

Винахід належить до біотехнології, імунохімії та медицини і може бути використаний в клініці для підтвердження діагнозу і моніторингу лікування ВІЛ-інфекції та СНІДу, а також для науково-дослідних робіт.

В Україні тест-системи для виявлення антигенів ВІЛ не виробляють. Існує тест-система "Elavia AgI" виробництва "Sanofi Diagnostics Pasteur" (Франція) для детекції антигену вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ-1) методом імуноферментного аналізу [1], в якій на полістироловий планшет сорбовані поліклональні антитіла проти ВІЛ-1, а як кон'югат використовують біотинільовані антитіла проти ВІЛ-1 та стрептавідин, зв'язаний з пероксидазою.

В основу винаходу покладено завдання створити імуноферментну тест-систему на основі імуносорбенту з сорбованими моноклональними антитілами проти антигену р24 ВІЛ. До складу кон'югату входять, або біотинільовані моноклональні антитіла проти ВІЛ та стрептавідин, зв'язаний з пероксидазою або моноклональні антитіла до інших епітопів ВІЛ, мічені ферментом; як позитивний контроль використовують рекомбінантний поліпептид аналог білка р24 ВІЛ з відомою концентрацією.

Ферментативну реакцію визначають за допомогою субстратного розчину з хромогеном. За одну постановку (2 години) можна проаналізувати 91 пробу досліджуваного матеріалу.

Приклад 1. Визначення антигена р24 ВІЛ у сироватці крові хворої К., 1977 року народження.

Визначення проводять за відомою методикою [2] твердофазного імуноферментного аналізу. Для цього вносять у лунки планшета-імуносорбенту з фіксованими на ньому моноклональними антитілами проти р24 ВІЛ по 100мкл досліджуваного матеріалу від хворої для виявлення в ньому антигену р24 вірусу імунодефіциту людини та контрольні зразки (2 позитивних з відомою концентрацією антигену р24 ВІЛ і 3 негативних). Потім в усі лунки додають по 10мкл 5% тритону Х 100 для руйнування вірусних часточок та імунних комплексів.

Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37-40 °С протягом 2 год.

Після закінчення інкубації в усі лунки додають кон'югат біотинільованих моноклональних антитіл проти р24 і знов інкубують в тих же умовах 2 год. Видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання планшетів.

У лунки планшета вносять по 100мкл кон'югату - стрептавідину, зв'язаного з пероксидазою, та інкубують планшет у термостаті 30хв при 37-40°С.

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

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

Не більш як через 1хв. після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) в лунках у двоххвильовому режимі за допомогою спектрофотометра. Значення ОГ зразка прямо пропорційне кількості антигена р24 вірусу імунодефіциту людини у сироватці.

Приклад 2. Визначення антигена р24 ВІЛ у сироватці крові хворої К., 1977 року народження

Визначення проводили аналогічно прикладу 1, але замість біотинільованих моноклональних антитіл та стрептавідину, зв'язаного з пероксидазою використовували кон'югат моноклональних анти-р24 антитіл, мічених ферментом

Результати визначення антигену р24 ВІЛ в сироватці хворої, визначене при застосуванні нашої тест-системи, порівнювали з даними, отриманими при використанні тест-системи "Elavia AgI" виробництва "Sanofi Diagnostics Pasteur" (Франція). Досліджені сироватки хворої було ідентифіковано як позитивні на наявність антигену р24 вірусу імунодефіциту людини; концентрація р24 перевищує 10пкг/мл.

Приклад 3. Визначення чутливості та специфічності запропонованої тест-системи

Використовуючи названі тест-системи, досліджували сироватки крові (по 20 достеменно позитивних та 100 достеменно негативних сироваток). Усі сироватки досліджували у двох повторностях кожної тест-системою за описаною методикою. Обидві тест-системи показали однакові результати: в 20 позитивних сироватках виявлено антиген р24 ВІЛ з концентрацією від 30пкг/мл та більше, що складає 100% чутливості. З 100 негативних сироваток від донорів, вагітних жінок та хворих на алергічні та імунні захворювання виявилися справді негативними 100 (специфічність - 100%).

Таким чином, запропонована тест-система забезпечує виявлення антигена р24 вірусу імунодефіциту людини в досліджуваному матеріалі. Проста і надійна в роботі, проявляє високу чутливість та специфічність.

Використана література

1. Инструкция по применению тест-системы "Elavia AgI - kit for detection of HI VI Ag by enzyme immunoassay" виробництва "Sanofi Diagnostics Pasteur" (Франція) 2002, 17с.

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