



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60429 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ІНСТРУМЕНТАЛЬНОГО ОБЛІКУ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОМЕТОДОМ РЕАКЦІЇ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ

1

2

(21) u201011475

(22) 27.09.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) БАБКІН АНАТОЛІЙ ФЕДОРОВИЧ, СТЕГНІЙ
БОРИС ТИМОФІЙОВИЧ, БЛИЗНЕЦОВ ОЛЕКСІЙ
ГЕНАДІЙОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-
ТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕ-
РИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Спосіб інструментального обліку результатів
дослідження мікрометодом реакції зв'язування

комплементу (РЗК), що включає внесення у лунки полістиролових плат з U-подібним дном інактивованої сироватки, антигену, попередньо відтитрованої дози комплементу, контролю компонентів реакції, індикаторної системи, витримування плат при температурі 37 °С на шейкері, облік результатів дослідження, який **відрізняється** тим, що облік результатів проводять цифровим визначенням показників екстинції затримки гемолізу на рідері, довжина хвилі $\lambda = 620$ нм, без попереднього осадження еритроцитів.

Корисна модель належить до біотехнології і ветеринарної імунології, зокрема, інструментального визначення ступеня затримки гемолізу в індикаторній системі і може бути використана з метою виявлення антитіл або антигенів збудників інфекційних хвороб мікрометодом реакції зв'язування комплементу (РЗК).

Відомо спосіб визначення гемолітичної активності комплементу в РЗК після осадження еритроцитів шляхом фотометрії з використанням довжини хвилі 541 нм (Х.Фрімель, Й.Брок, М,1986). Недоліком способу є неадаптованість до серологічних досліджень, зокрема оцінку результатів аналізу проводять за концентрацією гемоглобіну після попереднього осадження еритроцитів, що при масових серологічних дослідженнях проб сироваток крові може негативно впливати на оцінку результатів.

Найбільш близьким рішенням до заявленого є спосіб постановки і обліку мікрометодом РЗК у полістиролових мікроплатах з 96-ма лунками з U-подібним дном в об'ємі 100 мкл (4 Chapter 3.3.1. *Ovine epididymitis// OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines 2000*). Облік ступеню гемолізу еритроцитів проводять візуально після центрифугування мікроплат з компонентами реакції при 1000 g впродовж 10 хвилин або після спонтанного осадку нелізованих еритроцитів впродовж 2-3 годин при температурі 4 °С. Це рішення може бути прототипом.

Недоліком способу є те, що перед обліком результатів досліджень необхідно осадити нелізовані еритроцити в лунках шляхом відстоювання протягом трьох і більше годин або центрифугуванням мікроплат, а також те, що облік результатів реакції проводять візуально за ступенем гемолізу у відсотках і визначають діагностичну оцінку реакції: 100 % - «негативно», 75 % - «сумнівно», 50 % і менше - «позитивно».

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб інструментального обліку результатів дослідження мікрометодом РЗК, що включає внесення у лунки полістиролових плат з U-подібним дном інактивованої сироватки, антигену, попередньо відтитрованої дози комплементу, контролю компонентів реакції, індикаторної системи, витримування плат при температурі 37 °С на шейкері, облік результатів дослідження, шляхом визначення цифрових показників екстинції затримки гемолізу на рідері довжина хвилі $\lambda = 620$ нм, без попереднього осадження еритроцитів, щоб забезпечити ефективність способу.

Порівняльний аналіз з прототипом, дозволяє зробити висновок, що запропонований спосіб забезпечує пряму, більш точну цифрову оцінку затримки гемолізу дослідних і контрольних зразків з визначенням одиниць оптичної екстинції (ОЕ) зразу після закінчення реакції, що відповідає критерію «новизна».

(19) UA (11) 60429 (13) U

Спосіб виконується таким чином.

Постановку і облік результатів дослідження мікрометодом РЗК проводять в об'ємі 100 мкл в полістиролових мікроплатах з U-подібним дном за цифровими показниками затримки гемолізу без додаткового центрифугування мікроплат. У лунки мікроплат вносять досліджувані інактивовані сироватки, антиген, попередньо відтитровану дозу комплекменту, ставлять відповідні контролю компоненти реакції, витримують мікроплати з компонентами при температурі 37 °С, вносять у всі лунки з досліджуваними і контрольними компонентами індикаторну систему (сенсibilізовані гемолізином еритроцити барана), мікроплати з індикаторною системою витримують на шейкері при 37 °С. Надалі проводять інструментальне визначення цифрової оцінки ступеню затримки гемолізу у лунках плати дослідних і контрольних зразків з визначенням оптичної екстинції (ОЕ) на рідері для ІФА, зокрема фірми TECAN, програма Magellan, довжини на хвилі $\lambda = 620$ нм.

Приклад 1.

