



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 57639

(13) A

(51) 7 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 АНТИТІЛ ПРОТИ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ С У СИРОВАТКАХ АБО ПЛАЗМІ КРОВІ ЛЮДИНИ ("DIA-HCV")

1

2

(21) 2002076165

(22) 24 07 2002

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Семиноженко Володимир Петрович, Гураль
Анатолій Леонтійович, Шевчук Олександр Ана-
толійович, Пилипенко Віталій Григорович,
Расвська Галина Євгенівна, Іванська Наїля
Валеріївна, Троянський Василь Васильович, Горлов
Юрій Іванович, Кас'яненко Тетяна Вальтерівна(73) АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО ЗАКРИТОГО
ТИПУ НАУКОВО-ВИРОБНИЧА КОМПАНІЯ
"ДІАПРОФ МЕД"(57) Тест-система діагностична імуноферментна
для визначення антитіл проти вірусу гепатиту С у
сироватках або плазмі крові людини ("DIA-HCV"), в
якій у складі імуносорбенту використовуються ре-
комбінантні поліпептиди, а кон'югатів - антивидові
антитіла (антилюдина), мічені ферментом, яка
відрізняється тим, що імуносорбент включає
суміш рекомбінантних антигенів NS3, NS4-core,
NS5, а кон'югат - моноклональні антитіла
MKA25D10

Винахід належить до біотехнології, імунохімії та медицини і може бути використаний для прове-
дення імунологічних досліджень, діагностичних
аналізів інфікованості окремих людей та скринін-
гових досліджень груп населення на зараженість
гепатитом С

Відомий тест в Україні для виявлення зараже-
ності гепатитом С базується на імуноферментній
тест - системі "ІФА - HCV" [1], в складі якої на тве-
рдій фазі використовується злитий рекомбінантний
блок, а у складі кон'югату антивидові антитіла,
мічені пероксидазою

В основу винаходу покладено завдання ство-
рити імуноферментну тест - систему на основі ре-
комбінантних антигенів NS4-core, NS3 та NS5, які
мають імунодомінантні послідовності вірусу гепа-
титу С. Антигени сорбують на поверхні полістиро-
лових планшетів. В складі кон'югатів використову-
ються моноклональні антитіла MKA 25D10 проти
імуноглобулінів людини, мічені ферментом. Фер-
ментативну реакцію визначають за допомогою
субстратного розчину з хромогеном. За одну по-
становку (2 години) можна проаналізувати 88 си-
роваток

Приклад 1. Визначення антитіл проти антигенів
вірусу гепатиту С у сироватці крові хворого К 1977
року народження

Визначення проводять за відомою методикою
(2) твердофазного імуноферментного аналізу. Для

цього 20мкл сироватки крові хворого вносять, у
лунки планшету - імуносорбенту з фіксованими на
ньому рекомбінантними пептидами та по 80мкл
розчину для розведення сироваток, залишивши
вільними 5 лунок першого ряду (контрольні лунки)

В три лунки вносять по 20мкл негативного кон-
тролю (К⁻ - негативна на гепатит С сироватка крові
людини), а в дві інші - по 20мкл позитивного кон-
тролю (К⁺ - позитивна на гепатит С сироватка крові
людини)

Накривають планшет клейкою плівкою або
кришкою та інкубують при температурі 37°C протя-
гом 60хв

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

В лунки планшету вносять по 100мкл розчину
моноклонального кон'югату проти імуноглобулінів
людини, міченого пероксидазою, та інкубують при
37°C у термостаті 30хв

Після закінчення інкубації промивають лунки
шість разів і вносять туди по 100мкл розчину про-
явника (субстратний розчин з хромогеном) та інку-
бують 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 ко-
льорової реакції визначають оптичну густину (ОГ)

(13) A

(11) 57639

(19) UA

в лунках у двохвильовому режимі за допомогою спектрофотометра. Значення ОП зразка прямо пропорційне кількості антитіл у сироватці. Значення кількості антитіл проти вірусу гепатиту С у сироватці хворого, визначену при застосуванні нашої тест-системи, порівнювали зі значеннями, отриманими при використанні тест-системи виробництва науково-дослідного об'єднання "Диагностические системы» (Н. Новгород, Росія).

Досліджені сироватки хворого було ідентифіковано як позитивні на наявність антитіл проти антигенів вірусу гепатиту С.

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

Використовуючи названі тест-системи, досліджували сироватки крові по 20 достеменно позитивних та 100 достеменно негативних сироваток. Усі сироватки досліджували у чотирьох повторностях кожною тест-системою за описаною методикою. Усі 20 позитивних сироваток показали наяв-

ність антитіл проти вірусу гепатиту С, що складає 100% чутливості. З 100 негативних сироваток виявилися справді негативними всі 100 (специфічність - 100 %) у запропонованій тест-системі. В порівнюваній тест-системі з Росії з 20 достеменно позитивних сироваток всі були позитивними. Чутливість становила 100%. 1 негативна сироватка оказалась хибно позитивною. Специфічність порівняльної тест-системи становила 99%.

Таким чином, запропонована тест-система забезпечує виявлення антитіл проти антигенів гепатиту С у сироватках людей. Проста і надійна в роботі, проявляє високу чутливість та специфічність.

Використана література

1. Мартиненко Д. Л., Чумак Р. М., Іванська Н. В. та ін. Патент 14747 А UA "Тест-система для виявлення антитіл проти вірусу гепатиту С (ІФА - HCV)".
2. А. Т. Михайлов, В. Н. Сими́рский "Методы иммунохимического анализа в биологии развития" М. "Наука", 1981.