



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92393** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
G01N 33/569
C12Q 1/34

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ШВИДКОГО ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСІВ ГРИПУ

1

(21) a200814519
(22) 18.05.2007
(24) 25.10.2010
(86) PCT/EP2007/054835, 18.05.2007
(31) 06114170.1
(32) 18.05.2006
(33) EP
(31) 60/839,415
(32) 23.08.2006
(33) US
(31) 06119398.3
(32) 23.08.2006
(33) EP
(46) 25.10.2010, Бюл.№ 20, 2010 р.
(72) БОВІН НІКОЛАЙ ВЛАДИМІРОВИЧ, RU, ЛЮБА-
ВІНА ІРИНА АЛЕКСАНДРОВНА, RU, ЛАЙЗЕР РО-
БЕРТ-МАТТИАС, DE
(73) ВЕТЕРІНЕРМЕДИЦИНІШЕ УНІВЕРСИТЕТ ВІН,
AT
(56) NOYOLA DANIEL E ET AL: "Comparison of a
new neuraminidase detection assay with an enzyme
immunoassay, immunofluorescence, and culture for
rapid detection of influenza A and B viruses in nasal
wash specimens" JOURNAL OF CLINICAL
MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 3, March 2000 (2000-
03), pages 1161-1165.
US 6503745 A, 07.01.03.
US 4355102 A, 19.10.82.
US 2003129618, 10.07.03.
(57) 1. Спосіб швидкого виявлення вірусів і/або
вірусних частинок грипу, що містять гемаглютинін
та нейрамінідазний компонент, який включає на-
ступні стадії:
а) зв'язування вірусів і/або вірусних частинок з
основною, що містить щонайменше один тип вугле-
водного рецептора, вибраного з групи, що склада-
ється з природних або синтетичних олігосахаридів,
які сполучені або знаходяться у композиції з гліко-
протеїнами, такими як глікофорин, а1-кислий глі-
копротеїн, а2-макроглобулін, овомукоїд, та їх по-
єднаннями, вуглеводний рецептор основи
зв'язується з гемаглютиніновим компонентом віру-
сів і/або вірусних частинок;
б) взаємодії нейрамінідазного компонента зв'яза-
них вірусів і/або вірусних частинок з міченим фер-
ментним субстратом, що генерують детектований
сигнал; і

2

с) детекції сигналу, породженого на етапі б).
2. Спосіб за п. 1, у якому зазначені віруси і/або
вірусні частинки грипу містять всі відомі підтипи
грипу (AI).
3. Спосіб за п. 2, у якому зазначені віруси і/або
вірусні частинки грипу містять конкретний підтип
або групу підтипів.
4. Спосіб за п. 2, у якому зазначені віруси і/або
вірусні частинки грипу містять високопатогенну
форму.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, у якому основою є
хроматографічний папір або мембрана.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, у якому вуглевод-
ний рецептор ковалентно приєднаний або фізично
адсорбований до основи.
7. Спосіб за п. 6, у якому вуглеводний рецептор
містить альфа2-3Gal мотив.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому зазначене
зв'язування вірусів і/або вірусних частинок досяга-
ється поміщенням вірусів і/або вірусних частинок,
що містять пробу, у зазначену основу у вигляді
плями (дот-блот підхід).
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, у якому зазначене
зв'язування вірусів і/або вірусних частинок досяга-
ється зануренням вірусів і/або вірусних частинок,
що містять пробу, у зазначену основу (методу роз-
тікання краплі рідини).
10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, у якому зазначе-
ний мічений ферментний субстрат зазначеного
нейрамінідазного компонента осаджується на місці
зв'язування вірусів і/або вірусних частинок.
11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, у якому зазна-
чений ферментний субстрат помічений хромоген-
ною групою, і реакція з нейрамінідазою викликає
зміну кольору зазначеного ферментного субстра-
ту.
12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, у якому зазна-
чений ферментний субстрат є хромогенною похід-
ною N-ацетилнейрамінової кислоти, зокрема, 5-
бromo-4-хлор-3-індоліл-α-N-ацетилнейрамінової
кислоти.
13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, у якому реакція
з нейрамінідазою викликає специфічний флуорес-
центний сигнал.
14. Система швидкого виявлення вірусів і/або ві-
русних частинок грипу, що використовує спосіб за
будь-яким з пп. 1-13, яка включає:

(13) **C2**
(11) **92393**
(19) **UA**

а) основу, що містить щонайменше один тип вуглеводного рецептора, вибраного з групи, що складається з природних або синтетичних олігосахаридів, які сполучені або знаходяться у композиції з глікопротеїнами, такими як глікофорин, а1-кислий глікопротеїн, а2-макроглобулін, овомукоїд, та їх поєднаннями, вуглеводний рецептор основи зв'язується з гемаглютиніновим компонентом вірусів і/або вірусних частинок;

б) мічений ферментний субстрат, який взаємодіє з нейрамінідазним компонентом, генеруючи таким чином детектований сигнал.

