



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46973 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 47/48
A61K 39/44

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ІМУНОСЕНСОРНА ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ В СИРОВАТКАХ КРОВІ АНТИТІЛ ПРОТИ АДЕНОВІРУСІВ ЛЮДИНИ

1

(21) u200907930

(22) 27.07.2009

(24) 11.01.2010

(46) 11.01.2010, Бюл.№ 1, 2010 р.

(72) НЕСТЕРОВА НАДІЯ ВІТАЛІЇВНА, НОСАЧ ЛІДІЯ МИКОЛАЇВНА, ПОВНИЦЯ ОЛЬГА ЮРІЇВНА, ЗАГОРОДНЯ СВІТЛАНА ДМИТРІВНА, БАРАНОВА ГАЛИНА ВАСИЛІВНА, ГОЛОВАНЬ АННА ВОЛОДИМИРІВНА, УШЕНІН ЮРІЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ, ХРИСТОСЕНКО РОМАН ВАСИЛЬОВИЧ

2

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛотноГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ ФІЗИКИ НАПІВПРОВІДНИКІВ ІМ. В.Є. ЛАШКАРЬОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Імуносенсорна тест-система для виявлення в сироватках крові антитіл проти аденовірусів людини на основі поверхневого плазмового резонансу (ППР), яка **відрізняється** тим, що містить кварцовий біочип з золотим напильненням, на якому іммобілізовані білки аденовірусу як антиген.

Корисна модель являє собою імуносенсорну тест-систему на основі поверхневого плазмонного резонансу для виявлення антитіл проти аденовірусів людини в сироватках крові хворих, яка відрізняється тим, що містить кварцовий біочип з золотим напильненням, на якому іммобілізовані білки аденовірусу в якості антигену.

Корисна модель відноситься до вірусології і медицини та може бути використаний для проведення експрес-діагностики аденовірусів людини та дискримінації їх від інших вірусів, які викликають подібні за клінічними проявами захворювання. Він також може бути використаний для проведення імунологічних досліджень, зокрема діагностичних та скринінгових досліджень населення, для виявлення рівнів антитіл до аденовірусів в сироватках крові населення в різних регіонах, різних вікових групах та групах підвищеного ризику, прогнозування можливості спалаху аденовірусної інфекції в дитячих і закритих колективах. Пропонований засіб дозволить виявляти різні типи аденовірусів людини, оскільки при використанні деградованого вірусу мажорний капсидний білок - гексон знаходиться у стані вільних капсомерів і тому антитілам відкриті як типоспецифічні, так і антигенні детермінанти широкої специфічності: підродо-, міжпідродо- і родоспецифічні. Завдяки цьому біочип здатен виявляти антитіла в сироватці крові хворих незалежно від того, яким типом аденовірусу вони інфіковані.

Аденовіруси людини (52 серотипів) вражають дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт, очі, викликають різні за тяжкістю і клінічними симптомами спалахи захворювань в дитячих колективах та серед призовників. За розповсюдженістю аденовірусна інфекція займає друге місце після грипу А, проте, на відміну від грипу, аденовірусним захворюванням не властива сезонність, вони спостерігаються протягом всього року. Аденовіруси викликають не лише гострі респіраторні та ентеральні захворювання, але й здатні тривалий час знаходитись в організмі людини в латентному стані в лімфоїдних тканинах, чинити імуносупресивну дію та активуватись під впливом несприятливих факторів. При імунодефіцитних станах, особливо у хворих після пересадки внутрішніх органів, кісткового мозку, стовбурових клітин та у онкохворих може розвиватися дисемінована аденовірусна інфекція, летальність за якої становить 60% [1, 2, 3, 4, 5].

В медичній практиці для діагностики аденовірусної інфекції найчастіше використовують вірусологічний метод - виділення вірусу в культурі клітин, імунохімічні методи (ІФА та МФА) для детекції антигену або антитіл та молекулярно-біологічний метод (полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР) для виявлення фрагментів вірусного геному [6, 7, 8, 9].

В основу даної корисної моделі була поставлена задача створити тест-систему для виявлення

(19) UA (11) 46973 (13) U

антитіл проти аденовірусів людини на основі поверхневого плазмонного резонансу. Поставлена нами задача вирішується виготовленням біочипів. Для створення сенсорного чипа, що використовується в біосенсорних пристроях із застосуванням явища поверхневого плазмонного резонансу, один з партнерів по взаємодії повинен бути іммобілізований на сенсорній поверхні [10]. Була проведена іммобілізація білків аденовірусу в якості антигену на кварцових чипах з золотим напленням. Визначені оптимальні умови адсорбції антигену, що важливо для утворення комплексу антиген-антитіло.

