



УКРАЇНА

(19) UA (11) 20685 (13) A

(51)6 C 12 N 1/00

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті  
на підставі Постанови Верховної Ради України  
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується  
в редакції заявника

(54) ЕКСПРЕС-МЕТОД ВІЯВЛЕННЯ ВІРУСНЕЙТРАЛІЗУЮЧИХ АНТИТІЛ В МОНО- І ПОЛІВАЛЕНТНИХ СІРОВАТКАХ КРОВІ

1

(21) 97020684  
(22) 18.02.97  
(24) 02.09.97  
(46) 27.02.98. Бюл. № 1  
(47) 02.09.97  
(72) Новожилова Євгенія Василівна  
(73) Інститут ветеринарної медицини

(57) Экспресс-метод выявления вируснейтрализующих антител в моно- и поливалентных сыворотках крови, включающий смешивание сыворотки с неизвестным вирусом, внесение этой смеси в систему репро-

2

дукции вируса, инкубацию ее и учет результатов, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что смесь исследуемой сыворотки с известным референтным вирусом вносят в суспензию чувствительной культуры клеток, инкубируют при 36–38°C 15–20 минут, добавляют флуоресцентный зонд ДСМ (ДСП-6), экспонируют 10–12 минут, определяют интенсивность флуоресценции, рассчитывают показатель флуоресценции К и при значении его меньше 1,5 делают вывод о наличии в сыворотке моно- или поликлональных антител с нейтрализующей активностью.

Изобретение относится к области иммунологии и может быть использовано для выявления и идентификации вируснейтрализующих антител в моно- и поливалентных сыворотках.

Наиболее близким техническим решением изобретения является реакция нейтрализации вирусов (РН), включающая смешивание рабочих разведений сыворотки с постоянной дозой вируса, инкубацию смеси в течение 1–2 часов (37°C), внесение этой смеси в чувствительную культуру клеток, контакт смеси с клетками в течение 2 часов, инкубацию смеси с клетками при 37°C 72–240 часов, затем визуальный учет результатов [1].

Недостатками известного способа являются: визуальный учет результатов; трудоемкость и длительность реакции;

невозможность работы с моноклональными антителами; невозможность постановки реакции с вирусами, не вызывающими ЦПД.

Для определения нейтрализующей активности продуктов синтеза гибридом (моноклональные антитела – МАт) используют иммуноферментный метод (МФМ), протекающий в 2 этапа:

1. Антигены иммобилизуют на поверхности пластиковых панелей и к ним добавляют надосадочную жидкость из культур гибридных клеток.

2. Связывание моноклональных антител (МАт) с антигеном определяют, инкубируя полученный комплекс с мечеными ферментом антителами к МАт. Чаще всего в реакциях используют продукты, синтезируемые гибридными клетками мыши. Тогда инкубируют конъюгат фермент–кроличьи Ат к IgG

(19) UA (11) 20685 (13) A

мыши. Если излучаемые МАТ специфичны к растворимым белкам, то их выявляют с помощью антигеном, неспецифически адсорбированных на поверхности пластика [2].

Однако, кроме трудоемкости и сложности описанных этапов, отмечают большие трудности использования ИФМ из-за повышенного уровня фона, создаваемого ферментативной активностью внутри клеток или на их поверхности.

Помимо всего, учет результатов ведется визуально, что также вызывает трудности в оценке результатов.

В основу изобретения поставлена задача, создать метод, устраняющий перечисленные недостатки прототипов и обладающий новыми качествами, как экспрессность, универсальность, количественный учет результатов, простота постановки реакции.

Поставленная задача решается тем, что в соответствии с изобретением учет результатов реакции проводят по значению показателя флуоресценции К, равному количественно измеренному отношению флуоресценции пробы "МАТ или поликлональные антитела + вирус" к флуоресценции контрольной пробы "вирус + известная гомологичная сыворотка к этому вирусу".

В соответствии со стандартами МЭБ, ставятся контроли:

"обратное" титрование используемого вируса (контроль его рабочей дозы);

контроль чувствительности культуры клеток;

контроль системы "вирус + нормальная сыворотка" и "вирус + гомологичная сыворотка к этому вирусу" [3].

Способ основан на феномене нейтрализации вируса специфичными антителами и на разнице в действии вируса и иммунного комплекса "вирус-антитело" на клетку-мишень.

При отсутствии специфичных антител адсорбция вируса на клетку приводит к активации клеточных мембран и достоверному (в 1,5 и более раз) увеличению флуоресценции инфицированных клеток, что регистрируется с помощью флуоресцентных зондов ДСМ (4-п-диметиламиностирил-1 метилпиридиния п-толуолсульфонат) или ДСП-6 и фотометра "ЛЮМАМ И-2".

Нейтрализация вируса специфичными антителами блокирует активацию мембран под действием вируса, препятствует его сорбции на клетки, вследствие чего изменений состояния мембран клетки-мишени не наблюдается (показатель флуоресценции К при этом меньше 1,5).

