



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97513** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
C12N 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2014 05696	(72) Винахідник(и):	Волянський Андрій Юрієвич (UA), Смілянська Майя Володимирівна (UA), Перемот Світлана Дмитрівна (UA), Кашпур Наталія Валеріївна (UA), Овчаренко Сергій Валентинович (UA)
(22) Дата подання заявки:	26.05.2014	(73) Власник(и):	Волянський Андрій Юрієвич, вул. Леніна, 12, кв. 57, м. Харків, 61058 (UA), Смілянська Майя Володимирівна, вул. Салтівське шосе, 242, кв. 172, м. Харків, 61171 (UA), Перемот Світлана Дмитрівна, вул. Морозова, 3, кв. 79, м. Харків, 61036 (UA), Кашпур Наталія Валеріївна, вул. Коломенська, 25, кв. 45, м. Харків, 61166 (UA), Овчаренко Сергій Валентинович, пр. Л. Свободи, 20, кв. 178, м. Харків (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.03.2015	(74) Представник:	Овчаренко Сергій Валентинович
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2015, Бюл.№ 6		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНОГО НАВАНТАЖЕННЯ

(57) Реферат:

Спосіб визначення вірусного навантаження включає приготування з досліджуваного матеріалу препарату, нанесення моноклональних антитіл, обробку антивидовою міченою ФІТЦ сироваткою з подальшою оцінкою інтенсивності флуоресценції клітин на ФМЕЛ-1А. З метою підвищення точності діагностики визначають інтенсивність флуоресценції (ІФ) шляхом обчислення різниці середньої флуоресценції клітин і фону, за його значенням визначають ступінь вірусного навантаження: 1,67-1,89 - слабкий; 1,90-2,17 - середній; 2,18-2,78 - високий ступінь навантаження.

UA 97513 U

Корисна модель належить до вірусології.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб виявлення вірусів в інфекційному матеріалі від хворих і тварин шляхом використання ФМЕЛ-1 А, що дозволяє провести кількісну оцінку вірусного навантаження. З метою підвищення точності діагностики визначають інтенсивність флуоресценції (F) шляхом обчислення різниці середньої флуоресценції клітин і фону, за його значенням визначають ступінь вірусного навантаження.

Суть способу полягає в наступному: з дотриманням запобіжних заходів у пацієнта проводять взяття крові з антикоагулянтом (гепарин, 20 од/мл). На знежирених предметних скельцях готують адгезивні відбитки, для чого в лунки діаметром 0,5 см із стрічки Parafilm "M" з підкладкою з полізину розкапується отримана суспензія лейкоцитів (еритроцитарна суспензія), яку потім висушують на повітрі. Адгезивні відбитки фіксують в суміші етилового спирту і ацетону у співвідношенні 1:1, проводячи через спирти, знижуючи концентрації 96 % - 15 хв, 60 % - 10 хв, 30 % - 5 хв. Потім проводиться забарвлення препаратів для непрямой імунофлуоресценції з використанням специфічних сироваток і антивидових імуноглобулінів, мічених ФІТЦ. Перегляд препарату проводять за допомогою люмінесцентного мікроскопа з використанням імерсійної системи і нефлуоресційного масла. Для об'єктивної оцінки вірусного навантаження в інфекційному матеріалі використовується ФМЕЛ-1 А, визначають інтенсивність флуоресценції (F) шляхом обчислення різниці середньої флуоресценції клітин і фону: 1,67-1,89 - низький; 1,90-2,17 - середній; 2,18-2,78 - високий ступінь навантаження. Інтенсивність (F) виражається в умовних одиницях флуоресценції (УОФ) за формулою:

$$F = \bar{F} / \bar{F}_\phi,$$

де \bar{F} - середнє значення інтенсивності флуоресценції 10 клітин;

\bar{F}_ϕ - середнє значення інтенсивності флуоресценції фону.

Порівняльні критерії визначення вірусного навантаження методом ПЛР і запропонованим способом наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Діапазон вірусного навантаження запропонованим способом і методом ПЛР

Використаний метод	Ступінь вірусного навантаження		
	Низький	середній	високий
МФА (F, УОФ)	1,67-1,89	1,90-2,17	2,18-2,78
ПЛР (МО/мл)	<600	600-700.000	>700.000

Як видно з даних табл. 1, при проведенні паралельних діагностичних досліджень визначена межа вірусного навантаження запропонованим методом співпадає з результатами ПЛР, що свідчить про специфічність способу.

