

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2473094

СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ЛАБОРАТОРНОЙ ЭКСПРЕСС- ДИАГНОСТИКИ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный минерально-сырьевой университет "Горный" (Горный университет) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2011109093

Приоритет изобретения 14 марта 2011 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 20 января 2013 г.

Срок действия патента истекает 14 марта 2031 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2473094**

(51) МПК
G01N33/53 (2006.01)

(13) **C2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2011109093/15, 14.03.2011**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: **14.03.2011**

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **14.03.2011**

(43) Дата публикации заявки: **20.09.2012**

(45) Опубликовано: **20.01.2013**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **SU 1833818 A1, 15.08.1993. RU 238875 C1, 10.03.2008. RU 2101356 C1, 10.01.1998.**

Адрес для переписки:

199106, Санкт-Петербург, В.О., 21 линия, 2, Горный университет, отдел ИС и ТТ

(72) Автор(ы):

**Поляков Виталий Евгеньевич (RU),
Полякова Вера Витальевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный минерально-сырьевой университет "Горный" (Горный университет) (RU)

(54) СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ЛАБОРАТОРНОЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а более конкретно, к способу и устройству лабораторной экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний. На лунках тест-планшета фиксируют антиген возбудителя, который инкубируют с испытываемой сывороткой или плазмой крови таким образом, что при наличии в них специфических антител связывают их с образованием комплекса антиген-антитело, инкубируют этот комплекс с меченым ферментом иммуноглобулинами, присоединяя их к имеющемуся комплексу антиген-антитело, и обеспечивают взаимодействие субстрата с ферментом, а интенсивность цветной реакции определяют по внутрирезонаторному поглощению спектральных составляющих в спектре излучения широкополосного лазера. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 4 ил.

Изобретение относится к области медицинской практики, а более конкретно, к созданию биомедицинских и ветеринарных технологий жизнеобеспечения и защиты человека и животных.

В известном способе лабораторной диагностики опасных инфекционных заболеваний (ИОЗ) наибольшее распространение получили методические приемы, ориентированные на детекцию в анализируемом материале различных маркеров инфекционного процесса - собственно возбудителей инфекций либо их частей (антигены, фрагменты генома), продуктов их жизнедеятельности (токсины, плацины) или же вырабатываемых в организме человека и животных специфических защитных белков, так называемых антител. Используются в этих целях, в частности, методы бактериологических посевов и диагностического выделения вирусов, риккетсий и микоплазм, а также различные варианты иммунофлуоресцентного, иммуносуппензионного, иммуноферментного и др. видов анализа. К сожалению, высокая диагностическая достоверность всем этим методам присуща только на далеко зашедших стадиях патологического процесса, когда маркеры в биоматериалах накапливаются в достаточно больших концентрациях и когда уже миновал, как правило, наиболее опасный для окружающих заразительный период заболевания, относительно затруднено лечение и менее оптимистичен прогноз его результатов (Лиглер, Т.Дж. Определение вирусной нагрузки ВИЧ / Т.Дж.Лиглер, Р.М.Грант. // Original Publication from: The HIV InSite Knowledge Base [http // hivinsite.ucsf.edu /](http://hivinsite.ucsf.edu/). Гладстоунский институт вирусологии и иммунологии. Regents of the University of California / Copyright 2001. - с.1-9.).

Развивающиеся в последние годы весьма интенсивно методы лабораторной диагностики на основе полимеразной цепной реакции амплификации генов, несмотря на свойственную им высочайшую (на уровне единичных фрагментов генома возбудителя) чувствительность, альтернативу названным выше не составили по причинам относительно высокой частоты ложноположительных результатов, громоздкости в методическом отношении, растянутости во времени.

Наиболее близким аналогом, используемым в практике лабораторной диагностики являются методические приемы и устройства, ориентированные на определение вирусов ОИЗ, относящиеся к методам иммуноферментного анализа. Данный способ и устройство приняты авторами за прототип (Покровский, В.И. Диагностика ВИЧ-инфекции. В книге «ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение.» / под ред. В.В.Покровского. Соруригнт Покровский В.В. М.: Тр. ЦНИИ эпидемиологии. 2000. - с.1-23.).

Иммуноферментный анализ (сокращенно ИФА, англ. enzyme-linked immunoSorbent assay, ELISA) - лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов.

