



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **28009** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61K 39/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СЕРОЛОГІЧНОГО ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

1

2

(21) u200706930

(22) 20.06.2007

(24) 26.11.2007

(72) ПОЗУР ВОЛОДИМИР КОСТЯНТИНОВИЧ, UA,
СКІВКА ЛАРИСА МИХАЙЛІВНА, UA, ШПАК
ЄВГЕНІЙ ГРИГОРОВИЧ, UA, ШВЕЦЬ ЮЛІЯ
ВІКТОРІВНА, UA

(73) КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА, UA

(56)

(57) Спосіб серологічного виявлення антитіл до мікобактерій туберкульозу, який включає проведення імуноферментного аналізу для визначення рівня антитіл в досліджуваних і контрольній сироватках до мікобактеріального антигену за рівнем відносної екстинції, на основі якої визначають позитивність реакції, який **відрізняється** тим, що як антиген використовують цілі клітини вакцинного штаму *M. bovis* (BCG), які додатково фіксують етанолом.

Корисна модель належить до медицини та імунології, а зокрема до імунохімічних методів виявлення антитіл, який може бути використаний для оцінки рівня гуморальних антитіл після імунізації та профілактики туберкульозу.

В цій галузі прийнято використовувати наступні терміни та скорочення:

РПГМ - реакція пасивного гемолізу модифікована,

Екстинція - оптична густина,

Контамінація - зараження,

BCG - *Bacillum CalmetteGuerin*,

ЕТС - ембріональна теляча сироватка,

ТФБ - трисфосфатний буфер,

ОФД - ортофеніліндіамін.

Відомий спосіб прискореної серодіагностики туберкульозу великої рогатої худоби, який полягає у визначенні рівня специфічних антитіл у сироватці крові великої рогатої худоби в реакції пасивного гемолізу модифікованій (РПГМ). В реакції використовуються неінактивовані та нерозведені сироватки крові, облік результатів реакції проводиться фотометричним методом за різницею між показниками оптичної густини дослідної і контрольної проб, тривалість постановки реакції становить 5,5-6 годин (Опис до патенту №18970 U, МПК⁶ А 61 К 39/00, 2006).

Недоліками вказаного способу є: тривале виконання способу - до 6 годин; низька діагностична чутливість за рахунок використання нерозведених сироваток, які збільшують відсоток перехресної реактивності; методологічна складність.

Відомий спосіб визначення антитіл до мікобактерій туберкульозу за допомогою метода гетерогенного імуноферментного аналізу з використанням антигенів H37Rv та ESAT-6 (Морозова Т.И., Салина Т.Ю., Завалева И.И. Имуноферментный и иммунохроматографический анализы в дифференциальной диагностике туберкулёза и онкологических заболеваний органов дыхания // Пробл. туб. и болезней легких - 2003, №4. - С. 20-21.)

Недоліками вказаного способу є низька діагностична чутливість (65,4%) і специфічність (88,8%) за рахунок використання окремих антигенів мікобактерій (H37Rv та ESAT-6) та небезпека робочого персоналу внаслідок використання антигенів з вірулентних штамів *M. tuberculosis*.

Найбільш близьким аналогом корисної моделі є спосіб серологічної діагностики туберкульозу у хворих на імунодефіцит, який полягає у проведенні імуноферментного аналізу для визначення рівня антитіл в контрольній і досліджуваних сироватках до мікобактеріального антигену за рівнем відносної екстинції, на основі якої судять про позитивність реакції. Спосіб здійснюють шляхом визначення екстинції контрольної сироватки з мікобактеріальним антигеном, після якої додатково проводять реакцію цієї ж сироватки з загальним перехреснореагуючим бактеріальним антигеном і рівень екстинції її доводять до рівня екстинції з мікобактеріальним антигеном, потім досліджувану

(13) U

(11) 28009

(19) UA

сироватку ставлять в цьому ж розведенні з загальним бактеріальним антигеном, вимірюють величину відносної екстинції досліджуваної сироватки, після чого визначають коефіцієнт, який відповідає різниці у відносній екстинції між контрольною і досліджуваною сироватками при постановці реакції з загальним бактеріальним антигеном (Опис до патенту RU №97111288 А, МПК⁶ G01N33/569, 1999).