На моделі суспензій нелізованих і лізованих еритроцитів барана досліджена оптична екстинція в залежності від довжини хвилі (405; 450; 620 нм) на рідері (спектрофотометрі) фірми Тесап, комп'ютерна програма Magellan. Окремо були виготовлені суспензії 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % еритроцитів барана на 0,85 %-ому розчині NaCl. Дослідження оптичної екстинції суспензій нелізованих і лізованих еритроцитів проводили у полістиролових мікроплатах 96 лунок з U-подібним дном. Загальний об'єм розчину у лунці 100 мкл. У один ряд лунок вносили по 20 мкл відповідної суспензії еритроцитів барана і 80 мкл 0,85 % розчину NaCl, у другий ряд лунок вносили суспензії еритроцитів відповідних концентрацій по 20 мкл і 80 мкл дистильованої води. Мікроплати з досліджуваними суспензіями струшували 10 хвилин на шейкері фірми ELMi Sky line, 37 °С, 100 об./хв. Візуально було встановлено: у лунках з дистильованою водою - повний лізис суспензії еритроцитів, у лунках із розчином 0,85 % NaCl - суспензія еритроцитів без гемолізу. У подальшому провели інструментальне визначення оптичної екстинції (ОЕ) лізованих і нелізованих суспензій еритроцитів різних концентрацій. Результати досліджень свідчать, що при довжині хвилі 405 нм показник ОЕ в лізованих і нелізованих суспензіях еритроцитів був майже однаковим і зростав в залежності від досліджених концентрацій еритроцитів від 0,6 до 2,8. При довжині хвилі $\lambda = 450$ нм, показники ОЕ суспензій еритроцитів були значно вищими ніж аналогічних суспензій лізованих еритроцитів. У цьому випадку зберігалася тенденція до зростання ОЕ як у нелізованих, так і лізованих еритроцитів від 0,44 до 1,62 і від 0,16 до 0,62 відповідно в залежності від концентрації еритроцитів. Результати дослідження нелізованих суспензій еритроцитів при $\lambda = 620$ нм свідчать про поступове зростання показника ОЕ від 0,3 до 1,03 в залежності від концентрації еритроцитів. Аналогічні концентрації лізованих дистильованою водою суспензій еритроцитів мали значно

меншу ОЕ 0,06-0,07 незалежно від концентрації еритроцитів досліджених суспензій (табл. 1).

Таким чином, на моделі лізованих і нелізованих суспензій еритроцитів встановлено, що використання довжини хвилі $\lambda = 620$ нм стабільно забезпечує цифровий облік ступеню оптичної екстинції різної густини нелізованих суспензій еритроцитів (0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %) і майже однакові низькі показники після повного лізису еритроцитів незалежно від концентрації. Зазначену методику спектрофотометрії $\lambda = 620$ нм на рідері пропонується для обліку ступеня затримки гемолізу при обліку результатів у дослідженнях мікрометодом РЗК зразу після закінчення реакції без попереднього осадження еритроцитів.

Приклад 2.

Провели титрацію комплекменту у гемолітичній системі і порівняння візуального та інструментального обліку мікрометоду РЗК. У реакції використали комерційну серію комплекменту мурчака у розведенні 1:20, розчинник (0,85 % розчин NaCl), індикаторну гемолітичну систему (2,5 % відмитих еритроцитів барана у рівних об'ємах з гемолізином у подвійному титрі, 1:750). Сенсibilізацію еритроцитів гемолізином проводили упродовж 10 хвилин при 37 °С. У лунки мікроплат вносили автоматичною мікропіпеткою різні дози комплекменту: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 мкл і відповідно розчинник (0,85 % розчин NaCl) в об'ємі 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2 (кінцевий об'єм комплекменту 20 мкл у кожній лунці). Замість антигену і сироватки у кожен лунку вносили по 40 мкл розчинника та по 40 мкл індикаторної гемолітичної системи. Мікроплати витримували на шейкері фірми ELMi Sky line, 100 об./хв, 37 °С 10 хвилин. Облік ступеню гемолізу проводили зразу після закінчення реакції візуально та інструментально на рідері фірми Тесап, $\lambda = 620$ нм. Результати наведені в таблиці 2 свідчать, що візуально повний гемоліз (ПГ), оптична екстинція (ОЕ) 0,111 -0,072, виявили у лунках з дозою комплекменту 10 мкл і більше. Дози комплекменту 6 і 8 мкл візуально спричиняли частковий гемоліз еритроцитів (ЧГ), а відповідно інструментально ОЕ=0,282-0,689. При менших дозах комплекменту 2-4 мкл візуально спостерігали відсутність гемолізу еритроцитів (ВГ), відповідно інструментально - ОЕ=1,131-1,148. Таким чином, результати досліджень свідчать, що гемолітичний титр комплекменту в розведенні 1:20 (мінімальна кількість комплекменту, яка візуально спричиняє повний гемоліз, відповідно інструментально ОЕ 0,111) визначено в дозі 10 мкл у даному досліді.

Високі цифрові показники оптичної екстинції 1,131,-1,148 свідчили про повну відсутність гемолізу (ВГ).

Приклад 3.