В основе метода иммуноферментного анализа (ИФА) лежит принцип взаимодействия иммуносорбента - антигена возбудителя инфекции - с выявляемыми антителами и в соединении этого комплекса антиген-антитело с иммуноглобулинами, содержащим ферментную метку.

Иммуноглобулины, применяемые в таких тест-системах, так называемый конъюгат может быть получен на основе антивидовых антител (например, кроличьи антитела против иммуноглобулинов человека) или на основе антител, направленных против человеческих иммуноглобулинов определенного класса (M, G, A).

В зависимости от того, какие антитела использованы, тест-система будет выявлять в исследуемом образце или специфические антитела независимо от их класса, или антитела лишь определенного класса (например, только иммуноглобулин G или только иммуноглобулин M).

Существует несколько методов постановки реакции, однако в настоящее время используются в основном следующая схема: на лунках тест-планшета зафиксирован антиген возбудителя, который инкубируется с испытуемой сывороткой или плазмой крови. При наличии в них специфических антител происходит связывание их с образованием комплекса антиген-антитело.

При инкубации этого комплекса с мечеными ферментом иммуноглобулинами происходит присоединение их к имеющимся комплексам антиген-антитело, что приводит к взаимодействию субстрата с ферментом и отмечается цветная реакция, интенсивность которой зависит от количества связанных сывороточных антител.

В зависимости от того, какие антигены используются, все иммуноферментные тест-системы для выявления антител подразделяются на:

Лизатные - в которых используется нативный антиген (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре).

Рекомбинантные - в которых используются полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определенных белковых антигенов возбудителя.

Пептидные - использующие химически синтезированные фрагменты белков. Общее направление развития ИФА-диагностикумов - это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным.

Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог любого отдельного антигена.

Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо из всего антигенного многообразия возбудителя выбрать антигены, которые были бы высокоиммуногенными (то есть в организме инфицированного человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам в достаточно большом количестве) и высокоспецифичными (то есть характерными лишь для данного возбудителя и не дающими перекрестных реакций с антителами другой природы).

Кроме того, большое значение имеет качество очистки рекомбинантных белков. В идеальном случае возможно получение рекомбинантной тест-системы практически со 100% специфичностью при высокой чувствительности.

На практике этого не всегда удается достичь, однако специфичность лучших рекомбинантных тест-систем приближается к 100%.

Таким образом, за счет несомненных преимуществ иммуноферментного анализа: удобства в работе, быстроты, объективности за счет автоматизации учета результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза) в настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

Однако следует отметить, что иммуноферментный анализ может давать и ложные результаты. Ложноположительные могут возникнуть за счет ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счет антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приеме лекарственных препаратов; у новорожденных такие ложноположительные реакции могут возникать за счет образования в организме ребенка М-антител к иммуноглобулину G матери. Ложноотрицательные результаты реакции обусловлены конкуренцией между иммуноглобулинами М и G, а также техническими ошибками при постановке реакции.

По такому принципу построена основная масса тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: бактериальной (например, брюшной тиф, туляремия), риккетсиозной (например, эпидемический сыпной тиф, лихорадка Ку) и вирусной (например, ортопоксвирусные инфекции, ВИЧ-инфекция, птичий грипп, вирусные гепатиты), а также цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и другие инфекции.

Вместе с тем, установление факта инфицирования осуществляется путем комплексной оценки эпидемиологических, клинических и лабораторных критериев. Среди них важным критерием является лабораторный критерий. Таким образом, изыскание и разработка применительно к лабораторной диагностике ОИЗ новых аналитических технологий, обладающих преимуществами перед традиционными и лишенных их недостатков, является, несомненно, одной из актуальнейших задач.

При иммуноферментном анализе интенсивность цветной реакции зависит от количества связанных сывороточных антител. Для оценки результатов реакции в ИФА используют спектрофотометр, в котором источниками света служат галогенные и дейтериевые лампы, что обеспечивает излучение в широком диапазоне длин волн. Измеряемым параметром, по которому определяют наличие ферментной метки, является оптическая плотность, величина которой пропорциональна концентрации связанных сывороточных антител (закон Бэра). Пучок света проходит через маркер инфекционного процесса один раз, и при малом количестве связанных сывороточных антител (ранняя стадия заболевания) чувствительности спектрофотометра недостаточно для идентификации полосы поглощения (способ фотоклометрии).

