



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **44895** (13) **U**  
(51) **МПК (2009)**  
**G01N 33/535**  
**A61K 39/21**  
**C12N 7/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ІМУНОФЕРМЕНТНА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ПРОТИ ГРАМ-НЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ**

1

(21) u200900661

(22) 29.01.2009

(24) 26.10.2009

(46) 26.10.2009, Бюл.№ 20, 2009 р.

(72) ПАРХОМЕНКО ЛАРИСА ВАСИЛІВНА, ІВАН-СЬКА НАІЛА ВАЛЕЄВНА, МОРОЗ ЄВГЕН ДЕНИ-СОВИЧ, ТИМОХІНА ЛЮДМИЛА ВОЛОДИМІРІВНА, ГАЛАГУЗА ЮРІЙ ПЕТРОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕПІДЕ-МІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ІМ. Л.В. ГРОМАШЕВСЬКОГО АМН УКРАЇНИ"

2

(57) Тест-система імуноферментна для визначення антитіл проти грам-негативних бактерій на основі комплексів поверхневих антигенів грам-негативних бактерій та моноклональних мишачих антитіл проти імуноглобулінів людини, кон'югованих з пероксидазою, яка **відрізняється** тим, що містить адсорбовані мукополісахариди поверхневих антигенів бактерій в лунках планшета для імуноферментного аналізу в кількості 0,25-0,5 мкг.

Корисна модель відноситься до області медицини і імунології і може використовуватись для діагностики, визначення рівня імунологічного захисту, відбору донорів для одержання імунної плазми.

Відомий спосіб визначення антитіл (1) за допомогою еритроцитарного діагностичного носія загального синегнійного антигену. Спосіб дозволяє визначити антитіла тільки проти загальних антигенів псевдомонад, тобто бактерій лише одного роду. Але ці антитіла не визначають рівня імунологічного захисту організму в зв'язку зі своєю дією проти внутрішніх антигенів і не є ефективними проти живих бактерій, особливо при тяжких інфекціях та сепсисі.

В основу корисної моделі поставлене завдання створити тест-систему імуноферментну для виявлення антитіл проти широкого спектру грам-негативних бактерій - збудників сепсису і на основі цього підвищити точність етіологічної діагностики інфекційного процесу і отримати можливість відбору продуцентів для одержання специфічної високотитражної імунної плазми для подальшого виготовлення лікувального препарату.

Поставлене завдання вирішують застосуванням комплексів поверхневих антигенів грам-негативних бактерій, контрольних антигенів, сорбованих у лунках планшетімуноферментного аналізу для ІФА, моноклональних мишачих антитіл

проти імуноглобулінів людини, які кон'юговані з пероксидазою хрому, та реактивів для виявлення активності пероксидази.

Приклад 1. Визначення антитіл проти грам-негативних бактерій.

Для виготовлення тест-системи спочатку одержують препарати мукополісахаридів К-антигенів із бактерій *E.coli*, *Proteus*, та M і Vi антигенів із бактерій роду *Salmonella* із суспензій тридобової агарової культури бактерій у 0,15М розчині NaCl з 2% фенолом (2,3) Після відокремлення поверхневих антигенів від бактеріальної клітини суспензію центрифугують, бактеріальну масу осаду зважують, а із супернатанта виділяють мукополісахарид за допомогою 6% цетилтриметиламонію бромиду у 0,12М розчині хлориду натрію. Препарати мукополісахаридів слизу *Pseudomonas* одержують з бульйонної культури *P. aeruginosa*, яку вирощують на Trypton bacto (Ferak, Berlin) з 4% глюкозою. Слиз відокремлюють від бактеріальних клітин за допомогою 10% етиленгліколю та центрифугують. Отримані первинні препарати звільняють від нуклеїнових кислот та очищають тричі переосадженням за допомогою етилового спирту. Препарат діалізують і висушують.

Для приготування комплексу антигенів беруть навески із бактерій кожного роду в рівних пропорціях і розчиняють у суміші 0,15М хлориду натрію та фосфатного буферу pH 7,2. Розчини доводять до

(13) **U**  
(11) **44895**  
(19) **UA**

вмісту антигену 0,25-0,5мкг в 100мкл. По 100мкл вносять в кожну лунку планшети, окрім контролю №2, та залишають на ніч у холодильнику для адсорбції.

Тест-систему розробляють у двох варіантах. У першому варіанті планшетку розраховують на дослідження одночасно 8 сироваток в двох чи трьох розведеннях з 4 комплексними антигенами при

контролях: К1 включає антигени-+імуноглобулін+моноклональні антитіла та К2 включає комплексні антигени бактерій досліджуваних родів (табл. 1). У другому варіанті отримують дані при дослідженні одночасно 46 сироваток на 1 планшетці в одному розведенні із комплексними антигенами *Escherichia* або *Pseudomonas* та при двох контролях.