15. Система виявлення за п. 14, у якій зазначена основа поміщена у пластиковий контейнер з вікном для зчитування результатів тесту з контролем проби та позитивним контролем.

16. Система виявлення за п. 14 і/або 15, у якій зазначена основа містить щонайменше дві різних кількості зазначених специфічних зв'язувальних

речовин для напівкількісної оцінки вмісту вірусу у пробі.

17. Система виявлення за п. 14 і/або 16, у якій зазначена основа містить щонайменше два специфічних рецептори різних підтипів специфічності для одночасного виявлення вірусів, що належать до різних підтипів.

18. Система виявлення за будь-яким з пп. 16-17, у якій системою після виявлення присутності вірусів і/або вірусних частинок служить контейнер для проб та переносна установка для підтверджуючих тестів, таких як полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією.

19. Застосування системи виявлення за будь-яким з пп. 14-18 для виявлення вірусів і/або вірусних частинок грипу у пробах у тварин і/або людини, таких як мазки, фекалії та кров, у пробах навколишнього середовища, і/або як систему раннього попередження появи високопатогенних підтипів вірусів.

Даний винахід стосується способів швидкого визначення вірусів і/або вірусних частинок грипу, що містять гемаглютинін або нейрамінідазний компонент, при цьому вказаний спосіб включає зв'язування вірусів і/або вірусних частинок з основою за допомогою специфічної зв'язувальної молекули, яка зв'язується з гемаглютиніновим компонентом вірусів і/або вірусних частинок, і визначення зв'язаних вірусів і/або вірусних частинок за допомогою реакції нейрамінідазного компонента з ферментним субстратом, що приводить до детектованого сигналу. Даний винахід також стосується системи швидкого визначення вірусів грипу і/або вірусних частинок, у якій використовується спосіб за винаходом, та застосування системи детекції за винаходом.

Всі віруси пташиного грипу (AI) належать до вірусів типу A у сімействі вірусів Orthomyxoviridae, і всі відомі штами вірусу грипу A інфікують птахів. Вірус грипу типу A підрозділяють на підтипи залежно від білків гемаглютиніну (H) та нейрамінідази (N), виступаючих з центрального кору вірусу. Існує 16 типів H та до 9 підтипів N, що дає можливість для 144 різних комбінацій H і N.

Пташиний грип (також відомий як вірус грипу A, грип типу A або грип виду A) є грипом, що викликається типом вірусу грипу, який переноситься птахами, але також може заражати декілька видів ссавців.

Пандемія грипу - це великомасштабна епідемія вірусу грипу, наприклад, як епідемія іспанки у 1918р. Всесвітня Організація охорони здоров'я (WHO) попереджає, що існує значний ризик пандемії грипу протягом наступних декількох років. Одним з найбільш небезпечних вірусів є підтип A (H5N1) пташиного грипу.

H5N1 є типом вірусу пташиного грипу, який за рахунок дрейфу генів мутував у велику кількість високопатогенних форм, але всі вони у даний час належать до генотипу Z вірусу пташиного грипу H5N1. Генотип Z з'явився у 2002 р. шляхом рекомбінації більш ранніх високопатогенних генотипів

H5N1, які вперше були виявлені у птахів в Китаї у і 996 році та у людини в Гонконзі у 1997р. Віруси H5N1 інфекції людини та близько споріднені віруси пташиного грипу, виділені у 2002 та 2004 рр., належать до одного генотипу, який часто називається генотипом Z.

Підтипами пташиного грипу, підтвердженими у людей, які, як відомо, привели до великого числа людських смертей, є: H1N1, що викликав іспанку, H2N2, що викликав пташиний грип, H3N2, що викликав гонконгівський грип, H5N1, H7N7, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7.