Задачей, на решение которой направлено создание предполагаемого изобретения, является разработка способа и устройства лабораторной экспресс-диагностики начальных стадий опасных инфекционных заболеваний, когда маркеры в биоматериалах накапливаются в единичных концентрациях, используя феномен высочайшей чувствительности излучения широкополосного лазера к узкополосным потерям, вносимым вовнутрь оптического резонатора лазера.

Поставленная задача решается за счет того, что в способе лабораторной экспресс-диагностики начальных стадий опасных инфекционных заболеваний человека и животных, включающем формирование на поверхности носителя комплексов между молекулами антигена и специфическими антителами, находящимися в испытуемой объекте контроля, формирование в комплексах ферментной метки и анализ реакции антиген-антитело по появлению ферментативной активности или по изменению уровня этой активности, предлагается анализ реакции антиген-антитело проводить с помощью широкополосного лазера, предварительно поместив носитель в оптический резонатор этого лазера. При этом появление ферментативной активности фиксировать по появлению внутрирезонаторного поглощения спектральных составляющих в спектре излучения широкополосного лазера, тогда как уровень ферментативной активности определять по величине поглощения спектральных составляющих в спектре излучения широкополосного лазера.

Дополнительными отличиями предлагаемого способа является то, что

- формирование ферментной метки проводят путем введения в комплекс нерастворимых частиц, или радионуклидов, или ферментов, или флуоресцентных красителей;
- формирование ферментной метки проводят путем облучения комплексов с помощью трансиллюминатора типа УФО-254;
- формирование ферментной метки проводят путем окрашивания комплексов по Граму или Циллю-Нельсону.

Поставленная задача также решается за счет того, что в устройстве лабораторной экспресс-диагностики начальных стадий опасных инфекционных заболеваний человека и животных, включающем источник света, блок преобразования оптического сигнала в электрический, систему обработки полученной информации, предлагается в качестве источника света использовать широкополосный лазер на красителях с когерентной накачкой. Блок преобразования оптического сигнала в электрический предлагается выполнить из последовательно соединенных монохроматора, фотоумножителя и контроллера. Систему обработки полученных результатов предлагается выполнить на основе персональной ЭВМ и принтера.

Дополнительными отличиями предлагаемого устройства являются:

- широкополосный лазер имеет три заменяемые активные жидкостные среды (этанольные растворы кумаринов, оксазинов и родаминов);

- в качестве устройства для когерентной накачки используется твердотельный лазер с модулированной добротностью и умножителями частоты и/или лазер на азоте, ионный аргоновый и эксимерные лазеры;
- в качестве источника света используется широкополосный лазер на красителях с когерентной накачкой, работающий в импульсном и/или непрерывном режиме излучения.

Сущность предлагаемого технического решения заключается в том, что на лунках тест-планшета фиксируют антиген возбудителя, который инкубируют с испытываемой сывороткой или плазмой крови таким образом, что при наличии в них специфических антител, связывают их с образованием комплекса антиген-антитело, инкубируют этот комплекс с меченым ферментом иммуноглобулинами, присоединяя их к имеющемуся комплексу антиген-антитело и обеспечивают взаимодействие субстрата с ферментом, а интенсивность цветной реакции определяют по внутрирезонаторному поглощению спектральных составляющих в спектре излучения широкополосного лазера. Наличие поглощения несет информацию о присутствии в маркере специфических антител, а величина поглощения - о количестве связанных сывороточных антител. Через маркер инфекционного процесса, установленный в кювете внутри оптического резонатора широкополосного лазера, пучок света за время анализа проходит сотни тысяч раз, отсюда интегральная величина внутрирезонаторного поглощения позволяет зарегистрировать наличие в маркере одного связанного сывороточного антитела. Предлагаемая технология экспресс-диагностики ОИЗ может быть использована и при других способах окраски вирусов, например при окраске ВИЧ-вируса путем облучения с помощью трансиллюминатора типа УФО-254, после имплицации и иммобилизации. В этом случае вирус приобретает ферментную метку на длине волны 450 нм.

Аналогичным образом могут быть идентифицированы бактерии, предварительно окрашенные по Граму или Циллю-Нельсону.

Показатель поглощения α_λ для света с длиной волны λ определяется из уравнения

$$\alpha_\lambda = -d^{-1} \ln I_\lambda / I_{\lambda_0}$$

где I_λ - интенсивность спектральной линии в спектре излучения широкополосного лазера после прохождения через маркер с ферментной меткой;

$$I_{\lambda_0}$$

- интенсивность спектральной линии в спектре излучения широкополосного лазера при отсутствии маркера с ферментной меткой в оптическом резонаторе лазера;

d - толщина слоя маркера с ферментной меткой (толщина кюветы).

