



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **63008** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ АНТИКАРДІОЛІПІНОВИХ АНТИТІЛ ЕКСПРЕС-МЕТОДОМ

1

(21) u201102086

(22) 22.02.2011

(24) 26.09.2011

(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.

(72) ГОРБЕНКО НАТАЛІЯ ІВАНІВНА, КОЗАР ВАЛЕНТИНА ВІКТОРІВНА, ІВАНОВА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИ-

2

ЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб визначення рівня антикардіоліпінних антитіл експрес-методом в плазмі крові, який **відрізняється** тим, що визначення проводять з використанням латексного діагностикуму, який перемішують з досліджуваними зразками та за розвитком аглютинації латексних частинок роблять висновок про наявність у пробі аутоантитіл до кардіоліпіну.

Корисна модель відноситься до медицини, ветеринарії, а саме до визначення антитіл до кардіоліпіну у клінічному матеріалі, і може бути використана для оцінки коагуляційної ланки гемостазу, а саме діагностики антифосфоліпідного синдрому (АФС) у людини та тварин.

АФС є одним з видів тромбофілії, які частіше за все спостерігають в клінічній практиці. В зв'язку з цим у випадках венозних та артеріальних тромбозів різної локалізації, тромбоемболій, порушень мозкового кровообігу та ішемічних інсультів, кардіоваскулярних подій, в тому числі атеросклерозу, невиношуванні вагітності, аутоімунних захворювань тощо своєчасна діагностика АФС має важливе прогностичне значення, що пов'язано зі значною летальністю внаслідок розвитку судинних тромботичних подій [1].

Діагностика АФС включає в себе визначення рівня антитіл до фосфоліпідів. Антифосфоліпідні антитіла є гетерогенною групою антитіл, які реагують (специфічно зв'язуються) з негативно зарядженими (кардіоліпіном, фосфатиділсеріном, фосфатиділінозитолом, фосфатидною кислотою), рідше нейтральними (фосфатиділетаноаміном) фосфоліпідами та/чи фосфоліпідзв'язуючими сироватковими білками (бета-2-глікопротеїн 1, аннексин V, протромбін) [2].

Вказані антитіла направлені проти нервових клітин, тромбоцитів і ендотелію судин, і, викликаючи їх руйнування, ведуть до розвитку тромбозів та тромбоемболій, невротичних синдромів, наприклад, хвороби Альцгеймера тощо. Підвищений рівень антитіл є чутливим і специфічним лабора-

торним тестом, який характеризує ризик виникнення тромботичних ускладнень.

Вважають, що серед антифосфоліпідних антитіл важливим серологічним маркером АФС є антитіла до кардіоліпіну, який є основною фракцією антитіл до фосфоліпідів. Хворих, у яких виявили підвищений рівень антикардіоліпінних антитіл, відносять до групи ризику по виникненню тромбозів при різних захворюваннях [3].

Найбільш поширеним методом визначення рівня антикардіоліпінних антитіл є імуноферментний аналіз. Цей метод є високоточним і високочутливим, але час проведення аналізу займає від 1 до 3 годин [4]. Проте, на сьогодні відсутні експрес-методи визначення рівня антитіл до кардіоліпіну.

Найближчим аналогом є метод [5], згідно з яким для визначення антикардіоліпінних аутоантитіл в плазмі крові використовують кардіоліпін, який розчинений в етанолі, і який вносять в лунки планшетів для ІФА. В подальшому усі процедури являються стандартними для приготування тест-систем для ІФА, тобто включають: інкубацію планшетів з нанесеним кардіоліпіном протягом 18 годин при 4°C, промивання фосфатно-сольовим буфером, блокування білоквмісним розчином, 4-разове промивання фосфатно-сольовим буфером. Недоліком способу є тривалість проведення процедури дослідження та необхідність в спеціальному обладнанні.

Задача корисної моделі - розробка чутливого специфічного способу визначення рівня антикардіоліпінних антитіл та скорочення часу на проведення аналізу.

(13) **U**
(11) **63008**
(19) **UA**

Поставлена задача вирішується тим, що визначення рівня антикардіоліпінових антитіл проводять з використанням латексного діагностикуму, який перемішують з досліджуваними зразками та за розвитком аглютинації латексних частин роблять висновок про наявність у пробі аутоантитіл до кардіоліпіну.

Технічний результат - оптимізація діагностики тромботичних ускладнень за рахунок оперативно-го отримання інформації, що забезпечує своєчасність та ефективність лікувальних і профілактичних заходів.