Щоб швидко відреагувати на появу нового штаму грипу, що мутував і є вірулентним, здатного передаватися від людини до людини, потрібний швидкий та надійний метод аналізу виявлення, чи заражена людина або тварина вірусом. Лабораторні методи виявлення вірусів, що існують у даний час, у пробах з навколишнього середовища, у тварин і людини є трудомісткими та тривалими за часом.

В US-B-6 503 745 описані сполуки циклопентану і циклопентену, а також їх застосування у способі виявлення вірусів грипу. Вірус захоплюється за допомогою покритої фетуїном поверхні, і детекцію проводять міченою композицією, яка зв'язується з нейрамінідазою.

Доктор Нойола та ін. описують у Journal of Clinical Microbiology, 2000, стор.1161-1165, гранули, покриті фетуїном. Фетуїн також виступає в ролі субстрату для нейрамінідази, і детекцію проводять за допомогою аглютинації.

В US-A-2003/0129618 описані способи і композиції для детекції аналогічним способом за допомогою флуоресценції, що відбувається у полімерному матеріалі у відповідь на вибіркове зв'язування аналізованої речовини з полімерними матеріалами. Зокрема, цей винахід дозволяє визначити за допомогою флуоресценції реакції, що модифікують мембрану, та аналізованих речовин, відповідальних за такі реакції, і для спостереження діючих інгібіторів.

Всі відомі та доступні підходи у цій галузі засновані або на використанні антитіл до вірусних епітопів, або на звичайних тестах на нейрамінідазу (NA).

Головним недоліком методів, що використовують антитіла, заснованих на техніці розтікання краплі рідини, або інших типів аналізу є нестабільність реагентів з антитілом.

Крім того, більшість імунологічних методів аналізу, доступних у даний час, показують специфічно грипу А, а не H5N1. До того ж використання антитіл неминує веде до підвищення вартості аналізу.

Головним недоліком тестів NA, специфічних до вірусів грипу, є необхідність використання дорогого, використовуваного при сучасному рівні техніки, субстрату реагенту, який повинен бути частково метилованим.

Даний винахід вирішує ці проблеми шляхом забезпечення способів швидкого визначення вірусів і/або вірусних частинок грипу, системи виявлення, у якій використовується вказаний спосіб, а також застосування вказаного способу визначення, як зазначено у формулі винаходу.

В описі винаходу будуть використані наступні аббревіатури: 3'SLN = Neu5Ac α 2-3Gal1p1-4GlcNAc; HA = гемаглютинін; HAR = реакція гемаглютинації; LOD = межа виявлення; NA = нейрамінідаза; TCID₅₀ = доза інфекції у культурі тканин; TN буфер = 0,02 M Трис-HCl (pH 7,2) з 0,1 M NaCl.

Винахід стосується способу швидкого виявлення вірусів і/або вірусних частинок грипу, який включає наступні етапи:

а) зв'язування вірусів або вірусних частинок з основою, що містить щонайменше один тип вуглеводних рецепторів, обраних з групи, що складається з природних або синтетичних олігосахаридів, які кон'юговані або розташовані у композиції з глікопротеїнами, такими як глікофорин, α 1-кислий глікопротеїн, α 2-макроглобулін, овомукоїд та їх сполученнями,

вуглеводний рецептор основи зв'язується з гемаглютиніновим компонентом вірусу і/або вірусної частинки;

б) реакцію нейрамінідазного компонента зв'язаних вірусів і/або вірусних частинок з їх міченим ферментним субстратом, яка викликає генерування детектованого сигналу; і

с) детектування сигналу, генерованого на етапі б).

Зокрема, можуть бути виявлені віруси і/або вірусні частинки грипу, що містять всі відомі підтипи Avian Influenza (AI).

В іншому варіанті здійснення винаходу віруси і/або вірусні частинки грипу містять конкретний підтип або групу підтипів. Спосіб може використовуватися для виявлення вірусів і/або вірусних частинок грипу, що містять високопатогенний варіант.

Винахід може зокрема здійснюватися з основою, яка являє собою хроматографічний папір або мембрану. Такі матеріали добре відомі фахівцям у даній галузі. Згідно з винаходом можна здійснювати ковалентне зв'язування або фізичне адсорбування вуглеводного рецептора, як вказано вище, з основою.

