмі крові людини методом непрямого твердофазного імуноферментного аналізу включає імуносорбент, кон'югат антивидових антитіл із ферментом і набір реагентів для імуноферментного аналізу. При цьому імуносорбент виготовлено на основі високоімуногенного та високоспецифічного до антитіл проти *Mycobacterium tuberculosis* рекомбінантного генетично злитого антигену MPT63-MPT83 *Mycobacterium tuberculosis*.

UA 118447 U

Корисна модель належить до біотехнології, імунохімії та медицини і може бути використана для виявлення антитіл до збудника туберкульозу людини *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) у сироватці або плазмі крові людини методом непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

5 Туберкульоз - одне з найбільш небезпечних захворювань, що поширене в усіх країнах світу та за даними ВООЗ є другою за значимістю причиною смертності від одного інфекційного агента, поступаючись лише ВІЛ/СНІДу. Дане захворювання здатна викликати група мікроорганізмів під загальною назвою *Mycobacterium tuberculosis complex*, основним представником якої є збудник туберкульозу людини - *M. tuberculosis*. Ним інфікована практично третина населення Землі [1], і приблизно кожну секунду виникає новий випадок інфекції [2]. В Україні епідемія туберкульозу на сьогодні стала національною проблемою. Тільки за офіційними даними число хворих на туберкульоз перевищує 1 % населення, кожного року їх кількість збільшується на 40 тис, а вмирає понад 10 тис осіб [3]. У розвинених країнах усе більша частина людей заражається туберкульозом, оскільки їх імунна система слабшає через прийом

15 імуносупресивних ліків і, особливо, у разі ВІЛ-інфекції.

Діагностика туберкульозу заснована на мікробіологічному дослідженні біологічного матеріалу, рентгенологічних методах, шкірній туберкуліновій пробі (реакції Манту), методах молекулярно-генетичного аналізу (полімеразна ланцюгова реакція), серологічних методах тощо. Але мікробіологічне дослідження мокроти дозволяє виявити лише активну форму туберкульозу, на ранній стадії хвороби воно не є ефективним. Рентгенологічні дослідження дають більш високу точність у діагностиці, але вони також ефективні на більш пізніх етапах захворювання. Молекулярно-генетичні методи, в основному, використовують при підтвердженні інфекції для встановлення чутливості *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів. Для проведення скринінгу населення на наявність інфікованості *M. tuberculosis* використовують шкірну туберкулінову пробу та серологічні методи. В Україні туберкулінодіагностика залишається основним методом раннього виявлення туберкульозу у дітей, її проводять дітям до 18 років [4]. При цьому протипоказанням для проведення туберкулінових проб є шкірні захворювання, гострі та хронічні інфекційні захворювання у період загострення, алергічний стан (ревматизм у гострій і підгострій фазах, бронхіальна астма, ідіосинкразія з вираженими шкірними ознаками, епілепсія) [5]. Тому через можливі прояви побічних реакцій все частіше спостерігаються випадки відмови від туберкулінової проби.

Але зазначені категорії пацієнтів також мають підлягати скринінговим дослідженням. Для цього можна використовувати серологічні тест-системи, засновані на методах імунохроматографії або ІФА, які дозволяють виявляти в крові або сироватці пацієнтів антитіла проти *M. tuberculosis* і можуть бути важливим комплементарним способом скринінгу населення. Такі тест-системи мають містити в складі імуносорбенту високоімуногенні антигени *M. tuberculosis*, які не характерні для непатогенних видів мікобактерій. Тест-системи, засновані на імунохроматографічних методах, наприклад, SeroChek (Індія), TB-Sheck-I (Австрія) та ін. [6, 7], дають лише якісну характеристику, тому для кількісного аналізу вмісту антитіл до *M. tuberculosis* краще застосовувати тест-системи, засновані на методі ІФА. В Україні застосовують імуноферментні тест-системи "АТ-Туб-Бест" (Росія), "ІФА-анти-Туб" (Росія) та "Туб-АТ-МБА" (Україна) [8-10], засновані на методі ІФА, в яких до складу сорбенту входять антигени, виділені з очищених штамів *Mycobacterium*. Але, виділення антигенів із очищених штамів потребує культивування потенційно небезпечного збудника, що несе певну біологічну небезпеку, займає багато часу та є трудомістким процесом, при цьому чутливість і специфічність таких тест-систем є недостатньо високою.