Таблиця 1

1-й варіант ІФА тест-системи

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Е	Е	Е	Р	Р	Р	В	в	С	С	К-1	К-2
Е	Е	Е	Р	Р	Р	В	в	С	С	К-1	К-2
Е	Е	Е	Р	Р	Р	В	в	С	С	К-1	К-2
Е	Е	Е	Р	Р	Р	в	в	С	С	К-1	К-2
Е	Е	Е	Р	Р	Р	в	в	С	С	К-1	К-2
Е	Е	Е	Р	Р	Р	в	в	С	С	К-1	К-2
Е	Е	Е	Р	Р	Р	в	в	С	С	К-1	К-2
Е	Е	Е	Р	Р	Р	в	в	С	С	К-1	К-2

Літерами позначені комплексні антигени, внесені в лунки планшети: Е - комплексний антиген бактерій *Escherichia*,

Р - комплексний антиген бактерій *Pseudomonas*

В - комплексний антиген бактерій *Proteus*

С - комплексний антиген бактерій *Salmonella*

Потім планшетку відмивають і вносять в лунки 1-10 по 100мкл сироватки в розведеннях 1:240-1:960 або 1:240-1:480, в 11 - розчин специфічного імуноглобуліну. Інкують в термостаті при 37°C 2 часа. Потім планшетку відмивають і вносять по 100мкл розчину моноклональних антитіл в лунки 1-11. Внаслідок додавання моноклональних антитіл утворюється комплекс антиген-антитіло. Після відмивання планшети в лунки вносять розчин проявителю, який містить субстрат пероксидази пере-

кис водню та хромоген тетраметилбензидин. Пероксидазну реакцію зупиняють за допомогою стоп-реагенту. При позитивній реакції в лунках з досліджуваним препаратом колір стає жовтим. Негайно вимірюють оптичну густину суміші в лунках при 492нм. Якісно позитивну реакцію обліковують шляхом порівняння кольору в лунках із досліджуваними препаратами та контрольною позитивною сироваткою.

Приклад 2. Визначення чутливості тест-системи.

Для визначення чутливості тест-системи застосують специфічний імуноглобулін, отриманий за Коном. Проведено 8 досліджень при 3-х повтореннях зі застосуванням різних антигенів. Результати досліджень наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Чутливість тест-системи

Антигени	Розведення специфічного імуноглобуліну						
	1:20	1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920
<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>	4-	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Salmonella</i>	+	+	+	+	+	+	-
суміш	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> -ЛПС	+	-	-	-	-	-	-
Re-гліколіпід	-	-	-	-	-	-	-
О-антиген (ТХУ) <i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-

З таблиці видно, що в специфічному імуноглобуліні тест-системою антитіла проти комплексних поверхневих антигенів грам-негативних бактерій *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella* виявляються у високих титрах, в той час як з іншими антигенами (*E.coli*-ЛПС, Re-гліколіпід, О-антиген

(ТХУ) *E.coli*) реакції або немає, або виявляються дуже низькі титри.

Чутливість отриманих тест-систем приблизно відповідає титрам антитіл специфічного імуноглобуліну в РПГА з еритроцитарними діагностикумами, щодо необхідної кількості антигенів в одній

лунці планшету, то відмінність була у 1,5-3 рази, тобто 0,25-0,5мкг.

Приклад 3. Специфічність розробленої тест-системи.

Для виявлення специфічності тест-системи (табл. 3) досліджують донорські специфічні сироватки, які вміщують в великих титрах антитіла про-

ти окремих родів грам-негативних бактерій-збудників сепсису. В якості контролю специфічності тест-системи застосовують: антистафілококовий імуноглобулін, сироватки крові людини, які не вміщують антитіла проти поверхневих антигенів грам-негативних бактерій, та сироватку крові людини після одужання від стрептококової інфекції.

Таблиця 3

Специфічність розробленої тест-системи

Назва сироваток	Розведення сироваток						
	1:10	1:30	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920
Анти-Escherichia	+	+	+	+	+	+	+
Анти-Pseudomonas	+	+	+	+	+	+	+
Анти-Proteus	+	+	+	+	+	+	-
Анти-Staphylococcus	+	+	-	-	-	-	-
Анти-Streptococcus	+	+	-	-	-	-	-
Без вмісту анти-тіл проти грам-бактерій	+	-	-	-	-	-	-

Проведено визначення специфічності запропонованої тест-системи в дослідженні 6 сироваток при 4-х повтореннях. Результати дослідження наведені у табл. 3. Із таблиці видно, що специфічні сироватки (Анти-Escherichia, -Pseudomonas, -Proteus,) дають позитивні реакції в тест-системі у великих розведеннях, в той час як неспецифічні (анти-Staphylococcus, анти-Streptococcus, без вмісту антитіл проти грам-негативних бактерій) - у низьких. Специфічність розробленої тест-системи для скринінгу донорської крові, плазму якої відбирають для заготівлі здебільшого при позитивному результаті дослідження сироватки з вмістом антитіл не менше ніж 1:240, складає 100%.

Використана література

1. Дяченко В.Ф., Н.Ф. Дзюбан, В.Н. Щетинина. Возможности диагностики синегнойной инфекции с помощью эритроцитарного диагностикума - носителя общего синегнойного антигена. В кн.: Всесоюзная научно-практическая конференция «Проблемы клинической микробиологии в неинфекционной клинике», М., 1983, с.146.

2. W. Nimmich. Zur Isolierung und qualitativen Bausteinanalyse der K - Antigene von Klebsiellen // Z. Med. Mikrobiol. Immunol. - 1968. - vol. 154. - p.117-131.

3. Scott, J.E. Aliphatic Ammonium salts in the Assay of Acidic Polysaccharides from Tissues. //Methods Biochem. Anal. - 1960. - vol. 8. - p.145-197.