Устройство для реализации способа экспресс-диагностики начальных стадий опасных инфекционных заболеваний человека и животных в качестве источника излучения содержит широкополосный лазер на красителях с когерентной накачкой, внутри оптического резонатора которого дополнительно установлена кювета с контролируемым маркером, а приемный канал содержит следующие друг за другом монохроматор, фотоэлектрический умножитель, контроллер, компьютер, монитор и принтер.

Широкополосный лазер имеет три заменяемые активные жидкостные среды (этанольные растворы кумаринов, оксазинов и родаминов), что обеспечивает излучение в широком диапазоне длин волн $\sim(400-700)$ нм.

В качестве когерентного источника накачки используется твердотельный ИАГ: Nd^{3+} -лазер с модулированной добротностью и умножителем частоты, что позволяет работать в режиме «гигантского» импульса на разных гармониках. Контроллер выполнен так, что он управляет шаговым двигателем дифракционной решетки монохроматора, обеспечивает электрическим питанием фотоэлектрический умножитель и имеет интерфейс с компьютером, который снабжен программой с тремя меню: «сканирование», «кинетика» и «концентрация». Спектроскопическая кювета, в которой установлен маркер с возбудителями инфекций, изготовлена из полиметилметакрилата и является разовой.

На фиг.1. показано окно программы для определения ферментной метки и интенсивности окраски.

На фиг.2. показана огибающая спектра излучения широкополосного лазера на этанольном растворе, например, красителя родамин 6Ж, в случае отсутствия внутри резонатора кюветы с маркером инфекционного процесса.

На фиг.3 показана огибающая спектра излучения широкополосного лазера в случае, если кювета с маркером находится внутри оптического резонатора, а возбудитель инфекционного процесса имеет ферментную метку с полосой поглощения, лежащей в полосе излучения широкополосного лазера.

На фиг.4 показана функциональная схема устройства, реализующая предлагаемый способ.

Показанное на фиг.1 окно программы, которая имеет три меню: сканирование, кинетика и концентрация, позволяет анализировать огибающие спектров излучения широкополосного лазера на красителях со сменными активными жидкостными средами при отсутствии маркера внутри резонатора. При использовании красителей кумарин-родамин-оксазин диапазон длин волн, в котором производятся измерения, составляет 400-700 нм. Программа позволяет производить запись огибающих спектров излучения широкополосного лазера в различных диапазонах длин волн, обеспечивает необходимое число повторов, усредняет полученные результаты, измеряет амплитуду каждой частотной составляющей в спектре излучения и сохраняет в памяти компьютера.

Огибающая спектра излучения широкополосного лазера при отсутствии маркера в оптическом резонаторе, показанная на фиг.2, в случае, если активной средой является этанольный раствор родамина 6Ж, представляет собой «гладкую» кривую, в которой отсутствуют поглощенные спектральные составляющие.

На фиг.3 показана огибающая спектра излучения широкополосного лазера в случае, если кювета с маркером находится внутри оптического резонатора и маркер инфекционного процесса содержит единичное количество антител, имеющих полосу поглощения, лежащую в спектре излучения лазера. Наблюдается разрыв первого рода в огибающей спектра излучения за счет внутрирезонаторного поглощения частотных составляющих. Программа обеспечивает измерение длины волны поглощающей составляющей, измерение величины поглощения путем сравнения с аналогичной составляющей в излучении лазера без маркера и определяет концентрацию антител в маркере. Время измерения составляет не более 10 секунд, и за это время пучок света от лазера проходит через маркер сотни тысяч раз, а величина интегрального поглощения становится такой, что ее можно измерить даже если в маркере находится единичный возбуждатель или единичное антитело.