Приклад 1. Використання запропонованого методу для вивчення вірусного навантаження у пацієнтів з персистуючою герпесвірусною інфекцією.

З дотриманням запобіжних заходів проводили забір крові з антикоагулянтом (гепарин, 20 од/мл) у 130 пацієнтів із встановленим діагнозом - персистуюча герпесвірусна інфекція. Виділяли лейкоцитарну і еритроцитарну масу за стандартною методикою (Караулов А.В. Клінічна імунологія, -М., 1999 г. - 604 с). На знежирених предметних скельцях готували адгезивні відбитки, для чого в лунки діаметром 0,5 см із стрічки Parafilm "M" з підкладкою з полізину розкапували отриману суспензію лейкоцитів (для визначення HSV - еритроцитарну суспензію), яку потім висушували на повітрі. Адгезивні відбитки фіксували в суміші етилового спирту і ацетону у співвідношенні 1:1, проводячи через спирти, знижуючи концентрації 96° - 15 хв, 60° - 10 хв, 30° - 5 хв. Потім проводили забарвлення препаратів для непрямой імунофлуоресценції з використанням специфічних герпетичних сироваток за відомою методикою. Використовували комерційні моноклональні сироватки фірми "Santa Cruz Biotechnology, Inc" до вірусів: Mouse Herpes Simplex Virus-1 Ig, Mouse Herpes Simplex Virus-2 Ig, Mouse Varicella Zoster Virus Ig, Mouse Anti Epstein-Barr Virus Ig, Mouse Cytomegalo Virus Mosaic Ig, Mouse Herpes Simplex Virus-6 Mosaic Ig; та антивидові імуноглобуліни, мічені ФІТЦ. На мазки наносили робоче розведення специфічної сироватки на 15 хв, а після промивання дистильованою водою наносили антивидові імуноглобуліни, мічені ФІТЦ і мазки поміщали на 25 хв. у термостат при 37±0,5 °С. По закінченні зазначеного часу мазки промивали дистильованою водою, підсушували фільтрувальним папером і переглядали у люмінесцентному мікроскопі з використанням імерсійної системи і нефлуоресційного масла. Перегляд препаратів проводили

на люмінесцентному мікроскопі ЛЮМАМ Р5 при збільшенні 90×7. Для об'єктивної оцінки вірусного навантаження використовували ФМЕЛ-ІА, визначали інтенсивність флуоресценції (F) шляхом обчислення різниці середньої флуоресценції клітин і фону за наведеною формулою.

- 5 Для порівняння паралельно проводили досліді за відомим способом шляхом визначення вірусного навантаження за допомогою RT-ПЛР. Порівняльні дані досліджень методом RT-ПЛР і запропонованим способом наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Порівняльні дані визначення вірусного навантаження у пацієнтів з персистуючою герпесвірусною інфекцією запропонованим способом і методом RT-ПЛР

Герпесвіруси	Ступінь вірусного навантаження			
	МФА (F, УОФ)		ПЛР (МО/мл)	
HSV1,2	2,56	Високий	790.000	високий
CMV	2,73	Високий	880.000	високий
EBV	2,07	Середній	400.000	середній
HHV6	1,68	Низький	150	низький
VZV	1,74	Низький	300	низький

- 10 З табл. 2 видно, що результати імунолюмінесцентного аналізу з розрахунком інтенсивності флуоресценції повністю співпадають з результатами RT-ПЛР дослідження крові, що говорить про ефективність і специфічність запропонованого способу та можливість його використання як альтернативного дослідження вірусного навантаження у хворих з герпесвірусною інфекцією.

- 15 Запропонований спосіб визначення вірусного навантаження шляхом визначення інтенсивності флуоресценції (ІФ) дозволяє підвищити точність діагностики вірусних захворювань та контролювати ефективність лікувальної терапії.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 20 Спосіб визначення вірусного навантаження, що включає приготування з досліджуваного матеріалу препарату, нанесення моноклональних антитіл, обробку антивидовою міченою ФІТЦ сироваткою з подальшою оцінкою інтенсивності флуоресценції клітин на ФМЕЛ-1А, який **відрізняється** тим, що з метою підвищення точності діагностики визначають інтенсивність флуоресценції (ІФ) шляхом обчислення різниці середньої флуоресценції клітин і фону, за його значенням визначають ступінь вірусного навантаження: 1,67-1,89 - слабкий; 1,90-2,17 -
- 25 середній; 2,18-2,78 - високий ступінь навантаження.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601