Провели дослідження активності трьох позитивних бруцельозних і однієї негативної сироватки крові, виготовлених ТОВ НДП «Ветеринарна медицина» на бичках упродовж 2004-2010 рр (лабораторний робочий стандарт). Для дослідження використали антиген бруцельозний єдиний для РА, РЗК, РТЗК, серія №1, контроль №1, 2009 р., робочий титр 1:75, Херсонське Державне підприєм-

ємство біологічна фабрика. Постановку мікрометоду проводили у мікроплатах, 96 лунок, в об'ємі 100 мкл (по 20 мкл кожного компоненту). Сироватки крові у розведенні 1:5 інактували на водяній бані впродовж 30 хвилин при 62°C і досліджували у розведеннях від 1:5 до 1:640. Титр комплементу (одна гемолітична одиниця) становив 10 мкл в розведенні 1:20. В основний дослід мікрометоду РЗК була взята доза 14 мкл комплементу у розведенні 1:20 (три гемолітичних одиниці). Ставили відповідні контролю компонентів реакції на активність, специфічність, антикомплементаційність. Результати досліджень наведені в таблиці 3 свідчать, що повну затримку гемолізу спостерігали у лунках з позитивними бруцельозними сироватками різних серій виготовлення у розведеннях від 1:5 до 1:40 або 1:320 # і відповідно оптичну екстинкцію більше одиниці (1,196-1,267). Позитивні бруцельозні сироватки також реагували у розведенні 1:80 ++ (S1), 1:640 ++ (S2), 1:640 + (S3) тобто у лунках з антигеном мали часткову затримку гемолізу, від-

повідно ОЕ 0,635;0,563; 0,384. Негативна сироватка у розведенні 1:5, 1:10 з бруцельозним антигеном не затримувала гемолізу і мала низьку ОЕ (0,192-0,191). Контролі позитивних бруцельозних і негативної сироваток (1:5) на антикомплементаційність без антигену не спричиняли затримки гемолізу і мали низьку ОЕ 0,191-0,197. Контроль антигену на антикомплементаційність, а також контроль активності комплементу у гемсистемі не спричиняли затримки гемолізу і мали низьку ОЕ 0,197-0,111. У лунках з контролем стабільності гемсистемі з розчинником і контролем антигену з розчинником на гемотоксичність гемолізу не виявили, ОЕ становила 1,142-1,243. Отримані результати свідчать, що запропонований спосіб інструментального обліку результатів дослідження мікрометодом РЗК стабільно забезпечує чітке цифрове вираження ступеню затримки гемолізу, є чутливим ефективним і може використовуватись в серологічній діагностиці інфекційних хвороб.

Таблиця 1

Спосіб інструментального обліку результатів дослідження мікрометодом РЗК.

Об'єкт дослідження, довжина хвилі, нм		Результати спектрофотометрії ОЕ суспензій еритроцитів,			
		0,5 %	1,0 %	2,0 %	3,0 %
суспензія еритроцитів	405	0,6	1,15	2,0	2,8
лізовані еритроцити		0,6	1,16	2,0	2,8
суспензія еритроцитів	450	0,44	0,79	1,24	1,62
лізовані еритроцити		0,16	0,27	0,4	0,62
суспензія еритроцитів	620	0,3	0,53	0,8	1,03
лізовані еритроцити		0,06	0,07	0,07	0,07

Таблиця 2

Спосіб інструментального обліку результатів дослідження мікрометодом РЗК

Спосіб обліку РЗК		Облік гемолітичної активності комплементу (1/20), дози, мкл									
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
інструментально на рідері, $\lambda = 620$, ОЕ		1,131	1,148	0,689	0,282	0,111	0,088	0,093	0,076	0,074	0,072
візуально	гемоліз %	0	0	50	75	100	100	100	100	100	100
	затримка гемолізу	#	#	++	+	-	-	-	-	-	-
		ВГ	ВГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Таблиця 3

Спосіб інструментального обліку результатів дослідження мікрометодом РЗК.

Об'єкт дослідження	Облік активності сироваток) ОЕ, візуально г розведеннях,								Контроль сироватки 1/5 без антигену
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	
бруцельозна позитивна сироватка S1	1,237	1,267	1,216	1,185	0,635	0,155	0,199	0,09	0,193
	#	#	#	#	++	-	-	-	-
бруцельозна позитивна сироватка S2	1,256	1,226	1,245	1,181	1,175	1,201	1,229	0,563	0,197
	#	#	#	#	#	#	#	++	-
бруцельозна позитивна сироватка S3	1,245	1,237	1,23	1,225	1,196	1,198	1,214	0,384	0,19
	#	#	#	#	#	#	#	+	-
негативна сироватка	0,192	0,191							0,191
	-	-							-
Контролі									
Антиген без сироватки з комплементом А+Розч+К+ГС		Антиген без сироватки і комплементу А+Розч+Розч+ГС		Гемсистема з комплементом Розч+Розч+К+ГС		Гемсистема без комплементу Розч+Розч+Розч+ГС			
ОЕ 0,197		ОЕ1,243		ОЕ0,111		ОЕ1,142			
-		#		-		#			

Позначення: затримка гемолізу (#, ++, +) повний гемоліз (-)