Аналогів імуносенсорних тест-систем на виявлення антитіл проти аденовірусів в сироватках крові людини не має.

Приклад 1. Приготування антигену, який наноситься на поверхню біочипа.

Для отримання вірусного матеріалу використовували еталонний штам аденовірусу людини серотипу 2, який культивували в чутливих епітеліальних клітинах Нер-2. Через 5-7 діб культивування та появи вірусспецифічної цитопатичної дії клітини осаджували центрифугуванням (1500об/хв.), ресуспендували їх в 0,05М розчині трису (рН8,0), до складу якого входили 0,5М NaCl та Тритон X-100 (0,5%). Суспензію клітин інкубували при 4°C (18 год.) та центрифугуванням (1500об/хв.) звільнялись від клітинного детриту. Отриманий вірусний матеріал очищали та концентрували 2-кратним центрифугуванням (23000об/хв., 2год.) в градієнті густини хлористого цезію (1,2-1,4г/см³). Очищений аденовірус деградували в лужному середовищі для одержання антигену гексону. Для цього проводили діаліз проти 0,2М карбонат-бікарбонатного буферу (рН 10,8) протягом 18год. при 4°C, потім проти цитратного буферу, рН 5,0-5,5. В отриманому матеріалі спектрофотометрично визначали кількість сумарного білка. Антигенну активність гексону, який є мажорним білком капсиду аденовірусу і становить 240 капсомерів із 252, в отриманому матеріалі визначали в реакції преципітації та ІФА [11].

Приклад 2. Приклад способу приготування біочипа.

Кварцові чипи з напленням золотом промивали дистильованою водою та очищали сумішшю, яка містила дистильовану воду, 35%-й перекис водню та 37%-у сірчану кислоту у співвідношенні 5:1:1. Далі чипи тричі промивали дистильованою водою. Для покращання іммобілізації антигену всю поверхню чипа покривали розчином (2мг/мл) Dextran 17000 (Sigma)-0,05% цитратний буфер, рН 5,0-5,5, і витримували протягом 5год. при кімнатній температурі (20-25°C). Промивали скельця трьома змінами цитратного буферу і покривали всю поверхню золота розчином антигену (3мкг) в цитратному буфері. Витримували при 4-8°C протягом 18-24год. Тричі промивали цитратним буфером і блокували вільні місця на біочипах 1% БСА в цитратному буфері протягом 1год. при кімнатній температурі. Біочипи промивали цитратним буфером і ретельно висушували на повітрі. Готові біочипи зберігали при 4-8°C у малих стерильних ємкостях, запобігаючи дії повітря. Біочипи були одноразові.

Використання способу пояснює приклад 3.

Приклад 3. Для визначення антитіл проти аденовірусу використовували біочипи отримані способом, що заявляється, з іммобілізованими білками аденовірусу на поверхні та двоканальний біосенсор «Плазмон 6». Канал 1 використовували в якості контролю роботи приладу, пропускаючи цитратний буфер. Через канал 2 - дослідний спочатку пропускали негативну сироватку людини. Відмивали матеріал, що не зв'язався, і пропускали сироватку крові хворого на аденовірусну інфекцію. Облік результатів взаємодії антиген-антитіло здійснювали шляхом кількісного визначення кута відхилення (кутові секунди, к.с.) в динаміці дослідження і аналізували дані за допомогою комп'ютерної програми Origin 6.0 (Fig.1). Усі сироватки тестували у трьох повторях.

При розробці імуносенсорної тест-системи враховували граничне значення (ГЗ), сумуючи середнє значення показника кута відхилення негативних сироваток (аналізували 25 сироваток) та трьох середніх відхилень. При проведенні аналізу значення сироватки вважається позитивним, якщо її показник кута відхилення перевищує ГЗ на 10%. У разі, якщо значення показника кута відхилення нижче ГЗ на 10%, сироватка є негативною.

Дані, отримані за допомогою імуносенсорної тест-системи порівнювали з даними імуноферментного аналізу, котрий широко застосовується у діагностиці вірусної інфекції.

Для сконструйованої тест-системи визначали чутливість та специфічність. Чутливість є відношення кількості сироваток, які мали позитивні результати в аналізі, до їх суми з кількістю хибно негативних результатів, що виражено у відсотках. Чутливість імуносенсорної тест-системи становила 99%. Специфічність тест-системи є відношення кількості сироваток, які показали негативний результат в аналізі, до їх суми з кількістю хибно позитивних результатів, що виражено у відсотках. Специфічність сконструйованої імуносенсорної тест-системи становила 100%. Усі сироватки тестували у трьох повторях. Аналіз отриманих даних свідчить про досить високу відтворюваність результатів (97%).