На основе полученных значений показателя флуоресценции К делается вывод о наличии или отсутствии в сыворотках нейтрализующих антител к известному вирусу.

Таким образом, значения показателя флуоресценции К меньше 1,5 свидетельствуют об образовании иммунного комплекса "вирус-антитело", а значит, о наличии в испытуемой моно- или поликлональной сыворотке антител с нейтрализующей активностью к известному вирусу. Значения К 1,5 свидетельствуют об отсутствии в испытуемой сыворотке нейтрализующих антител к известному вирусу.

Продолжительность исследования – 60 минут.

Достоверность получаемых результатов составляет 99,9% (по коэффициенту парной корреляции между выборками; программа "Statgraph" ВЦ ВНИИЗЖ. 1993) [4].

Для обоснования временного интервала инкубации системы "вирус-антитело-клетка" мы провели серию экспериментов по исследованию динамики сорбции вируса ящур (тип А22, шт. № 550) на монослой культуры клеток СП. В результате установлено, что сорбция вируса в основном завершилась в первые 5 мин экспозиции образца с чувствительными клетками (надсадок содержал лишь  $0,8 \pm 0,32\%$  БОЕ рабочей дозы вируса), а интенсификация флуоресценции совпадала с максимумом сорбции вируса на клетку. Отсюда были сделаны выводы, что активация клеточной мембраны, связанная с вирусной инфекцией, может быть выявлена с помощью флуоресцентных зондов на стадии адсорбции вируса на клетку; наиболее целесообразным является время инкубации системы "вирус-клетка" в пределах 15–30 минут. Это обеспечивает специфическую сорбцию вирусов на рецепторы клеток-мишеней и является необходимым и достаточным условием для получения достоверных результатов.

Время экспозиции образцов с зондом было найдено экспериментально, по установлению равновесного количества зонда в клетке и внутри нее. Расчеты велись по модифицированному уравнению Нернста

$$\Delta = RT \ln \frac{C_{\text{вкл}}}{C_{\text{вн}}},$$

где  $C_{\text{вкл}}$  – концентрация зонда в клетке;

$C_{\text{вн}}$  – концентрация зонда во внешней среде,

в результате чего было определено время 12–15 мин экспозиции с клетками.

Пример 1. Выявление и титрование антител в моно- и поливалентных сыворотках к пестивирусам, присланных в рамках

международного эксперимента "Inter-laboratory comparison test for antibodies against Classical Swine Fever virus. - July, 1996" (Пулава, Польша, июль 1996).

Берут два ряда пробирок с пробками. В первом ряду готовят последовательные 10-кратные ( $2^x$ ;  $3^x$  и т.п.) разведения исследуемых сывороток на 0,5% ГЛА или среде Игла.

Во второй ряд пробирок переносят по 0,1 мл каждого разведения и добавляют по 0,1 мл рабочего разведения референтного вируса с известным титром, перемешивают встряхиванием.

Далее полученной смесью каждого разведения по 0,1 мл инокулируют 0,5 мл суспензии чувствительной культуры клеток (1 проба - 1 флакон), встряхивают, инкубируют при  $36-38^\circ\text{C}$  20 минут, в каждый флакон добавляют 60 мкл флуоресцентного зонда ДСМ или СДП-6 и экспонируют 15 минут, после чего образец фотометрируют с помощью люминесцентного микроскопа "ЛЮ-МАМ", фотометрического устройства ФМЭЛ-1 и счетного цифрового прибора Щ-4300.

За единицу измерения принимают среднее значение интенсивности флуоресценции 25 интактных клеток контрольной суспензии, вычисленной по формуле

$$\bar{F} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_i$$

где  $F_i$  - значение флуоресценции  $i$ -клетки;  
 $n$  - число клеток (не меньше 25).

Для удобства и сопоставимости результатов введен показатель флуоресценции  $K$ , равный отношению флуоресценции пробы "испытуемая сыворотка + вирус" к контрольной пробе "вирус + гомологичная сыворотка к этому вирусу"

$$K = \frac{F(S_x + \text{вирус})}{F(S_{\text{изв.гомол}} + \text{вирус})}$$

При  $K < 1,5$  в сыворотке есть моно- или поликлональные антитела с нейтрализующей активностью к этому вирусу.

Предлагаемый метод обладает:

экспрессностью (30-60 мин против 72-240 час в реакции нейтрализации, 2 час в реакции ИФА);

универсальностью (метод испытан с положительными результатами на моделях 10 вирусов 7 семейств);

специфичностью (получены положительные результаты в рамках международного эксперимента по выявлению нейтрализующих антител к антигенно родственным вирусам классической чумы свиней и вирусной диареи КРС (Пулава, Польша, 1996);

высокой чувствительностью (метод взят в сравнение с международным стандартным методом NPLA);

возможностью ретроспективной диагностики смешанных инфекций;

упрощением постановки реакции и возможностью работы как с моновалентными, так и поликлональными антителами.

Упорядник

Техред М.Келемеш

Корректор М.Самборская

Замовлення 4397

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
 254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101



1000000



1000000

1000000

1000000

1000000

1000000

1000000

1000000