У винаході зокрема використовують вуглеводний рецептор, що містить мотив α 2-3Gal. Згідно з одним із варіантів здійснення винаходу (дот-блот підхід), зв'язування вірусів і/або вірусних частинок досягається шляхом поміщення вірусів і/або вірусних частинок, що містять пробу, на основу у вигляді плями. Згідно з винаходом зв'язування вірусів і/або вірусних частинок досягається зануренням вірусів і/або вірусних частинок, що містять зразок, у згадану основу за методом так званої техніки розтікання краплі рідини. В іншому варіанті здійснення винаходу мічений ферментний субстрат нейрамінідазного компонента осаджується на місці зв'язування вірусу і/або вірусних частинок.

Ще в одному варіанті здійснення даного винаходу ферментний субстрат помічений хромогенною групою, і реакція з нейрамінідазою викликає зміну кольору згаданого ферментного субстрату. Як ферментний субстрат можуть бути використані, окрім інших, наступні хромогенні похідні N-ацетилнейрамінової кислоти, зокрема, 5-бромо-4-хлор-3-індоліл- α -ацетилнейрамінова кислота. Як альтернатива, реакція з нейрамінідазою викликає специфічний флуоресцентний сигнал, якщо як мітка використовуються підхожі флуоресцентні молекули.

Спосіб за винаходом може здійснюватися за допомогою системи швидкого виявлення вірусів і/або вірусних частинок грипу за винаходом. Система включає систему швидкого виявлення вірусів і/або вірусних частинок грипу способом за винаходом, причому вказана система містить:

а) основу, що містить щонайменше один тип вуглеводного рецептора, обраного з групи, що складається з природних або синтетичних олігосахаридів, які сполучені або знаходяться у композиції з глікопротеїнами, такими як глікофорин, α 1-кислий глікопротеїн, α 2-макроглобулін, овомукоїд та їх сполученнями, вуглеводний рецептор основи приєднує до гемаглютинінового компонента вірусів і/або вірусних частинок;

б) мічений ферментний субстрат, який реагує з нейрамінідазним компонентом, генеруючи таким чином детектований сигнал.

Зокрема, основа поміщається у пластиковий контейнер з вікном для зчитування результатів тесту з контролем проби та позитивним контролем. Основа містить, зокрема, щонайменше дві різних кількості згаданих специфічних зв'язувальних речовин для напівкількісної оцінки вмісту вірусу у пробі. В іншому варіанті здійснення основа містить щонайменше два специфічні рецептори різних підтипів специфічності для одночасного виявлення вірусів, що належать до різних підтипів. Системою детекції за винаходом служить контейнер для проб та переносна установка для підтверджуючих тестів, таких як полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією, після виявлення присутності вірусів і/або вірусних частинок.

Також, відповідно до винаходу, система детекції, що заявляється, може використовуватися для виявлення вірусів і/або вірусних частинок грипу у пробах у тварин і/або людини, таких як мазки, фекалії та кров, у пробах навколишнього середови-

ща, і/або як система раннього попередження появи високопатогенних підтипів вірусів.

Гемаглютинин (НА) і нейрамінідаза (NA) присутні на поверхні вірусів грипу. НА викликає зв'язування вірусів з сіаліновими клітинними рецепторами, а NA стимулює доступ вірусу до клітин-мішеней і сприяє вивільненню вірусу із заражених клітин та природних інгібіторів [Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., Klenk, H.D., 2004: J. Virol. 78(22) 12665-7], тобто НА зв'язує рецептори, а NA руйнує рецептори. Важливою умовою для ефективної реплікації вірусів є спільна дія НА та NA, і у різних видів відношення цих двох активних речовин розрізняється. Віруси грипу, виділені у птахів, мають деякі характерні особливості. Всі віруси пташиного грипу мають НА, який володіє найбільшою спорідненістю до Neu5Acα2-3Galβ-термінованих вуглеводних ланцюгів. Крім того, активність їх NA вище порівняно з вірусами іншого виду.

У способі виявлення та системі детекції за даним винаходом використовуються ці властивості обох, НА та NA, компонентів віріона пташиного грипу. Вірус грипу, який зв'язується із специфічною зв'язувальною молекулою, переважно, із субстанцією, яка містить сіалізовані вуглеводи та сполучена з мембраною, після чого відбувається реакція, переважно, розщеплення нейрамінідазного субстрату, яка викликає смерть зони, що містить вірус, на мембрані. Спосіб виявлення вірусів грипу та система за даним винаходом демонструють ряд переваг у порівнянні з тестовими системами, відомими у даній галузі до цього часу: використання двох компонентів, НА та NA, підвищує специфічність аналізу і дозволяє конструювати системи виявлення з обраними специфічностями. У той же час, і на противагу системам детекції, заснованим на імунологічних методах, немає потреби у додаткових маркерних ферментах для позитивної детекції, оскільки для цих цілей служить сама нейрамінідаза вірусу.

