



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/00 (2020.08); *G01N 33/53* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020131639, 25.09.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.09.2020

Дата регистрации:
22.01.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.09.2020

(45) Опубликовано: 22.01.2021 Бюл. № 3

Адрес для переписки:
117593, Москва, ул. Соловьиный пр-д, 14, кв.
352, Попова Анна Олеговна

(72) Автор(ы):

Сотников Дмитрий Васильевич (RU),
Жердев Анатолий Виталиевич (RU),
Дзантиев Борис Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное
учреждение "Федеральный
исследовательский центр "Фундаментальные
основы биотехнологии" Российской академии
наук" (ФИЦ Биотехнологии РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2532352 С2, 10.11.2014. RU
2545909 С2, 10.04.2015. СОТНИКОВ Д.В.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ
АНТИТЕЛ МЕТОДОМ
ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ:
КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ
ЗАКОНОМЕРНОСТИ И
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ /
Диссерт. на соис. уч. степ. к.х.н., Москва, 2016.
SOTNIKOV D.V. et al. Theoretical and
Experimental Comparison of Different Formats
of Immunochromatographic (см. прод.)

(54) СПОСОБ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СЕРОДИАГНОСТИКИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫМ ДОБАВЛЕНИЕМ РЕАГЕНТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии, медицинской и ветеринарной диагностике и представляет собой способ проведения иммунохроматографической серодиагностики. Способ иммунохроматографической серодиагностики с последовательным добавлением реагентов для определения специфических антител посредством использования (1) мультимембранного композита, в котором на функциональном участке иммобилизуется антиген патогенного организма, (2) раствора, содержащего меченый иммуноглобулин-связывающий белок; (3)

смывающего буфера характеризуется тем, что на разные участки начальной мембраны мультимембранного композита последовательно добавляются: проба, раствор, содержащий меченый иммуноглобулин-связывающий белок; и смывающий буфер; при этом зоны для нанесения реагентов располагаются следующим образом: зона для меченого иммуноглобулин-связывающего белка располагается между зоной для нанесения пробы и зоной для нанесения смывающего буфера; зона для нанесения пробы соприкасается с рабочей мембраной тест-полоски, на которой располагается аналитическая зона, и

при этом отсутствует подложка для нанесения достоверности анализа. 1 пр., 2 ил.
конъюгата. Изобретение обеспечивает повышение

(56) (продолжение):

Serodiagnostics / Sensors 2018, 18, 36, 15 pages. BARSHEVSKAYA L.V. et al. Triple Immunochromatographic System for Simultaneous Serodiagnosis of Bovine Brucellosis, Tuberculosis, and Leukemia / Biosensors 2019, 9, 115; 10 pages.

R U 2 7 4 1 1 9 9 C 1

R U 2 7 4 1 1 9 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/00 (2020.08); G01N 33/53 (2020.08)(21)(22) Application: **2020131639, 25.09.2020**(24) Effective date for property rights:
25.09.2020Registration date:
22.01.2021

Priority:

(22) Date of filing: **25.09.2020**(45) Date of publication: **22.01.2021** Bull. № 3

Mail address:

**117593, Moskva, ul. Solovinyj pr-d, 14, kv. 352,
Popova Anna Olegovna**

(72) Inventor(s):

**Sotnikov Dmitrij Vasilevich (RU),
Zherdev Anatolij Vitalievich (RU),
Dzantiev Boris Borisovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe
uchrezhdenie "Federalnyj issledovatel'skij tsentr
"Fundamentalnye osnovy biotekhnologii"
Rossijskoj akademii nauk" (FITS Biotekhnologii
RAN) (RU)**(54) **METHOD OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SERODIAGNOSY WITH SEQUENTIAL ADDITION OF REAGENTS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to immunology, medical and veterinary diagnostics and represents a method for conducting immunochromatographic serodiagnosis. Method for immunochromatographic serodiagnosis with successive addition of reagents for determining specific antibodies by using (1) a multi-membrane composite, in which a pathogen organism antigen is immobilized in a functional region, (2) a solution containing a labeled immunoglobulin-binding protein; (3) of the wash buffer is characterized by the following: a sample, a solution containing the labeled immunoglobulin-binding protein are sequentially added

to different sections of the initial membrane of the multimembrane composite; and a washing buffer; wherein the reagent application areas are located as follows: a region for the labeled immunoglobulin-binding protein is located between the sample application zone and the washing buffer application zone; zone for application of the sample touches the working membrane of the test strip, on which the analytical zone is located, and there is no substrate for applying the conjugate.