На фиг.4 приведена функциональная схема устройства, которое содержит в качестве источника света широкополосный лазер на красителях с когерентной накачкой, у которого позицией 1 показано выходное зеркало оптического резонатора, позицией 2 - глухое зеркало оптического резонатора, позицией 3 - кювета с маркером, содержащим носители инфекционного процесса, позицией 4 - дисперсионный двухпризмный элемент, позицией 5 показана жидкостная активная среда широкополосного лазера на красителях, а позицией 12 - когерентный источник накачки в виде твердотельного лазера с модулированной добротностью и умножителями частоты, содержащий блок питания твердотельного лазера (позиция 13). Устройство также содержит блок преобразования оптического сигнала в электрический, который состоит из последовательно соединенных монохроматора (позиция 7), фотоумножителя (позиция 8) и контроллера (позиция 9), а система обработки полученных результатов содержит персональную ЭВМ (позиция 10) и принтер (позиция 11). Контроллер 9 выполнен так, что он управляет шаговым двигателем дифракционной решетки монохроматора 7, обеспечивает электрическим питанием фотоэлектрический умножитель 8 и имеет интерфейс с компьютером 10.

Система обработки полученных результатов снабжена программой с тремя меню: сканирование, кинетика и концентрация, что позволяет проводить измерения сигналов ФЭУ, сканирование спектров, кинетические измерения, хранение, математическую обработку и отображение результатов измерения, с сохранением значений параметров работы и файлов со спектрами.

Широкополосный лазер имеет три заменяемые жидкостные активные среды (этанольные растворы кумаринов, оксазинов и родаминов), что обеспечивает излучение лазера в диапазоне длин волн (400-700) нм.

В качестве источника когерентной накачки используется твердотельный лазер с модулированной добротностью и умножителем частоты и/или лазер на азоте, ионный аргоновый и эксимерные лазеры.

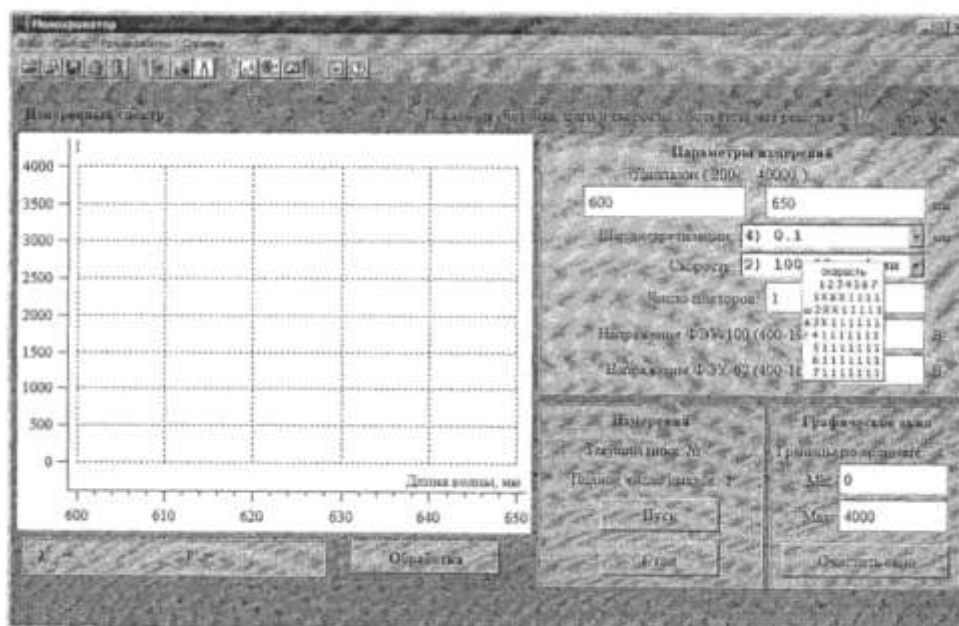
В качестве источника света используется широкополосный лазер на красителях с когерентной накачкой, работающий в импульсном и/или непрерывном режиме излучения.

Следует отметить, что разработанный способ и устройство лабораторной экспресс-диагностики начальных стадий ОИЗ человека и животных, не имеющих по совокупности ожидаемых тактико-технических характеристик отечественных и зарубежных аналогов, может найти широкое применение в лабораторной практике клинико-диагностических, санитарно-эпидемиологических, ветеринарно-эпизоотологических и фито-контрольных учреждений, в производственно-контрольных лабораториях водопроводных станций и предприятий пищевой отрасли, лабораториях экологического контроля и др. аналогичных им по профилю деятельности, а также в научно-исследовательских учреждениях самых различных отраслей. В дальнейшем предлагаемый способ и устройство получат развитие в интересах лабораторной диагностики и других заболеваний, при которых в органах и тканях человека и животных, в их нормальных и патологических выделениях появляются несвойственные в нормальных условиях вещества, либо содержание «нормальных» компонентов отклоняется в ту или иную сторону от обычных уровней.

