

Винахід належить до біотехнології, імунохімії та медицини і може бути застосований у клініці для постановки та підтвердження діагнозу первинної або рецидивної цитомегаловірусної інфекції, а також для проведення сероепідемічних досліджень.

В Україні тест-системи для виявлення зараженості людей цитомегаловірусною інфекцією не виробляється. В Росії випускається тест-система "ВектоУМВ-IgG-стрип" (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибірськ), в складі якої на твердій фазі використовується рекомбінантний поліпептид-аналог цитомегаловірусного білку; 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 очищеними рекомбінантними поліпептидами р28 та р150 аналогами мембранних білків-антигенів цитомегаловірусу. Суміш антигенів сорбують на поверхні полістиролових планшетів. Досліджувані сироватки розводять 1:10. В складі кон'югатів використовують 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 88 сироваток.

Приклад 1.

Визначення антитіл проти цитомегаловірусу у сироватці крові хворої Л. 1977 року народження.

Визначення проводять за відомою методикою [2] твердофазного імуноферментного аналізу. Для цього вносять у лунки планшета-імуносорбента з фіксованими на ньому рекомбінантними поліпептидами аналогами мембранних антигенів цитомегаловірусу по 90мкл розчину для розведення сироваток та по 10 мкл сироватки крові хворої для виявлення антитіл класу G (IgG) та контрольні зразки - в 2 лунки позитивний та в 3 лунки негативний контроль.

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 пероксидазою, та інкубують планшет при 37°C у термостаті 30хв.

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

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

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

Наявність антитіл проти цитомегаловірусу у сироватці хворої, визначене при застосуванні нашої тест-системи, порівнювали зі значеннями, отриманими при використанні тест-системи виробництва ЗАО "Вектор-Бест" (Росія). Досліджена сироватка хворої було ідентифіковано як позитивна на наявність антитіл проти антигенів цитомегаловірусу.

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 цитомегаловірусу, що складає 100% чутливості. З 100 негативних сироваток виявилися справді негативними всі 100 (специфічність - 100%) у пропонованій тест-системі. В порівнюваній тест-системі з Росії з 20 достеменно позитивних сироваток 19 були позитивними. Одну низькотитражну сироватку не виявлено. Чутливість тест-системи становила 95%. З 100 негативних сироваток - 1 сироватка була виявлена як хибнопозитивна. Специфічність порівняльної тест-системи становила 99%.

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

Використана література

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

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