Різні варіанти ретельно відібраних типів молекул вуглеводних рецепторів збиратимуть віруси грипу незалежно від типу та підтипу і одночасно здатні до специфічного виявлення високопатогенних форм, таких як H5N1.

Результат способу виявлення за винаходом може бути одержаний без використання якогось складного обладнання.

Спосіб за винаходом дозволяє виявляти віруси протягом 0,1-2 годин.

Винахід далі детально описується за допомогою прикладів, що не обмежують обсяг винаходу.

Приклади

Приклад 1:

Синтез поліакриламідового кон'югата 3'SLN-трисахариду для одержання специфічної молекули вуглеводного рецептора

Розчин 1,7 мг (10 цмоль) поліакрилової кислоти, повністю активованої N-гідроксисукцинімідом, MW~1000кДа, у 200мкл диметилсульфохлориду та 4 мкл діізопропілетиламіну були додані до розчину 1, 46 мг (2 цмоль) 3'SLN-O(CH₂)₃NH₂ у 200 мкл диметилсульфохлориду, суміш утримувалася при 37°C протягом 48 годин, 40 мкл 25%-го водного розчину аміаку або 40 мкл етаноламіну були до-

дані і розчин утримувався 18 год. при кімнатній температурі, після чого застосовувалася гельпро-никна хроматографія на сефарозі LH, вихід реакції ~ 90%.

Приклад 2:

Виявлення вірусів грипу у рідині алантоїса способом та тест-системою за винаходом

Набір:

1. Тест-смужка
2. Буфер для проби буфер № 1
3. Контрастний буфер буфер № 2
4. Буфер промивки А буфер № 3
5. Буфер промивки В буфер № 4
6. Забарвлювальний буфер буфер № 5
7. Подвійна смужка (2 ряди з 8 лунками) або чашка на 96 лунок
8. Ножиці або скальпель
9. Щипці
10. Чашка для промивання смужки
11. Ємність для проходження реакції
12. Термостат (або його заміник)
13. Камера для процедури хроматографування (або кришка, якою закривають чашку на 96 лунок із смужками).

Матеріали:

Смужки: нітроцелюлоза, абсорбент, підкладка для проби, виготовлена з ватману, USA.

1. Специфічний реагент (фетуїн, Sigma) був виділений з сирих курячих яєць.
2. Буфер № 1: 0,2 М трис-HCl (pH 7,2) з 3 М NaCl та 0,5% Твін-20.
3. Буфер № 2: 0,02 М трис-HCl (pH 7,2) з 0,3 М NaCl та 0,05% Твін-20.
4. Буфер № 3: 0,02 М трис-HCl (pH 7,2) з 0,1 М NaCl та 0,05% Твін-20.
5. Буфер № 4: 0,02 М трис-HCl (pH 7,2) з 0,1 М NaCl (TN-буфер).
6. Буфер №5: 4 мМ розчину Neu-X у TN-буфері з 0,01 М CaCl₂.

TN-буфер може бути замінений іншим підходящим буфером, наприклад, забуференим фосфатом сольовим розчином або сольовим розчином.

Смужка (Фіг. 1) розділена на три зони: зони змочування, виявлення та абсорбції. Лінія молекули вуглеводного рецептора (тестова лінія), так само як і контрольна лінія, розташовується у зоні виявлення. Смужки зроблені з мембрани, адсорбенту та подушечки для проби. Молекула вуглеводного рецептора (1 мікролітр на 1 мг/мл розчину) поміщається у зону виявлення, після чого смужка висушується та промивається. Смужка зберігається у герметично закритій посудині при 18-25°C.

Виявлення:

1. Приготування проби. 1/10 частина (об./об.) буфера № 1 додається до проби безпосередньо перед аналізом і ретельно струшується. Це проба № 1 (Р № 1).

2. Процедура виявлення включає декілька етапів. (Таблиця 1).