Відомо імуноферментні тест-системи, в яких до складу імуносорбенту входять рекомбінантні аналоги антигенів *M. tuberculosis* та їхні коктейлі [11-12]. Застосування рекомбінантних аналогів антигенів *M. tuberculosis* дозволяє значно знизити собівартість тест-систем і підвищити їх специфічність, а їх одержання не несе інфекційної загрози для оточуючих. Проте, не всі антигени *M. tuberculosis*, що застосовуються в таких тест-системах, мають достатню імуногенність та забезпечують необхідну чутливість і специфічність тест-систем. Крім того, використання коктейлів антигенів у твердофазних тест-системах знижує ефективність розпізнавання деяких окремих антигенів, що входять до їх складу, через недостатнє експонування епітопів цих антигенів у зв'язку з їхньою низькою сорбційною здатністю, обумовленою малою молекулярною масою.

Злиті антигени мають більшу молекулярну масу, а тому й кращі сорбційні властивості, ніж окремі антигени, та краще експонуються антигенних детермінант на твердій фазі, що забезпечує більш високу чутливість тест-системи. До того ж у злитих антигенах складові представлені в еквівалентній кількості, що дозволяє контролювати співвідношення антигенних

детермінант. Крім того, одержання генетично злитих рекомбінантних антигенів є більш економічно вигідним, ніж одержання декількох індивідуальних антигенів. Це обумовлює необхідність створення чутливих та недорогих тест-систем для виявлення антитіл до *M. tuberculosis* із генетично злитими високоімуногенними рекомбінантними антигенами *M. tuberculosis* у складі імуносорбенту.

Відомо тест-систему, вибрану як найближчий аналог, у якій у складі імуносорбенту використовують коктейль рекомбінантних антигенів *M. tuberculosis*: MPT63, MTB48 і генетично злитого антигену ESAT6-CFP10 [13]. Проте, антигени ESAT6 і CFP10 не мають достатньої імуногенності через невеликі розміри (6 кДа та 10 кДа відповідно), а тому не забезпечують необхідну чутливість тест-системи, а антигени MPT63 та MPT48 у складі коктейлю також не можуть проявити достатню чутливість.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу створити високочутливу та високоспецифічну імуноферментну тест-систему для виявлення антитіл до збудника туберкульозу людини *M. tuberculosis* у сироватці або плазмі крові методом непрямого твердофазного ІФА з використанням імуносорбенту власної розробки.

Поставлену задачу вирішують шляхом застосування в непрямому твердофазному ІФА одержаного в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України рекомбінантного антигену *M. tuberculosis* у складі імуносорбенту. Рекомбінантний антиген *M. tuberculosis* є генетично злитим химерним протеїном MPT63-MPT83, що складається з послідовностей двох імунодомінантних антигенів *M. tuberculosis* MPT63 та MPT83 [14]. Ці антигени є високоімуногенними та не характерними для непатогенних видів мікобактерій. Антиген MPT63 є секреторним білком, а антиген MPT83 - поверхневим білком бактерій. Отже, одночасне використання обох антигенів у складі імуносорбенту дозволяє одночасно оцінювати імунну відповідь як до секреторних, так і до мембранних білків патогену, і, таким чином, діагностувати інфекцію на різних стадіях прояву. Злитий антиген MPT63-MPT83 *M. tuberculosis* має антигенні властивості своїх складових та, в порівнянні з ними, значно вищі сорбційні властивості, що обумовлено кращим експонуванням епітопів, чим забезпечується вищий рівень сигналу в ІФА, а, отже, й чутливість тест-системи. У складі кон'югату в даній тест-системі використовують антивидові моноклональні антитіла. Візуалізацію утворених імунних комплексів проводять шляхом дії хромогену, наприклад, 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ).

