



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48561 (13) A

(51) 6 A61K39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДІАГНОСТИЧНА ІМУНОФЕРМЕНТНА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИЛЕПТОСПІРОЗНИХ АНТИТІЛ У СИРОВАТКАХ КРОВІ ЛЮДИНИ АБО ТВАРИН

1

2

(21) 2001106918

(22) 11 10 2001

(24) 15 08 2002

(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.

(72) Семиноженко Володимир Петрович, Кириленко Іван Григорович, Вербицький Петро Іванович, Кучерявенко Олександр Олександрович, Кучерявенко Олексій Олександрович, Шевчук Олександр Анатолійович, Співак Микола Якович, Резуненко Євген Володимирович, Ображей Анатолій Федорович, Таран Тетяна Володимирівна, Пилипенко Віталій Григорович, Раєвська Галина Євгенівна, Терещенко Михайло Іванович, Іванська Наїля Валерівна, Гураль Анатолій Леонідович, Троянський Василь Васильович, Костенко Оксана Георгіївна,

Горлов Юрій Іванович

(73) АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО ЗАКРИТОГО
ТИПУ НАУКОВО-ВИРОБНИЧА КОМПАНІЯ
"ДІАПРОФ МЕД"

(57) Тест-система діагностична імуноферментна для визначення протилептоспірознних антитіл у сироватках крові людини або тварин, в складі якої як кон'югати використовують антивидові антитіла (анти IgM людини або анти-BPX, білок А, анти-кін'я, анти-свин'я), мічені ферментом, яка відрізняється тим, що містить імуносорбент з нанесеними антигенами очищених культур штамів лептоспор (493 Poland, Kabura, Perepelicyn, Pomona, Moskva V, Hond Utreht IV, M 20, Bratislava та Wijnberg)

Винахід належить до імунохімії, медицини, ветеринарної медицини та може бути використаний для проведення імуноопічних досліджень, діагностичних аналізів інфекційності людей або тварин на зараженість лептоспірозом.

Відома тест-система для виявлення антитіл (АТ) проти лептоспірозу в сироватках крові базується на реакції мікроаглютинації (РМА) [1]. При проведенні РМА за антигени правлять живі культури лептоспір різних серологічних груп у віці 5 - 15 днів без ознак аглютинації і лізису, при дослідженні культуральної рідини під мікроскопом в одному полі зору має бути нараховано 70 - 100 мікробних клітин при збільшеннях 20 x 10 або 40 x 10. Сироватку досліджують в чотирьох розведеннях - 1 50, 1 100, 1 500 та 1 2500. Реакцію ставлять в аглютинаційних пластинках. Кожне розведення сироватки розливають по 100мкл в окремий ряд, що складається з 7 - 15 лунок в залежності від кількості культур лептоспір (що правлять за антигени), які використовуються в реакції. Кожну культуру-антиген вносять по 100мкл у 4 лунки з різними розведеннями сироватки. Після додання антигенів пластини струшують і витримують у термостаті при температурі 30°C протягом години. Контролем є суміш культури лептоспір з фізіологічним розчином (0,85% розчин хлористого натрію).

Лептоспори в контролі мають бути рухливі, без ознак лізису та аглютинації. Реакцію враховують шляхом мікроскопії крапель з кожної лунки в темному полі мікроскопа. Цей метод небезпечний тим, що за антиген правлять живі культури лептоспор, крім того, метод малоефективний: за один робочий день можна проаналізувати за допомогою мікроскопа лише тільки 20 - 30 сироваток.

В основу винаходу покладено завдання створити імуноферментну тест-систему на основі антигенів, виділених з очищених культур штамів лептоспор (493 Poland, Kabura, Perepelicyn, Pomona, Moskva V, Hond Utreht IV, M 20, Bratislava та Wijnberg), антигени засорбовують на поверхні полістиролових планшетів. В складі кон'югатів використовуються антивидові антитіла (анти IgM людини або анти-BPX, анти-кін'я) чи білок А, мічені ферментом. Ферментативну реакцію визначають за допомогою субстратного розчину з хромогеном. За одну постановку можна проаналізувати 88 сироваток за 2 години.