На першому етапі подушечка для проби на смужці поміщається у 80-100 мкл Р №1. Під дією капілярних сил рідина з проби піднімається угору і досягає зони абсорбції через зону виявлення, де вірусні частинки зв'язуються з молекулою вуглеводного рецептора. Тривалість цього процесу за-

лежить від в'язкості проби, але не повинна перевищувати 15 хв. Буфер № 2 додається у ту ж саму лунку чашки (як альтернатива, можна перемістити смужку в іншу лунку, наповнену буфером № 2). Через 10 хв. смужку виймають з лунки.

На другому етапі змочувана частина смужки відрізається (ножицями). Після обережного вилучення (наприклад, за допомогою пінцета) абсорбуючої зони частини смужки тестова зона промивається буфером № 3 і потім буфером № 4. Потім зона абсорбції теж відрізається.

Третій етап. Частина тестової зони, що залишилася, поміщається у колбу з буфером № 5. Колба щільно закривається і залишається у темноті при 37-40°C. Присутність вірусів грипу у пробі виявляється за темно-синім забарвленням зони молекули вуглеводного рецептора. Тривалість цього кроку залежить від концентрації вірусу у пробі і може зайняти від 20 хв. до 60 хв., перш ніж вірус зможе бути виявлений за допомогою реакції гемоглютинації (HAR титр близько 2). Як правило, ці проби мають значення TCID₅₀/мл близько 10⁵. Для проб з 10 та 100-кратно меншим вмістом вірусу (10⁴-10³ TCID₅₀/мл) забарвлення може з'явитися через декілька годин. Після процедури смужку виймають з розчину, після чого здійснюється візуальна оцінка результату реакції.

Контрольна лінія нейрамінідази у зоні виявлення використовується для оцінки функціональності аналізу. Повинне з'являтися темно-синє забарвлення контрольної зони.

Результати інтерпретуються наступним чином:

1) Якщо спостерігається рівномірно забарвлена лінія, то результат вважається позитивним, тобто проба містить вірус; інтенсивність кольору повинна бути порівнянна з інтенсивністю кольору контрольної лінії.

2) Якщо спостерігається слабо забарвлена лінія, то проба містить вірус у концентрації, недостатній для точного виявлення, витримування смужки у буфері № 5 повинне бути продовжене на всю ніч, або тест може бути повторений ще раз.

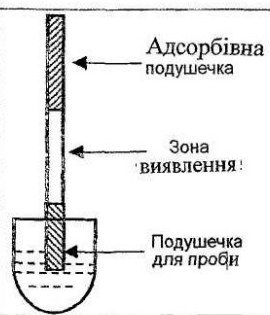
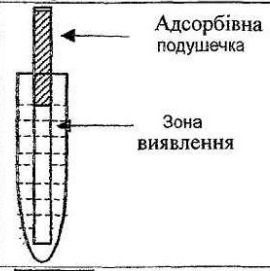

3) Відсутність забарвленої лінії означає, що у пробі немає вірусу, або його концентрація менша, ніж мінімальна межа виявлення.

4) Відсутність забарвленої лінії у зоні позитивного контролю означає або те, що експеримент проведений неправильно, або те, що NA у контрольній лінії була зруйнована; у цьому випадку рекомендується повторно протестувати пробу, використовуючи новий тест-набір.

Дані щодо чутливості тесту наведені у Таблиці 2.

Таблиця 1:

Схема способу виявлення згідно з винаходом

Крок	Процедура	Фігура	Умови
1	Пре-тестування препарату		
2	Змочування/хроматографія		Подушечка для проби на смужці вертикально поміщається в контейнер з пробною на 10 хв. при кімнатній температурі.
3	Промивання		Після вилучення подушечки із зразком частину смужки, що залишилася, поміщали у буфер промивки.
4	Проходження у темноті		20 хв. – 2 год. у темноті при 40°C у розчині субстрату нейрамінідази.

5	Інтерпретація результатів	<div> <div>Синя контрольна лінія</div> <div>Синя тестова лінія</div> <div>Позитивний</div> <div>Негативний</div> <div>Невірний</div> </div>	<p>Результати оцінюються візуально. У разі позитивного результату (проба містить вірус в концентрації більше, ніж межа виявлення) повинні спостерігатися дві лінії. Інтенсивність забарвлення тестової лінії повинна бути порівнянна з інтенсивністю кольору контрольної лінії. У разі негативного результату спостерігається тільки контрольна лінія. Необхідно повторити тест, якщо контрольної лінії не спостерігається.</p>
---	---------------------------	---	---

Приклад 3:

Виявлення вірусів грипу у курячих фекаліях за допомогою системи виявлення за винаходом

У даному прикладі використовуються ті ж самі матеріали та способи, що й у прикладі 2.

