



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 57640

(13) A

(51) 7 A61K9/64

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

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АУТОАНТИТІЛ ДО ЕНДОГЕННОГО АБО АНТИТІЛ ДО ЕКЗОГЕННОГО ІНСУЛІНІВ В СИРОВАТКАХ ТА ПЛАЗМІ КРОВІ ЛЮДЕЙ (ІФА-АТ-ІНС)

1

2

(21) 2002076166

(22) 24 07 2002

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Корпачев Вадим Валерійович, Лукашова Римма Георгіївна, Мельніченко Світлана Вітаськівна, Шевчук Олександр Анатолійович, Іванська Наїля Валеріївна, Раєвська Галина Євгенівна, Пилипенко Віталій Григорович

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

(57) Тест-система для виявлення аутоантитіл до ендogenous або антитіл до екзогенного інсулінів в сироватках або плазмі крові людей (ІФА-АТ - ІНС), що побудована за принципом гетерогенного імуноферментного аналізу, включає імуносорбент та кон'югат, яка відрізняється тим, що на тверду фазу сорбується напівсинтетичний інсулін людини, а як кон'югат використовуються моноклональні антитіла до імуноглобулінів людини, мічені ферментом

Винахід належить до медицини та може використовуватися для проведення діагностичних імунологічних досліджень сироваток крові людей з метою виявлення антитіл до інсуліну

Виявлення аутоантитіл до ендogenous інсуліну та контроль їх рівня мають важливе клініко-діагностичне значення у визначенні груп ризику захворювання на цукровий діабет серед дитячого та дорослого населення [1, 2]. Необхідність кількісної оцінки вмісту антитіл до екзогенного інсуліну у хворих на цукровий діабет з'явилася в результаті встановлення кореляції між важкістю клінічного протікання та прогнозом захворювання, строками терапії інсуліном та появою антитіл до нього [3].

Відома імуноферментна тест-система [4] для виявлення антитіл (АТ) до інсуліну в сироватках та плазмі крові людей. В основі тест-системи лежить використання суміші інсулінів свинячого, бичачого та рекомбінантного людського в якості антигену з імунодомінантними епітопами, що реагують з антитілами до інсуліну. Як кон'югати використовуються поліклональні кролячі антитіла до імуноглобулінів людини, що мічені ферментом (пероксидазою хрому).

В основу винаходу поставлено завдання - створити тест-систему, побудовану за принципом гетерогенного імуноферментного аналізу [5], з використанням напівсинтетичного інсуліну людини, нанесеного на тверду фазу та моноклонального кон'югату, що дає змогу виявляти аутоантитіла

до ендogenous та антитіла до екзогенного інсуліну в сироватках або плазмі крові людей з підвищеною чутливістю та специфічністю незалежно від типу діабету та стадії захворювання.

Приклад 1. Визначення антитіл до інсуліну в сироватці хворого К 1964 року народження. Діагноз інсулінозалежний цукровий діабет, тяжка форма в стані декомпенсації.

Визначення проводять за відомою методикою [5] твердофазного імуноферментного аналізу (ТІ-ФА). Для цього 5 мкл сироватки крові хворого вносять у планшет-імуносорбент з фіксованим на ньому напівсинтетичним інсуліном людини. Планшет інкубують протягом 60 хв у термостаті при температурі 37°C, відмивають 4 рази, вносять в усі заглиблення планшета по 100 мкл робочого розчину кон'югату, міченого ферментом, та інкубують протягом 30 хвилин при температурі 37°C. Після 6-кратного відмивання планшета вносять розчин проявника з хромогеном, витримують у темряві 20 хв і потім зупиняють ферментативну реакцію кислотою. Облік результатів реакції проводять на спектрофотометрі. Оптична густина зразка прямо пропорційне кількості антитіл у сироватці.

Значення кількості антитіл до інсуліну в сироватці хворого, визначену при застосуванні нашої тест-системи, порівнювали з даними, отриманими при використанні тест-системи "ORG-520", виробництва фірми "ORGentech".

Досліджена двома тест-системами сироватка

(13) A

(11) 57640

(19) UA

хворого була ідентифікована як позитивна за наявністю антитіл до інсуліну

Приклад 2. Визначення чутливості та специфічності запропонованої тест-системи. Досліджували сироватки отримані зі станції переливання крові (29 достеменно негативних сироваток) та з відділення клінічної фармакології Інституту ендокринології та обміну речовин (15 достеменно позитивних сироваток). Всі сироватки досліджено в 3-х повторностях кожною з двох тест-систем за описаною методикою. З 15 позитивних сироваток показано наявність антитіл до інсуліну в 14, що складає 93,3% чутливості, з 29 негативних зразків виявилися дійсно негативними 27 сироваток (93,1% специфічності) в запропонованій тест-системі. З використанням тест-системи "ORG-520", виробництва фірми "ORGentech" було виявлено 11 позитивних сироваток з 15 зразків, що складає 73,3% чутливості, з 29 негативних сироваток - 24 зразка (82,7% специфічності).

Таким чином, запропонована тест-система забезпечує виявлення антитіл до інсуліну, надійна при використанні, має високу специфічність та чутливість.

Використана література

1. Зверева Я.С., Дубинкин И.В., Зилов А.В., Таклас

Н., Алексеев Л.П. Иммунологические подходы к предикции инсулинзависимого сахарного диабета // Пробл. эндокринол., 1999, №6, 3-9

2. Ch. Verge, G.S. Eisenbarth/ Natural History of Autoimmunity in Type I Diabetes Mellitus // in Diabetes Mellitus, Eds. by Le Roith D., Taylor S.I., Olefsky Y.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1996, 287-297

3. Beaufort C.E., Sodoyez J.C., Koch M., Bruining G.J., Sodoyez-Goffaux F. Insulin autoantibodies and immune response to human insulin therapy in Type 1 (insulin-dependent) diabetic children: superiority of radio binding assay over solid phase assay // Diabetes Res. Clin. Pract., 1993, Jul, 21(1): 19-24

4. Immunometric Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of autoantibodies to bovine, porcine and recombinant human insulin. "ORG 520", ORGentec Diagnostika GmbH, Mainz / Germany

5. Сорокина Н.В., Гаврилова Е.М., Егорова А.М., Донецкий И.А. Использование иммуноферментного анализа для контроля активности антител к инсулину // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1985, №4, 73-76