

Винахід стосується біології і медицини, а саме, способів визначення характеристик крові в організмі і може бути використаний для визначення рівня антитіл різних класів, специфічних до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій - анти-ЛПС-антитіл, у сироватці і плазмі крові людей і лабораторних тварин.

За прототип обраний спосіб визначення антитіл до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій [Takahashi K., Fukada M., Kawai M., Yokochi T. Detection of lipopolysaccharide (LPS) and identification of its serotype by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using poly-L-lysine //J. Immunol. Meth.- 1992.- Vol.153, №1-2 -P.67-71], який полягає в проведенні непрямого твердофазного імуоферментного аналізу з використанням поло-L-лізину для модифікації поверхні твердої фази перед одержанням шару імуосорбента, причому для зниження рівня неспецифічних реакцій на етапах проведення аналізу застосовується реагент, що блокує - 0,01%-й розчин бичачого сироваткового альбуміну.

Ліпополісахарид, іммобілізований на модифікованій поло-L-лізиній твердій фазі, взаємодіє зі специфічними до нього антитілами чи сироватки плазми крові; далі з комплексом, що утворився, зв'язуються антивидові антитіла, кон'юговані з ферментом. Дія ферменту призводить до утворення в субстратно-буферній суміші забарвлених продуктів реакції, світло поглинання яких вимірюють за допомогою мікрофотоколориметра після зупинки ферментативної реакції.

Ознаками прототипу, загальними з істотними ознаками запропонованого способу, є: проведення непрямого твердо фазного імуоферментного аналізу.

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення чутливості і специфічності аналізу), є: при одержанні шару імуосорбента ліпополісахарид погано сорбується на поверхні полістиролових планшетів, тому для поліпшення його сорбції тверду фазу попередньо модифікують високомолекулярним поло-L-лізином, що поряд зі зростанням сорбції ліпополісахариду істотно підвищує рівень неспецифічних взаємодій, що призводить до зниження співвідношення корисний сигнал/фон і падінню чутливості і специфічності реакції.

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу визначення антитіл до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій шляхом використання нового принципу одержання шару імуосорбента, що полягає в зміні складу іммобілізаційного буфера і температурного режиму сорбції, що не вимагає попередньої модифікації поверхні твердої фази, дозволяє підвищити чутливість і специфічність аналізу, а також спростити та здешевити процедуру його проведення.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення антитіл до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій шляхом проведення непрямого твердофазного імуоферментного аналізу, відповідно до винаходу, сорбцію ліпополісахариду проводять у 0,05М карбонатному буфері, що містить 70% сульфат амонію при pH9,6 і температурі 37°C протягом 12-18 годин.

Між сукупністю істотних ознак запропонованого способу та очікуваним технічним результатом, що може бути досягнутий, виявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: проведення сорбції ліпополісахариду з 0,05М карбонатного буфера, pH9,6, що містить 70% сульфат амонію і при температурі 37°C протягом 12-18 годин дозволяє виключити етап попередньої модифікації поверхні твердої фази поло-L-лізином, що підсилює гідрофобні взаємодії ліпополісахариду з поверхнею твердої фази і забезпечує його міцну мобілізацію, що дає можливість підвищити специфічність і чутливість імуоферментного аналізу.

Спосіб полягає в наступному.

Для одержання шару імуосорбента сорбцію ліпополісахариду на поверхні полістиролових планшетів проводять з 0,05М карбонатного буфера, pH9,6, що містить 70% сульфат амонію - буфер для іммобілізації, протягом 12-18 годин при 37°C. При цьому в кожен лунку вносять по 100мкл буфера для іммобілізації, що містить ліпополісахарид у концентрації 10мкг/мл. Для запобігання висихання розчину ліпополісахариду в буфері для іммобілізації лунки планшетів необхідно герметизувати за допомогою односторонньої самоклеючої плівки. Для видалення ліпополісахариду, що не зв'язався та одночасного блокування вільних центрів зв'язування лунки промивають 4 рази по 1 хв. робочим буфером, що представляє собою 0,05 М фосфатний буфер, pH7,4, що містить 1% NaCl і 0,05% Tween 20. Далі в лунки послідовно вносять по 100мкл аналізованої розведеної плазми чи сироватки крові і кон'югата антивидових антитіл з пероксидазою хрому. З кожним реагентом проводять 60-хвилинну інкубацію при 37°C. Неспецифічне зв'язалися компоненти після кожного етапу відмивають робочим буфером 5 разів по 2 хвилини. При визначенні анти-ЛПС-антитіл класів А, М і G тестовані плазми чи сироватки крові людини за допомогою PBS-T розводять у 50 разів.

Для реєстрації пероксидазної активності в лунки вносять по 100мкл субстратно-буферної суміші, що представляє собою 30 мМ фосфатно-цитратний буфер, pH5,0, що містить 0,33 мг/мл о-фенилендіаміну і 0,02% H₂O₂ і інкубують 60хв. при 37°C. Реакцію зупиняють доданням у лунки 25мкл 3М сірчаної кислоти. Оптичну щільність кінцевого продукту ферментативної реакції визначають за допомогою імуоферментного аналізатора AKI-Ц01 при довжині хвилі 492нм чи іншого аналогічного приладу. Рівні анти-ліпополісахаридних антитіл виражають в умовних одиницях оптичної щільності кінцевого продукту ферментативної реакції для розведення тестованої плазми крові в 50 разів.