До складу тест-системи, що заявляється, входить:

- ІФА-планшет стріповий з іммобілізованим рекомбінантним протеїном MPT63-MTB83 *M. tuberculosis*;

- позитивний контроль - мікропробірка, що містить розчин імуноглобулінів, специфічних до *M. tuberculosis*;

- негативний контроль - мікропробірка, що містить сироватку крові без імуноглобулінів, специфічних до *M. tuberculosis*;

- розчин для розведення сироваток PPC - у флаконі;

- розчин кон'югату, що містить розчин антивидових моноклональних антитіл, кон'югованих з ферментом - у флаконі;

- розчин ТМБ-субстрату - у флаконі;

- концентрат розчину для промивання Tw20 (20x) - у флаконі;

- стоп-реагент - у флаконі;

- клейка плівка;

- бланк внесення проб.

Виявлення антитіл до збудника туберкульозу *M. tuberculosis* у сироватці або плазмі крові людини з використанням тест-системи, що заявляється, проводять згідно методики, заснованої на непрямому твердофазному ІФА [15], як описано в Прикладі.

Приклад

Виявлення антитіл до збудника туберкульозу *M. tuberculosis* у сироватці людини.

До лунок стрипів вносять по 90 мкл розчину для розведення сироваток. Після цього до необхідних лунок вносять по 10 мкл відповідних контролів та досліджуваних зразків сироваток крові. Стрипи інкубують протягом 30 хв. при температурі 37 °С. Після закінчення інкубації промивають лунки п'ять разів розчином для промивання із використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки. Далі до лунок стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи інкубують протягом 30 хв. при температурі 37 °С. Після закінчення інкубації лунки стрипів промивають п'ять разів розчином для промивання. Далі до лунок вносять по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату. Інкубують ІФА-планшет протягом 30 хв. у темному місці при температурі 18-25 °С. Реакцію зупиняють шляхом внесення до лунок стрипів по 100 мкл стоп-реагенту. Далі вимірюють оптичну густину реакційної суміші за допомогою багатоканального

спектрофотометра у кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450 та 620 нм через 5 хв. після зупинення реакції або в одноквільовому режимі при довжині хвилі 450 нм, при цьому залишають лунку для встановлення бланку, до якої вносять лише розчин ТМБ та стоп-реагент.

Для обліку результатів і їх інтерпретації спочатку визначають достовірність результатів аналізу. Розраховують середнє значення негативного контролю за формулою:

$$\text{ОГ } K_{\text{середнє}} = (\text{ОГ } K_{-1} + \text{ОГ } K_{-2} + \text{ОГ } K_{-3})/3, \quad (1)$$

де:

- ОГ $K_{\text{середнє}}$ - середнє значення оптичної густини в лунці з негативним контролем;
- ОГ K_{-1} - значення оптичної густини в лунці з негативним контролем № 1;
- ОГ K_{-2} - значення оптичної густини в лунці з негативним контролем № 2;
- ОГ K_{-3} - значення оптичної густини в лунці з негативним контролем № 3.

Результати аналізу вважають достовірними, якщо:

- оптична густина позитивного контролю (ОГ K_{+}) не нижча 0,8 оптичних одиниць,
- оптична густина в лунках з негативним контролем (ОГ K_{-}) не вища за 0,15 оптичних одиниць,
- оптична густина кожного значення негативного контролю (K_{-n}) відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю (ОГ $K_{\text{середнє}}$), тобто:

$$\text{ОГ } K_{\text{середнє}} \times 0,5 \leq \text{ОГ } K_{-n} \leq \text{ОГ } K_{\text{середнє}} \times 2,0. \quad (2)$$

Якщо одне зі значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K за рештою значень негативного контролю.