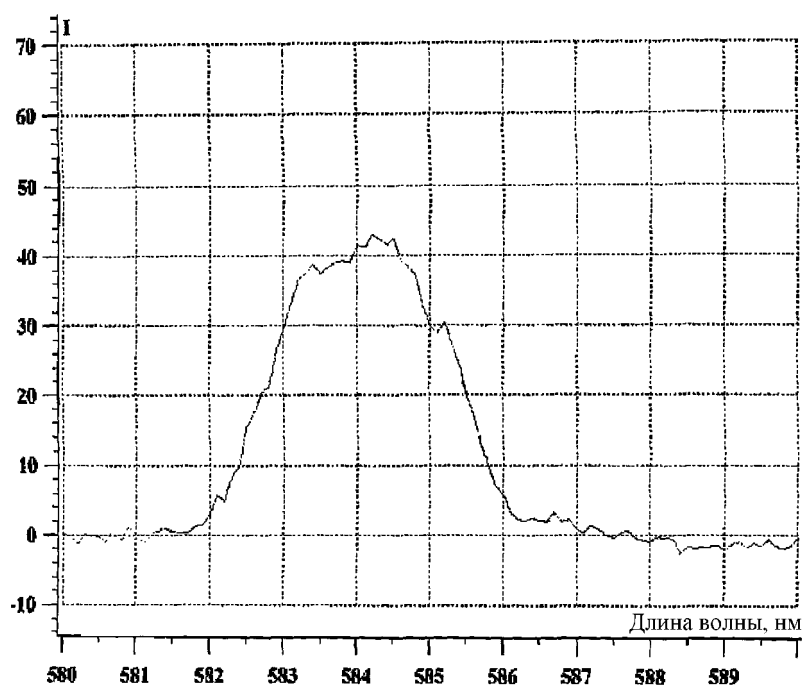
Формула изобретения

1. Способ лабораторной экспресс-диагностики начальных стадий опасных инфекционных заболеваний человека и животных, включающий формирование на поверхности носителя комплексов между молекулами антигена и специфическими антителами, находящимися в испытуемом объекте контроля, формирование в комплексах ферментной метки и анализ реакции антиген-антитело по появлению ферментативной активности или по изменению уровня этой активности, отличающийся тем, что анализ реакции антиген-антитело проводят с помощью широкополосного лазера, предварительно поместив носитель в оптический резонатор этого лазера, причем появление ферментативной активности фиксируют по появлению внутрирезонаторного поглощения спектральных составляющих в спектре излучения широкополосного лазера, тогда как уровень ферментативной активности - по величине поглощения спектральных составляющих в спектре излучения широкополосного лазера.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что формирование ферментной метки проводят путем введения в комплекс нерастворимых частиц, или радионуклидов, или ферментов, или флуоресцентных красителей.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что формирование ферментной метки проводят путем облучения комплексов с помощью трансиллюминатора типа УФО-254.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что формирование ферментной метки проводят путем окрашивания комплексов по Граму или Цилю-Нельсону.