Приклад 1. Визначення антитіл проти антигенів лептоспори в сироватці крові людини.

В кожну лунку стрипів планшета вносять по 80мкл розчину для розведення сироваток і по 20мкл зразків досліджуваних сироваток, залишив-

(13) A
(11) 48561
(19) UA

ши вільними 5 лунок першого ряду (контрольні лунки)

В три лунки вносять по 20мкл негативного контролю (К - негативна на лептоспіроз сироватка крові людини), а в дві інші - по 20мкл позитивного контролю (К⁺ - позитивна лептоспірозна сироватка крові людини)

Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37°C протягом 60хв

Після закінчення інкубації видаляють вміст лунки за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання планшетів

В лунки стрипів вносять по 100мкл розчину антивидового кон'югату - анти IgM-людини, міченого пероксидазою, та інкубують при 37°C у термостаті 45хв

Після закінчення інкубації промивають лунки шість разів і вносять туди по 100мкл розчину проявника (субстратний розчин з хромогеном) та інкубують при 18 - 22°C у темряві 10 - 25хв

Зупиняють кольорову реакцію, вносячи до всіх проб по 50мкл стоп-реагенту

Не більше 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 антитіл у сироватці. Кількість антитіл в сироватці, визначену при застосуванні нашої тест-системи, порівнювали з даними, отриманими при застосуванні реакції мікроаглютинації. Результати проведених досліджень доводять 100%-ну чутливість пропонованої тест-системи

Приклад 2 Визначення антитіл проти антигенів лептоспіри в сироватці крові ВРХ проводили аналогічно прикладу 1, але в якості антивидового кон'югату застосовували анти-ВРХ кон'югат, мічений пероксидазою, за позитивний контроль (К⁺) служила позитивна лептоспірозна сироватка крові ВРХ, за негативний контроль (К) правила негативна на лептоспіроз сироватка крові ВРХ

Приклад 3 Визначення антитіл проти антигенів лептоспіри в сироватці крові свині проводили ана-

логічно прикладу 1, але в якості антивидового кон'югату застосовували кон'югат білку А з пероксидазою, за позитивний контроль (К⁺) служила позитивна лептоспірозна сироватка крові свині, за негативний контроль (К) правила негативна на лептоспіроз сироватка крові свині

Приклад 4 Визначення антитіл проти антигенів лептоспіри в сироватках крові коней проводили аналогічно прикладу 1, але в якості антивидового кон'югату застосовували антитіла проти імуноглобулінів коня, мічені пероксидазою, за позитивний контроль (К⁺) брали позитивну лептоспірозна сироватку крові коня, а за негативний контроль (К) правила негативна лептоспірозна сироватка крові коня

Приклад 5 Визначення чутливості та специфічності пропонованої тест-системи

Використовуючи названі тест-системи, досліджували сироватки крові по (20 достеменно позитивних та 50 достеменно негативних сироваток). Усі сироватки досліджували у чотирьох повторностях кожною тест-системою за описаною методикою. Усі 20 позитивних сироваток показали наявність антитіл проти лептоспіри, що становить 100% чутливості 50 негативних сироваток виявилися справді негативними (специфічність - 100%) у пропонованій тест-системі. В порівнюваній реакції мікроаглютинації з 20 достеменно позитивних сироваток 4 були негативними (титр < 1:50). Чутливість РМА становила 80%

Таким чином, пропонована тест-система забезпечує виявлення антитіл проти антигенів лептоспіри у сироватках людей, ВРХ, свиней та коней. Проста і надійна в роботі, проявляє високу чутливість та специфічність

Використана література

- 1 Kelly P.W. Leptospirosis. In: Infectious disease in medicine and surgery. Gorbach S, Bartlett J, Balcklow N, (eds) Philadelphia, Saunders, 1991, p. 1295 - 1302
- 2 А.Т. Михайлов, В.Н. Смирский "Методы иммунохимического анализа в биологии развития" М "Наука", 1981