



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40966 (13) A

(51) 7 A61K39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА НА ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ПРОТИ ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР "ІФА - АТВЕБ - СТРИП"

(21) 2000127110

(22) 11.12.2000

(24) 15.08.2001

(46) 15.08.2001, Бюл. № 7, 2001 р.

(72) Дяченко Наталія Сергіївна, Нестерова Надія Віталіївна, Загородня Світлана Дмитрівна, Баранова Галина Василівна, Рибалко Світлана Леонтіївна, Василенко Людмила Григорівна, Іванська Ноля Валіївна

(73) ДЯЧЕНКО НАТАЛІЯ СЕРГІЇВНА, НЕСТЕРОВА НАДІЯ ВІТАЛІЇВНА, ЗАГОРОДНЯ СВІТЛАНА ДМИТРІВНА, БАРАНОВА ГАЛИНА ВАСИЛІВНА, РИБАЛКО СВІТЛАНА ЛЕОНТІЇВНА, ВАСИЛЕНКО ЛЮДМИЛА ГРИГОРІВНА, ІВАНСЬКА НОЛЯ ВАЛІЇВНА

(57) 1. Імуноферментна тест-система на виявлення антитіл проти вірусу Епштейна-Барр, що містить антиген, яка **відрізняється** тим, що як антиген містить лізат лімфобластоїдних клітин, а як кон'югати - антивидові антитіла, мічені пероксидазою хрому.2. Імуноферментна тест-система за п. 1, яка **відрізняється** тим, що як антиген містить лізат лімфобластоїдних клітин В 95-8.3. Імуноферментна тест-система за п. 1, яка **відрізняється** тим, що лізат лімфобластоїдних клітин містить вірусні антигени EBNA, EA, VCA.

Винахід відноситься до медицини та може бути використаний для проведення імунологічних досліджень, зокрема діагностичних аналізів інфікованих осіб та скринінгових досліджень населення на виявлення антитіл до вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ).

Вірус Епштейна-Барр є представником родини герпесвірусів. Його роль у патології людини пов'язують з розвитком деяких форм лімфопроліферативних захворювань - лімфоми Беркіта, назофарингіальної карциноми, лімфоми Ходжкіна, посттрансплантатного синдрому. ВЕБ відноситься до СНІД-асоційованих вірусів і вносить значний вклад в розвиток цього симптомокомплексу. Існують докази, що первинна інфекція, спричинена ВЕБ, це інфекційний мононуклеоз - досить розповсюджене тяжке захворювання дитячого віку, з ураженням лімфатичної системи, гепатоспленомегалією, ангіною. Ця хвороба може супроводжуватися досить тривалим і можливо пожиттєвим збереженням вірусу в латентному стані (1).

Відомі тест-системи західних фірм «Behring ELISA», «Biotest ELISA», «Organon Teknika ELISA», «Sanofi diagnostics Pasteur S.A» для виявлення антитіл проти ВЕБ в сироватках та плазмі крові людини. Як антигени в цих тест-системах використовуються рекомбінантні білки, які дозволяють виявляти лише певні типи антигенів.

До недоліків прототипу слід віднести складність технологічного процесу одержання рекомбі-

нантних білків та багатоступінчатість виявлення антитіл проти вірусу Епштейна-Барр і, як наслідок, високу ціну таких тест-систем.

В Україні не існує вітчизняних імуноферментних тест-систем на виявлення антитіл проти ВЕБ.

В основу даного винаходу поставлена задача створити просту і надійну в роботі імуноферментну тест-систему, яка б дозволяла одночасно виявляти імуноглобуліни класів G та M (IgG, IgM) в крові інфікованих осіб, що дало б змогу визначити стадію захворювання та призначити ефективне лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що для приготування тест-системи на виявлення антитіл проти вірусу Епштейна-Барр як антиген використовують лізат лімфобластоїдних клітин В 95-8, а як кон'югати - антивидові антитіла, мічені пероксидазою хрому.

