

Винахід належить до біотехнології, імунохімії та медицини і може бути використаний для виявлення імуноглобулінів класу G проти вірусу герпесу 1-го і 2-го типів у сироватці крові людини; винахід може бути застосований у клініці для постановки та підтвердження діагнозу первинної або рецидивної герпетичної інфекції, а також для проведення сероепідемічних досліджень.

В Україні тест-системи для виявлення зараженості людей вірусом герпесу не виробляються. В Росії випускається тест-система "ВектоВПГ-IgG-стрип" (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибірськ), в складі якої на твердій фазі знаходяться білки-антигени вірусу герпесу; сироватки досліджуються після попереднього розведення 1:100, а як кон'югат беруть антивидові антитіла проти імуноглобулінів класу G людини, мічені пероксидазою [1].

В основу винаходу покладено завдання створити імуноферментну тест-систему на основі імуносорбенту з сумішшю очищених мембранних білків-антигенів вірусу герпесу 1-го і 2-го типів. Антигени сорбують на поверхні полістиролових планшетів. Досліджувані сироватки використовують в розведенні 1:50. Як кон'югат беруть моноклональні антитіла проти імуноглобулінів людини класу G, мічені ферментом. Ферментативну реакцію визначають за допомогою субстратного розчину з хромогеном. За одну постановку (2 години) можна проаналізувати 91 сироватку.

Приклад 1

Визначення антитіл проти вірусу герпесу в сироватці крові хворої О., 1975 року народження.

Визначення проводять за відомою методикою [2] твердофазного імуноферментного аналізу. Для цього вносять у лунки планшета-імуносорбента з фіксованою на ньому сумішшю білків-антигенів вірусу герпесу 1-го і 2-го типів по 100мкл розведених (1:50) сироваток для виявлення антитіл класу G (IgG).

В дві лунки вносять по 100мкл позитивного контрольного зразка, а в три лунки - по 100мкл негативного контрольного зразка.

Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37°C протягом 60хв.

Після закінчення інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання планшетів.

В лунки планшета вносять по 100мкл розчину моноклонального кон'югату проти імуноглобулінів людини, мічених ферментом, та інкубують планшет при 37°C у термостаті 30хв.

Після закінчення інкубації промивають лунки шість разів і вносять по 100мкл розчину проявника (субстратний розчин з хромогеном) та інкубують при 18-22°C у темряві 30хв.

Зупиняють кольорову реакцію, вносячи до всіх проб по 100мкл стоп-реагента.

Не більш як через 1хв. після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) в лунках у двоххвиловому режимі за допомогою спектрофотометра. Значення ОГ зразка прямо пропорційне кількості антитіл у сироватці.

Значення кількості антитіл проти вірусу герпесу в сироватці хворої, визначене при застосуванні нашої тест-системи, порівнювали зі значеннями, отриманими при використанні тест-системи виробництва ЗАО "Вектор-Бест" (Росія).

Досліджені сироватки хворої було ідентифіковано як позитивні на наявність антитіл класу IgG проти антигенів вірусу герпесу.

Приклад 2

Визначення чутливості та специфічності пропонованої тест-системи.

Використовуючи названі тест-системи, досліджували сироватки крові (по 20 достеменно позитивних та 100 достеменно негативних сироваток). Усі сироватки досліджували у двох повторностях кожною тест-системою за описаною методикою. Усі 20 позитивних сироваток показали наявність антитіл проти вірусу герпесу, що складає 100% чутливості. З 100 негативних сироваток у пропонованій тест-системі виявилися справді негативними всі 100 (специфічність - 100%). В порівнюваній тест-системі з Росії з 20 достеменно позитивних сироваток 20 були позитивними (чутливість 100%), але з 100 негативних сироваток 2 сироватки були визначені як хибно-позитивні. Специфічність порівнюваної тест-системи становила 98%.

Таким чином, пропонована тест-система забезпечує виявлення антитіл класу IgG проти антигенів вірусу герпесу у сироватках людей. Проста і надійна в роботі, проявляє високу чутливість та специфічність.

Використана література

1. Инструкция по применению тест-системы "ВектоВПГ-IgG-стрип" производства ЗАО "Вектор-Бест", п. Кольцово, Новосибирской обл., 2003, 3с.

2. А.Т.Михайлов, В.Н.Симирский "Методы иммунохимического анализа в биологии развития". М. "Наука", 1981.