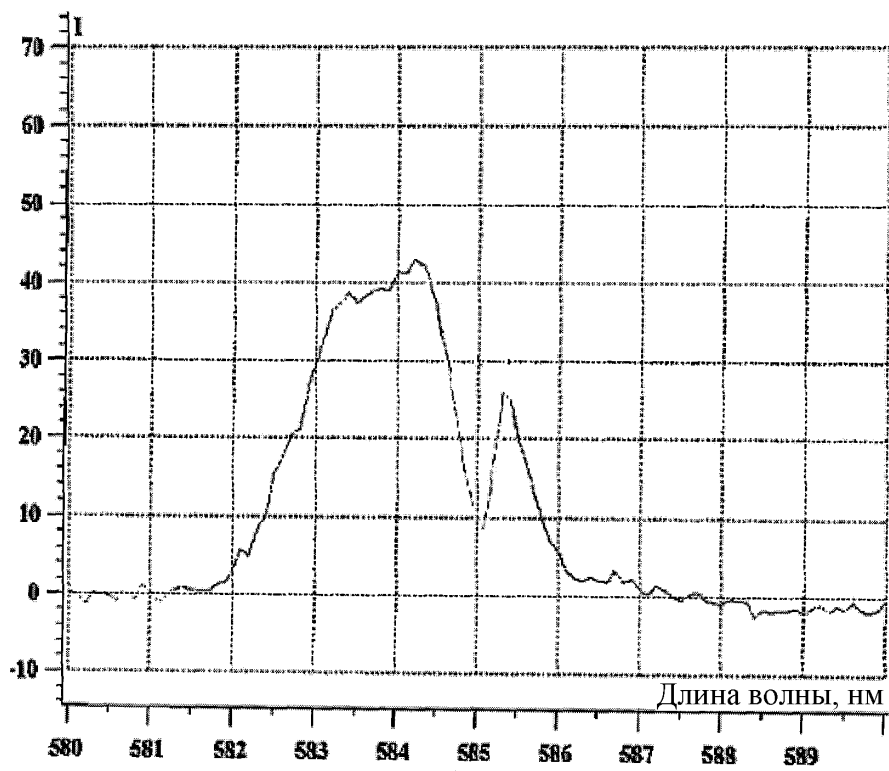
5. Устройство лабораторной экспресс-диагностики начальных стадий опасных инфекционных заболеваний человека и животных для осуществления способа по п.1, включающее источник света, блок преобразования оптического сигнала в электрический, систему обработки полученной информации, отличающееся тем, что в качестве источника света использован широкополосный лазер на красителях с когерентной накачкой, блок преобразования оптического сигнала в электрический состоит из последовательно соединенных монохроматора, фотоумножителя и контроллера, система обработки полученных результатов содержит персональную ЭВМ и принтер.
6. Устройство по п.5, отличающееся тем, что широкополосный лазер имеет три заменяемые активные жидкостные среды (эталонные растворы кумаринов, оксазинов и родаминов).
7. Устройство по п.5, отличающееся тем, что в качестве устройства для когерентной накачки используется твердотельный лазер с модулированной добротностью и умножителями частоты.
8. Устройство по п.5, отличающееся тем, что в качестве источника света используется широкополосный лазер на красителях с когерентной накачкой, работающий в импульсном и/или непрерывном режиме излучения.
9. Устройство по пп.6 и 7, отличающееся тем, что в качестве устройства для когерентной накачки различных активных жидкостных сред используется лазер на азоте, ионный аргонный и эксимерные лазеры.



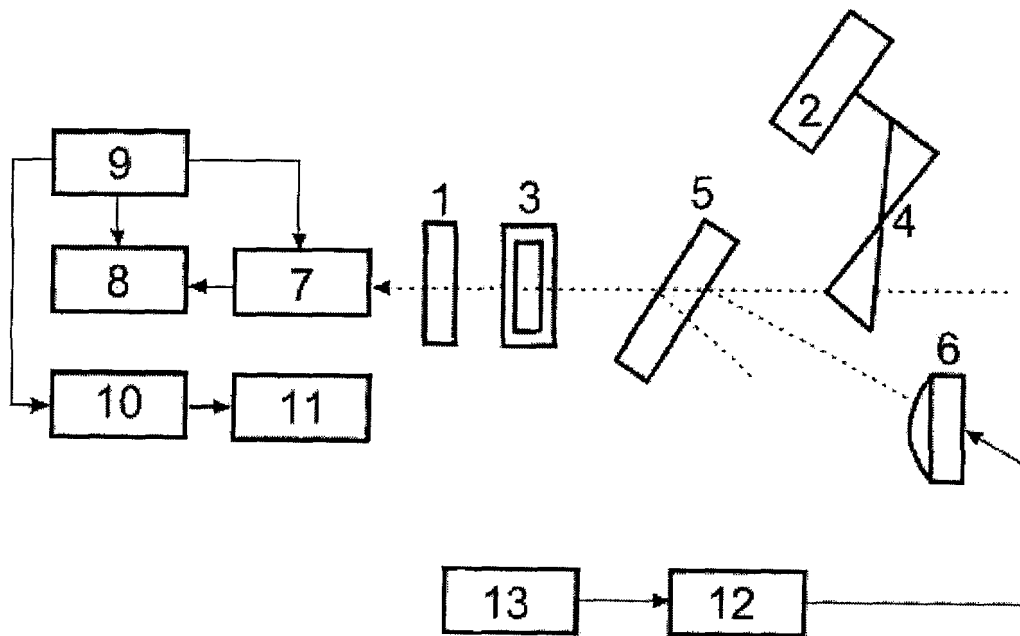
Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4