Облік результатів аналізу проводять наступним чином. Рівень граничного значення (Cut off) розраховують, додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,2, тобто:

$$\text{Граничне значення} = \text{ОГ } K_{\text{середнє}} + 0,2. \quad (3)$$

Для кожного досліджуваного зразка розраховують індекс позитивності (ІП):

$$\text{ІП} = \frac{\text{ОГ досліджуваного зразка}}{\text{Граничне значення}}. \quad (4)$$

Досліджувані зразки зі значенням ІП, що вище 1,1, вважають позитивними щодо наявності специфічних антитіл до *M. tuberculosis* (ІП>1,1). Зразки зі значенням ІП, що нижче 0,9, вважають негативними щодо наявності специфічних антитіл до *M. tuberculosis* (ІП<0,9). Зразки зі значенням ІП в межах 0,9-1,1 вважають невизначеними (0,9≤ІП≤1,1). Невизначені сироватки досліджують повторно в двох лунках стрипу.

Позитивний результат у дослідному зразку тест-системи для виявлення антитіл до *M. tuberculosis* є свідченням наявності антитіл, специфічних до *M. tuberculosis*.

Негативний результат у дослідному зразку тест-системи для виявлення антитіл до *M. tuberculosis* свідчить про відсутність у сироватці крові обстежуваної людини антитіл, специфічних до *M. tuberculosis*, або концентрація специфічних антитіл нижче межі чутливості аналізу.

У результаті проведеного дослідження виявлено, що позитивні значення ІП, а, отже, й наявність специфічних антитіл до *M. tuberculosis*, спостерігається лише в пацієнтів із підтвердженням за допомогою інших існуючих діагностичних методів туберкульозу легенів. У здорових донорів значення ІП є негативним, а отже, відсутні підвищені титри специфічних антитіл до *M. tuberculosis*. Також майже не спостерігається підвищений рівень антитіл до *M. tuberculosis* у пацієнтів, хворих на нетуберкульозне ураження дихальних шляхів (фіг.).

Перевагами тест-системи імуноферментної, що заявляється, є:

- висока чутливість тест-системи (до 90 %);
- використання високоімуногенного та специфічного рекомбінантного антигену *M. tuberculosis* власного дизайну;
- автоматичне кількісне визначення антитіл до *M. tuberculosis*;
- швидке виконання аналізу (до 3 годин);
- простота та надійність в роботі.

Таким чином, тест-система, що заявляється, включає використання рекомбінантного злитого антигену МРТ63-МРТ83 для проведення серодіагностики захворюваності на

туберкульоз та базується на виявленні рівня специфічних антитіл до імунодомінантних антигенів *M. tuberculosis*. Ця тест-система забезпечує швидке й точне виявлення в сироватці або плазмі крові людини антитіл до *M. tuberculosis*, що має важливе значення для скринінгу населення на інфікованість *M. tuberculosis* і виявлення пацієнтів із латентним перебігом туберкульозу. Тест-система проста та надійна в роботі, має високу чутливість і специфічність.

Джерела інформації:

1. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. / N. Engl. J. Med. 2002. 347 (23). - P. 1860-6. DOI:10.1056/NEJMcp021045. PMID 12466511.

2. Tuberculosis. World Health Organization (2007). Fact sheet № 104. <http://www.who.int/tb/publications/factsheets/en/>.

3. Гордієнко С.М. "Туберкулёз. Оценка ситуации". Медична газета "Здоров'я України", <http://health-ua.com/articles/850>.

4. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 16.09.2011 № 595 "Про порядок проведення профілактичних щеплень в Україні та контроль якості й обігу медичних імунобіологічних препаратів".

5. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 29.07.1996 р. № 233 "Про затвердження інструкцій щодо надання медико-санітарної допомоги хворим на туберкульоз".

6. Chakraborty N., Bhattacharyya S., De C, Mukherjee A. et al. A rapid immunochromatographic assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in pulmonary samples from HIV seropositive patients and its comparison with conventional methods / J. Microbiol. Meth. - 2009. - 76, № 1. - P. 12-17.

7. Pat. CN105203522 (A) - 2015-12-30 Quantum dot quantitative detection kit of *Mycobacterium tuberculosis*.

8. С.Е. Гладкова, С.С. Решетников, В.Н. Пряхина. Опыт применения тест-системы "АТ-Туб-Бест" для диагностики туберкулёза / Медицина РФ. - 2011. - С. 5(61). - С. 22-25.

9. Тест-система иммуноферментная для обнаружения антител к возбудителю туберкулеза <http://www.dntpasteur.ru/7-010201.html>.

10. "Туб-АТ-МБА" Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до мікобактерій туберкульозу (96 досліджень) / <http://www.moz.gov.ua/docfiles/N20042012n287dodatok.pdf>.

11. Pat. CN1866023 (A) - 2006-11-22. Method for synchronous detection of multiple tubercle bacillus specific secretion antigens.

12. Pat. CN101735321 (A) - 2010-06-16 Polypeptide composition and application thereof in detecting tuberculosis antibody.

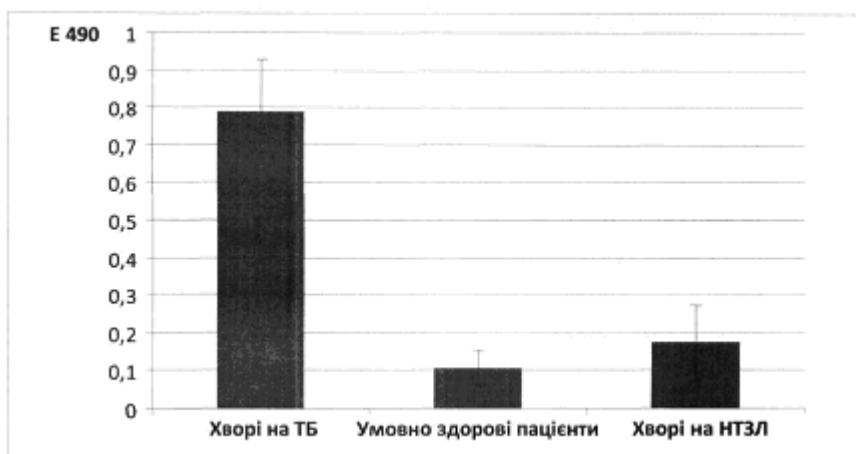
13. Pat. CN101382548 (A) - 2009-03-11. Tuberculosis antibody multi-antigen ELISA detecting kit and making method.

14. Redchuk T., Korotkevich N., Gorbatiuk O., Gilchuk P., Kaberniuk A., Oliynyk O., Kolibo D., Komisarenko S. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* proteins MPT63 and MPT83 as a fusion: purification, refolding and immunological characterization / J. Applied Biomedicine. - 2012. - 10. - P. 169-176.

15. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. - Москва: Высшая школа. - 1991. - 288 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Тест-система імуноферментна для кількісного визначення антитіл до *Mycobacterium tuberculosis* у сироватці або плазмі крові людини методом непрямого твердофазного імуноферментного аналізу, що включає імуносорбент, кон'югат антивидових антитіл із ферментом і набір реагентів для імуноферментного аналізу, яка **відрізняється** тим, що імуносорбент виготовляють на основі високоімуногенного та високоспецифічного до антитіл проти *Mycobacterium tuberculosis* рекомбінантного генетично злитого антигену MPT63-MPT83 *Mycobacterium tuberculosis*.



Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601