Аналізуючи одержані результати з розробки імуносенсорної тест-системи для виявлення антитіл проти аденовірусів в сироватках крові хворих можна зробити висновок про можливість застосування методу ППР поряд з іншими імунохімічними методами, в тому числі і ІФА. В той же час метод ППР має ряд переваг: він одноступінчатий, не потребує мічених макромолекул, дозволяє спостерігати за динамікою взаємодії молекул та отримувати інформацію в ході проведення аналізу.

Отже, нанотехнологічна імуносенсорна тест-система може бути достатньо перспективною для використання в лабораторній діагностиці вірусних інфекцій. Перевагою застосування методу ППР в діагностиці інфекційних захворювань є експресне отримання інформації в реальному часі стосовно етіологічного збудника захворювання, відсутність використання мічених реагентів та автоматизоване проведення аналізу.

Джерела інформації:

1. Аденовірус, клетка, організм / Дяченко Н.С., Нас І., Беренчи Д., Носач Л.Н., Ванцак Н.П., Тарасишин Л.А, Адам Е. - Київ: Наук, думка, 1988. - 232 с.

2. Munoz F.M., Piedra P.A., Demmler G.J. Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immimocompetent children // Clin Infect Dis. - 1997. - 27. - P. 1194-1200.

3. La Rosa A.M., Champlin R., Mirza N., Gajewski J., Giralt S., Rorlston K.V., Raad I., Jacobson K., Kontoyiannis D., Elting L., Whimbey E. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants // Clin Infect. Dis. - 2001. - 32. - P. 871-876.

4. Wang W.H., Wang H.L. Fulminant adenovirus hepatitis following bone marrow transplantation. A case report and brief review of the literature // Arch. Pathol. Lab. Med. - 2003. - 127. - P. 246-248.

5. Walls T., Shankar A.G., Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in pediatric bone marrow transplant patients // Lancet. Infect. Dis. - 2003. - 3. - P. 79-86.

6. Philipson L. Adenovirus assay by the fluorescent counting procedure // Virology. - 1961. - 15. - P. 263-268.

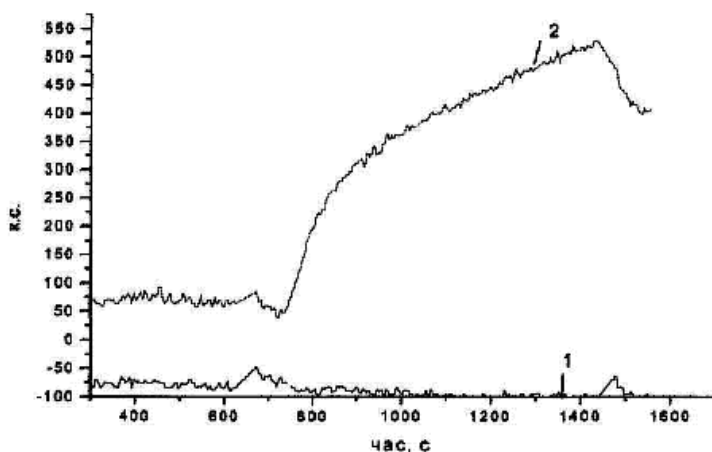
7. Cepko C.L., Sharp P.A. Analysis of Ad5 hexon and 100K ts-mutants using conformation-specific monoclonal antibodies // Virology. - 1983. - 129. - P. 137-154.

8. Cevenini R. Rumplanesi F., Marraracchio R. et al. A simple immunoperoxidase method for detection enteric adenovirus and rotavirus in cell culture // J. Infection. - 1984. - 8, N1. - P. 22-27.

9. Echavarria M., Forman M., van Toï M.J., Vossen J.M., Charache P., Kroes A.C. Prediction of se 'ere disseminated adenovirus infection by serum PCR // Lancet. - 2001. - 358. - P. 384-385.

10. Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors // Anal. Bioanal. Chem. - 2003. - 377. - P. 528-539.

11. Носач Л.М., Болтовець П.М., Повниця О.Ю., Жовновата В.Л., Захарченко О.М., Снопко Б.А., Ширшов Ю.М., Дяченко Н.С. Дослідження взаємодії антиген-антитіло аденовірусу людини методом поверхневого плазмонного резонансу // Мікробіол. журн. - 2005. - 67, N4. - с. 58-64.



Фіг.1. Аналіз сироватки крові хворого при використанні двоканального пристрою "Плазмон 6" по осі ординат - кут відхилення (к.с.), по осі абсцис - час проведення експерименту (сек.), 1 - контрольний канал, 2 - дослідний канал.