Між сукупністю ознак запропонованого винаходу і технічним результатом, якого можна досягти, існує такий причинно-наслідковий зв'язок. Лізат лімфобластоїдних клітин В 95-8, як було встановлено нами, містить повний спектр білків вірусу Епштейна-Барр, а саме: EBNA, EA, VCA. Це дозволяє при використанні його як сенсibilізатора плашок одночасно виявляти ранні та пізні білки ВЕБ, а використовуючи два кон'югати виявляти імуноглобуліни класів G та M. Що, в свою чергу,

допоможе визначити стадію захворювання та призначити ефективне лікування. Крім того, застосування в запропонованому винаході не рекомбінантних білків, а лізату значно здешевить такий діагностичний засіб, оскільки не потребуватиме додаткових технічно складних стадій очистки білків. Що, водночас, зробить спосіб приготування зазначеної імуноферментної тест-системи більш простим і доступним.

Облік результатів реакції здійснюють шляхом кількісного визначення оптичної густини досліджуваної сироватки та порівняння одержаного показника з показниками сироваток позитивного та негативного контролю, які входять до складу тест-системи.

Запропонований винахід - імуноферментна тест-система («ІФА-АтВЕБ-стрип») дозволяє диференційне визначення імуноглобулінів класу IgG та IgM до ВЕБ в сироватках крові хворих, що є перевагою даного діагностичного засобу над існуючими аналогами таких тест-систем.

Приклад 1. Визначення антитіл проти вірусу Епштейна-Барр в сироватці хворого N, 1990 р. народження.

Визначення проводили за відомою методикою (2) твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА). 20 мкл сироватки хворого вносили в планшет-імуносорбент, сенсibilізований специфічним антигеном (лізатом лімфобластоїдних клітин В95-8, який містить суміш вірусних білків). Планшет інкубували протягом 60 хв. В термостаті при температурі 37° С, відмивали 5 разів і вносили в усі заглиблення планшета по 100 мкл міченого пероксидазою хрому антивидового кон'югату до IgG та IgM людини. Планшет витримували при 37° С в термостаті протягом 40 хв. і промивали 5 разів. Далі в усі лунки планшета вносять по 100 мкл барвника (ОФД). Витримували у темряві 20-30 хв і ферментативну реакцію зупиняли сірчаною кислотою. Облік результатів проводять на спектрофотометрі. Відомо, що значення оптичної густини зразка прямо пропорційне кількості антитіл у сироватці. За результатами дослідження ця сироватка була визнана позитивною, що містить високий рівень IgM до ВЕБ. Кількість антитіл у сироватці хворого, визначену з застосуванням запропонованої тест-систе-

ми, порівнювали з даними, отриманими при застосуванні відомих тест-систем фірм «Sanofi diagnostics Pasteur S.A.» виробництва Франції та «Sigma diagnostics» США (3,4).

Таким чином, досліджену сироватку ідентифіковано як позитивну на наявність антитіл проти вірусу Епштейна-Барр. У хворого були визначені антитіла класу IgM і діагностована рання стадія інфекційного мононуклеозу.

Приклад 2. Визначення чутливості та специфічності запропонованої тест-системи.

З використанням названих тест-систем досліджували сироватки хворих на інфекційний мононуклеоз з клініки Інституту епідеміології та інфекційних захворювань МОЗ України та донорів із станції переливання крові (15 достеменно позитивних та 20 достеменно негативних сироваток). Усі сироватки досліджували у 4-х повторностях кожною тест-системою за описаною методикою. Усі 15 позитивних сироваток показали наявність антитіл IgG проти ВЕБ, що становить 100% чутливості. 20 негативних сироваток виявились справді негативними (100 % специфічності) в запропонованій та у порівняльних тест-системах. Таким чином, запропонована тест-система забезпечує виявлення антитіл проти ВЕБ. Вона надійна, проста в роботі і проявляє високу специфічність та чутливість.

Використана література

1. Juy De-The M.D. Epidemiology of Epstein-Barr virus and Associated Diseases in Men - The Herpes viruses Edited by B. Roiznan - Vol.1, 1992, p.25-103.
2. А.Т.Михайлов, В.Н.Смирский. Методы иммунологического анализа в биологии развития. М.: Наука, 1981.
3. Інструкція до тест-системи «Platelia EBV EBNA IgG and Platelia EBV EBNA IgM for detection of human antibodies to Epstein-Barr virus in serum or plasma samples by enzyme immunology» - Sanofi diagnostics Pasteur S.A. -1999.
4. Інструкція до тест-системи «SIAtm EPSTEIN-BARR EBNA IgG and SIAtm EPSTEIN-BARR EBNA IgM for detection of human antibodies to Epstein-Barr virus in serum or plasma samples by enzyme immunology» - «Sigma diagnostics» - 1999.

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