Недоліками вказаного способу є використання загального бактерійного антигену, який може зв'язувати специфічні антитіла до мікобактерій, знижуючи чутливість реакції, та складність постановки реакції за рахунок проведення додаткових маніпуляцій спрямованих на визначення коефіцієнта, який відповідає різниці у відносній екстинції між контрольною і досліджуваною сироватками при постановці реакції з загальним бактерійним антигеном.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб серологічного виявлення антитіл до мікобактерій туберкульозу шляхом використання як антигену цілих бактеріальних клітин вакцинного штаму *M. bovis* (BCG), що забезпечить виключення ризику контамінації робочого персоналу та підвищення діагностичної чутливості і специфічності за рахунок додаткової фіксації етанолом цілих мікобактеріальних клітин, які мають комплекс специфічних мікобактеріальних антигенів.

Поставлене завдання вирішується тим, що в спосіб серологічного виявлення антитіл до мікобактерій туберкульозу, який включає проведення імуноферментного аналізу для визначення рівня антитіл в досліджуваній і контрольній сироватках до мікобактеріального антигену за рівнем відносної екстинції, на основі якої визначають позитивність реакції, згідно з корисною моделлю, як антиген використовують цілі клітини вакцинного штаму *M. bovis* (BCG), які додатково фіксують етанолом.

Використання, як антигену вакцинного штаму *M. bovis* (BCG) дозволяє виключити ризик контамінації робочого персоналу та підвищити діагностичну чутливість і специфічності за рахунок додаткової фіксації етанолом цілих мікобактеріальних клітин, які несуть на собі комплекс специфічних антигенів, які утворюють імунні комплекси з специфічними антитілами.

Можливість здійснення корисної моделі ілюструється таким прикладом, який не обмежує обсяг правової охорони:

Приклад

Групу кролів імунізували за комбінованою схемою (Заявка на корисну модель u 2007 04052) імуногеном з мікобактерій туберкульозу (Опис до патенту України №17825, МПК⁶ А 61 К 39/04, 2006) після чого одержували імунні сироватки, в яких серологічно виявляли антитіла до мікобактерій туберкульозу за допомогою імуноферментного аналізу (Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. Москва, «Высшая школа», 1991, 288с).

В лунки 96-лункового плоскодонного пластикового планшета вносили по 100мкл антигена в концентрації по білку 5мкг/мл. Антиген готували в карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,6). Для адсорбції антигена до поверхні пластика планшет інкубували 18-24 год. при кімнатній температурі. Після закінчення інкубації вміст лунок зливали і планшет підсушували при кімнатній температурі. Після цього в кожну лунку на 10 хвилин вносили по 150мкл 96% етилового спирту для фіксації бактеріальних клітин на пластику планшета. Потім планшет тричі промивали трисфосфатним буфером (ТФБ) з tween-20 в концентрації 0,05%.

Блокування сайтів неспецифічного зв'язування забезпечували додаванням в лунки планшета по 150мкл 4% ембріональної телячої сироватки (ЕТС), після чого планшети промивали тричі ТФБ з детергентом.

До адсорбованого антигену додавали по 100мкл розтитрованих в ТФБ кролячих антисироваток. Планшет інкубували 1 год при 37°C Після інкубації планшет промивали тричі ТФБ з детергентом.

Для візуалізації реакції додавали антивидові (антикролячі) антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому. Планшет інкубували 30 хв при 37°C.

Ферментативну активність пероксидази визначали додаванням в кожну лунку по 100мкл субстрату-ортофеніліндіаміну (ОФД). Планшети витримували в очікуванні кольорової реакції протягом ~10 хвилин. Реакцію зупиняли 0,1 н HCl в об'ємі 50мкл.

Як контроль використовували лунки планшета без сорбованого антигену та лунки без антисироваток.

Результати реакції визначали фотометрично на плейтфотометрі типу "Reader" («BioRad») при довжині хвилі 450nm.

Спосіб серологічного виявлення антитіл до мікобактерій туберкульозу, що патентується, дозволяє проводити його технічно простими засобами і може бути здійсненим на існуючому обладнанні на плейтфотометрі.

В той же час спосіб серологічного виявлення антитіл до мікобактерій туберкульозу, що патентується, може бути використаний для оцінки рівня гуморальних антитіл після імунізації BCG.