1. Було виконано багатократне розчинення проб, що містять вірус, у суспензії фекалій здорових курок (2 г сухої субстанції на 10 мл буфера). Це показало, що тест не чутливий і не специфічний до виявлення вірусу у фекаліях.

2. До свіжих курячих фекалій була додана 1/10 частина (об./об.) вірусу А/качка/Альберта/76 (HAR-титр 1:10), і суміш була гомогенізована. Після додавання буфера № 2 до гомогенату (1:1 об./об.) аліквот суспензії, що утворилася, був взятий та використаний в аналізі. Темно-синє забарвлення у

тестовій зоні з'явилося після 2 год. Коли курячі фекалії були додані до проб з таблиці 1 перед початком процедури, це не зробило ніякого помітного впливу на результати тесту.

Приклад 4:

Виявлення вірусів грипу у тканині легень мертвих курок за допомогою системи виявлення згідно з винаходом

У цьому прикладі використовуються ті ж самі матеріали та способи, що й у прикладі 2.

Тканини легень курки, померлої від інфекції вірусу грипу H5N1, були виділені дослідженням силіновим буфером (зібрані: Крим/січень 2006 р.). Може бути показано, що віруси грипу можуть бути достовірно виявлені в легенях дослідженого тіла курки.

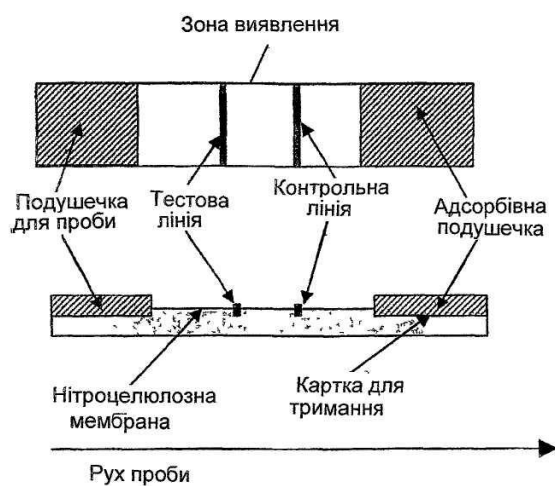
Таблиця 2:

Межа виявлення (LOD) вірусів пташиного грипу у пробах, що містять вірус, як було виявлено за допомогою тестової системи згідно з винаходом

№	Вірус	LOD для 2 год.	
		TCID ₅₀ /мл	HAR-титр/проба
1	А/качки/Альберта/35/76 (H1N1)	10 ⁵	4
2	А/качки/Франція/146/82 (H1N1)	2×10 ⁴	10 ⁻²
3	А/шилохвості/Примор'я/695/76 (H2N3)	2×10 ⁷	10
4	А/чайки/Астрахань/165/86 (H6N5)	10 ³	10 ⁻¹
5	А/FPV/Росток/34 (H7N1)	10 ⁴	1
6	А/дикої качки/NT/12/02 (H7N3)	5×10 ⁴	5×10 ⁻¹
7	А/дикої качки/Примор'я/3/82 (H9N2)	10 ⁶	10 ⁻¹
8	А/Гонконг/1073/99 (H9N2)	10 ⁵	1
9	А/дикої качки/Гур'єв/244/82 (H14N6)	5×10 ⁶	10 ⁻¹
10	А/дикої качки/РА/10218 (H5N2)	не визначено	10 ⁻²
11	А/качки/Потсдам/1402/6/86 (H5N2)	5×10 ²	5×10 ⁻¹
12	А/NIBRG-14 (H5N1) ^a	5×10 ³	5
13	А/курки/Курган/5/2005 (H5N1) 2 пасажі у MDCK	10 ⁴	<1
14	А/качки/Курган/8/2005 (H5N1) 2 пасажі у MDCK	10 ⁶	10 ⁻¹

^a – це вакцинний штам, що має гени HA та NA з А/В'єтнам/1194/04 патогенного вірусу і всі внутрішні гени білка іл А/Пуерто-Ріко/2/34.

Віруси були одержані з Інституту поліомієліту та вірусних енцефалітів (Московська область) і Інституту грипу (Санкт-Петербург).



Схематична діаграма тест-смужки для тесту методом розтікання краплі

Фіг. 1