Спосіб ілюстрований графічним матеріалом.

На Фіг. представлені криві сорбції, по осі абсцис - концентрація ліпополісахариду *Escherichia coli* K30, мкг/мл; по осі ординат - оптична щільність при довжині хвилі 492 нм.

На Фіг. - крива 1 показує ефективність сорбції ліпополісахариду за допомогою способу-прототипу, а крива 3 - за допомогою запропонованого способу, крива 2 показує рівень неспецифічних реакцій при використанні способу-прототипу, а крива 4 - при використанні способу, що заявляється.

Криві 1 і 2 отримані при сорбції ліпополісахариду *Escherichia coli* K30 по способу-прототипу з попередньою обробкою полістиролу поло-L-лізином, молекулярна маса більше 300кДа, Sigma. Для зниження рівня неспецифічних реакцій на етапах проведення аналізу застосовують реагент, що блокує - 0,01%-й розчин бичачого сироваткового альбуміну. Криві 3 і 4 отримані при сорбції ліпополісахариду *Escherichia coli* K30 з 0,05М карбонатного буфера, pH 9,6, що містить 70%-й сульфат амонію протягом 18 годин при 3700 кДа, Sigma.

Для одержання кривих 3 і 4 лунки були послідовно оброблені розведеною 1:400 сироваткою крові мишей, імунізованих ліпополісахаридом *Escherichia coli* K30 і кон'югатом козячих афінно очищених антитіл з пероксидазою хроу 1:2500. Для одержання кривих 2 і 4 лунки були оброблені тільки кон'югатом козячих афінно очищених антитіл проти μ – ланцюга IgM миші з пероксидазою хроу 1:2500.

Для способу-прототипу при концентрації ліпополісахариду в буфері для іммобілізації, рівної 10мкг/мл, величина корисного сигналу складає 0,994, а співвідношення сигнал/фон - 1,9, а для запропонованого способу - відповідно 1,216 і 60,8.

Приведені дані показують те, що попередня обробка полістиролу поло-L-лізінін, як це роблять у способі-прототипі, збільшує сорбцію ліпополісахариду, однак одночасно призводить до істотного зростання неспецифічних взаємодій. Це виявляється в зниженні співвідношення корисний сигнал/фон навіть при використанні 0,01% бичачого сироваткового альбуміну як блокуючого реагенту.

При використанні для сорбції ліпополісахариду запропонованого способу при більш високій ефективності іммобілізації ліпополісахариду в порівнянні зі способом-прототипом рівень неспецифічних реакцій залишається дуже низьким, що виключає необхідність застосування яких-небудь додаткових блокуючих реагентів.

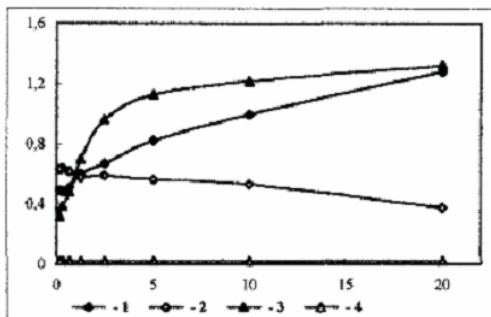
Відомості, що підтверджують можливість використання винаходу.

За допомогою запропонованого способу визначення антитіл до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій була обстежена плазма крові 97 постійних донорів крові і визначено середній вміст, а також особливості розподілу рівнів антитіл класів А, М і G, специфічних до ліпополісахаридів *Escherichia coli* K30 і *Salmonella minnesota*. Для виявлення анти-ліпополісахаридних антитіл класів А, М і G були використані імунопероксидазні кон'югати козячих афінно очищених антитіл до IgA, IgM та IgG людини хроу фірми Sigma.

Рівні IgA, IgM і IgG-антитіл до ліпополісахариду *Escherichia coli* K30, які більше ніж у 3 рази перевищують значення відповідних медіан, були зареєстровані відповідно в 11,2, 5,2 і 2,1% донорів. Рівні IgA і IgG-антитіл до ліпополісахариду *Salmonella minnesota*, які більше ніж у 3 рази перевищують значення відповідних медіан, були виявлені відповідно в 3,1 і 8,2% донорів. У той же час вміст IgM-антитіл до ліпополісахариду *Salmonella minnesota* не перевищував в 3 рази значення медіани для цього показника в жодного з 97 обстежених донорів. Яка-небудь кореляція між вмістом антитіл різних класів до ліпополісахаридів *Escherichia coli* K30 і *Salmonella minnesota* була відсутня. Крім того, встановлено, що розподіл рівнів природних антитіл до ліпополісахаридів *Escherichia coli* K30 і *Salmonella minnesota* у плазмі крові донорів мав виражену позитивну асиметрію щодо значень відповідних медіан.

Спосіб, що заявляється, дозволяє за рахунок ефективної сорбції ліпополісахариду на полістирол підвищити точність визначення специфічних до нього антитіл, а також спростити та удешевити процедуру проведення аналізу за рахунок виключення етапу обробки полістиролового планшета поло-L-лізінін і наступного блокування центрів неспецифічного зв'язування розчином бичачого сироваткового альбуміну.

Запропонований спосіб визначення рівня анти-ліпополісахаридних антитіл характеризується високою чутливістю, специфічністю, простотою і приступністю у відношенні реагентів і може бути використаний як у клінічних, так і в науково-дослідних лабораторіях.



Фіг.