

Винахід належить до біотехнології, імунохімії та медицини і може бути використаний в клініці та станціях переливання крові для аналізу наявності антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В.

Відома тест-система "anti-HBc HUMAN ELISA test" виробництва "Human Gesellschaft fur Biochemica und Diagnostica" (Німеччина) для детекції анти-HBc антикорових антитіл вірусу гепатиту В у сироватці або плазмі крові людини методом імуноферментного аналізу [1], в якій на полістироловий планшет сорбовано рекомбінантний HBc-антиген, а як кон'югат використовують поліклональні антитіла проти HBc, мічені пероксидазою.

В основу винаходу покладено завдання створити імуноферментну тест-систему на основі імуносорбенту з сорбованими рекомбінантними поліпептидами аналогами корового антигена вірусу гепатиту В (HBcore). При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток IgG и IgM антитіла, специфічні до HBcore антигену, зв'язуються з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічного імуноферментного кон'югату - суміші моноклональних антитіл проти імуноглобулінів класу G та M людини, мічених ферментом. Ферментативну реакцію визначають за допомогою субстратного розчину з хромогеном. За одну постановку можна проаналізувати 91 пробу досліджуваного матеріалу.

Приклад 1

Визначення антитіл проти HBcore в 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 рекомбінантними поліпептидами аналогами корового антигена вірусу гепатиту В по 80мкл розчину для розведення сироваток та по 20мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролів). В дві лунки (A1, B1) вносять по 20мкл позитивного контролю, а в три інші (C1, D1, E1) - по 20мкл негативного контролю. Після внесення зразків відбувається зміна кольору розчину в лунках. Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37°C протягом 60 хвилин.

Після закінчення інкубації в усі лунки додають кон'югат - суміш моноклональних антитіл проти імуноглобулінів класу G та M людини, мічених ферментом і знов інкубують в тих же умовах 30год. Видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання планшетів.

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-реагенту.

Не більш як через 1хв. після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) в лунках у двохвильовому режимі за допомогою спектрофотометра. Значення ОГ зразка прямо пропорційне кількості анти-HBcore у сироватці. Результати визначення антитіл проти корового антигену вірусу гепатиту В у сироватці хворої, отримані при застосуванні нашої тест-системи, порівнювали з даними, одержаними при використанні тест-системи "anti-HBc HUMAN ELISA test".

Досліджений матеріал від хворої було ідентифіковано як позитивний на наявність антитіл проти корового антигена вірусу гепатиту В.

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. Обидві тест-системи показали однакові результати: в 20 позитивних сироватках виявлено антитіла проти корового антигена вірусу гепатиту В, 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, пропонована тест-система забезпечує виявлення антитіл проти корового антигена вірусу гепатиту В у досліджуваному матеріалі. Проста і надійна в роботі, проявляє високу чутливість та специфічність.

Використана література:

1. Инструкция по применению тест-системы "anti-HBc HUMAN ELISA test" виробництва "Human Gesellschaft fur Biochemica und Diagnostica" (Німеччина) 2003, 2с.

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