Для приготування латексного діагностикуму використовують полістирольний латекс із розміром частинок 0,77-0,83 мкм, на який наносять розчинений в етанолі кардіоліпін (підприємство «Біолек», м. Харків). Полімерну суспензію центрифугують, доводять дистильованою водою до 0,5%-0,8% по сухому залишку, змішують з кардіоліпіном в рівних об'ємах. Навантаження латексу здійснюють при 37°C 2 години при постійному помішуванні. Відмивання від надлишку кардіоліпіну проводять двічі гліциновим буфером шляхом центрифугування при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. Відновлюють попередній об'єм реагенту, а саме концентрацію латексу по сухому залишку в суспензії у межах 0,5%-0,8%, гліциновим буфером. Гліциновий буфер готують шляхом доведення 0,1 М розчину гліцину до рН 8,2 1М розчином NaOH та додаванням 8,5 г натрію хлориду на 1 л. Готовий буферний розчин містить 0,1% БСА та 0,03% ази-ду натрію. Приготовлений діагностикум може зберігатися протягом 1 року при температурі 4°C.

Процедура визначення рівня антикардіоліпінових антитіл у досліджуваних зразках плазми крові людей і тварин складається із наступних етапів. Діагностикум та досліджувані зразки плазми крові доводять до кімнатної температури. Поміщають на слайд або скло по 20 мкл реагенту та проб, перемішують скляною паличкою. В якості негативного контролю застосовують гліциновий буфер. Помішують пластини чи скло протягом 2-3 хвилин, після чого проводять облік реакції. Розвиток аглютинації свідчить про наявність у пробі антитіл до кардіоліпіну. Зразки плазми крові, які показали позитивний результат, розводять гліциновим буфером. Найбільше розведення плазми крові, яке дало позитивний результат, є титром плазми крові. Про рівень антитіл до кардіоліпіну судять по останньому розведенню, при якому була виявлена аглютинація.

Цей тест дозволяє оперативно одержати інформацію - час проведення аналізу складає 2-3 хвилини.

Приклад

За допомогою діагностикуму були перевірені зразки плазми крові інтактних та оварієктомованих

щурів самиць (через 10 тижнів після операції). Встановлено, що у групі інтактних тварин титр антикардіоліпінових антитіл в середньому був 1:8 (min 1:8 ÷ max 1:8). У оварієктомованих щурів цей показник вірогідно відрізнявся у бік збільшення і в середньому титр був 1:24 (min 1:16 ÷ max 1:32) (p<0,05).

На моделі дефіциту естрогенів ми спостерігали зростання рівня антитіл до кардіоліпіну майже в 3 рази у порівнянні з контролем, що підтверджує дані літератури стосовно підвищення ризику тромбоутворення в період постменопаузи [6]. За даними кількісного ІФА рівень сумарних антитіл до кардіоліпіну у здорових людей не перевищує 20 МО/мл, а діагностично значимим для АФС є рівень > 40 МО/мл, а за результатами якісного ІФА анти-тільний індекс у здорових людей не перевищує 1,5-2,0 од., при рівні антитіл більше 2,0 од. вірогідність розвитку тромбозу значно зростає [7].

Таким чином, отриманий діагностикум є адекватним до поставленого завдання і здатен виявляти аутоантитіла до кардіоліпіну, що підтверджує його специфічність і достатню чутливість.

Література:

1. Mehdi A. A., Uthman I., Khamashta M. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future // Eur. J. Clin. Invest. - 2010 - Vol. 40, N. 5 - P. 451-464.
2. Pierangeli SS, Harris EN. Clinical laboratory testing for the antiphospholipid syndrome // Clin Chim Acta. 2005 Jul 1;357(1):17-33.
3. Donadini M.P., Crowther M. Antiphospholipid syndrome: a challenging hypercoagulable state with systemic manifestations // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. - 2010. - Vol. 24, N. 4. - P. 669-676.
4. Van Os G.M., Urbanus R.T., Agar C, Meijers J.C., de Groot P.G. Antiphospholipid syndrome. Current insights into laboratory diagnosis and pathophysiology // Hamostaseologie. - 2010. - Vol. 30, N. 3. - P. 139-43.
5. Gharavi A.E., Harris E.N., Asherson R.A., Hughes G.R. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity // Ann. Rheum. Dis. -1987.-Vol. 46, N. 1.-P. 1-6.
6. Feng F., Nyland J., Banyai M., Tatum A., Silverstone A.E., Gavalchin J. The induction of the lupus phenotype by estrogen is via an estrogen receptor-alpha-dependent pathway // Clin. Immunol. - 2010. - Vol. 134, N. 2. - P. 226-236.
7. Villalta D., Alessio M.G., Tampoia M., Da Re A., Stella S., Da Re M, Tozzoli R., Bizzaro N. Accuracy of the first fully automated method for anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibody detection for the diagnosis of antiphospholipid syndrome // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2009. - N. 1173. - P. 21-27.