EFFECT: invention provides higher reliability of analysis.

1 cl, 1 ex, 2 dwg

Изобретение относится к области иммунологии, медицинской и ветеринарной диагностике и представляет собой способ проведения иммунохроматографической серодиагностики. Одним из основных методов скрининговой диагностики бруцеллеза является серодиагностика - определение специфических антител против антигенов возбудителя бруцеллеза в крови зараженных животных (*P. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology-E-Book, 13th ed.; Elsevier Ltd.: St. Louis, MO, USA, 2013; p. 1056. ISBN 9780323083300*). Особенно перспективным представляется реализация серодиагностики в формате иммунохроматографии (ИХ), позволяющей проводить диагностику непосредственно на месте отбора проб неквалифицированным персоналом. Принцип работы ИХ основан на движении жидкой пробы вдоль мембран (формирующих тест-полоску) под действием капиллярных сил, которое приводит к последовательному взаимодействию реагентов на разных участках мембран и окрашиванию функциональных участков тест-полоски. Благодаря такой реализации анализа количество манипуляционных стадий сводится к минимуму, что делает ИХ идеальным решением для внелабораторной диагностики.

Традиционная схема иммунохроматографического анализа для серодиагностики основана на взаимодействии иммуноглобулинов в тестируемой сыворотке крови с меченым иммуноглобулин-связывающим реагентом (обычно в качестве такового реагента выбирают антивидовые антитела, белок А из *Staphylococcus aureus* или белок G из *Streptococcus spp.*). Традиционно меченый иммуноглобулин-связывающий реагент предварительно наносится и высушивается на специальной подложке, расположенной между мембраной для нанесения пробы и рабочей мембраной с аналитической зоной. После добавления жидкой пробы она протекает через подложку с меченым иммуноглобулин-связывающим реагентом. Вследствие этого проба смешивается с меченым иммуноглобулин-связывающим реагентом, который связывает все иммуноглобулины в пробе. Последующая детекция специфических антител, образовавших комплекс с меткой, осуществляется путем их взаимодействия в аналитической зоне тест-полоски с иммобилизованным антигеном, что приводит к концентрированию метки в аналитической зоне и формированию окрашенной полосы (*Sajid, M., Kawde, A.N., & Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. Journal of Saudi Chemical Society, 19(6), 689-705.*). На данном принципе основано большинство используемых на сегодняшний день систем для ИХ-серодиагностики, в частности тест-система для серодиагностики лейкоза крупного рогатого скота, описанная Mukantayev и соавт. (Mukantayev, K., Tursunov, K., Raimbek, G., Shustov, A., Begaliyeva, A., Ingirbay, B., Mukanov, K. & Ramanculov, E. (2018). IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR DIAGNOSIS OF BOVINE LEUKAEMIA VIRUS INFECTION IN COWS USING THE RECOMBINANT PROTEIN GP51. *Veterinarija ir Zootechnika, 76(98)*. <https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2018/76/pdf/mukantayev.pdf>), использованная в настоящей заявке в качестве наиболее близкого аналога.

Схематичное изображение тест-полоски, основанной на данном принципе, представлено на рис. 1А. Тест-полоска для ИХ-серодиагностики с традиционной схемой включает следующий набор компонентов:

- начальная мембрана, абсорбирующая образец, на которую наносится анализируемая проба;
- подложка под конъюгат, на которую наносится конъюгат маркера с рецепторными молекулами (антивидовыми антителами, белками А/Г и пр.);
- рабочей мембраны с иммобилизованным антигеном патогена;
- конечной абсорбирующей мембраны, впитывающей жидкость, протекающую через

рабочую мембрану.

Процедура анализа в данной системе сводится к добавлению на один и тот же участок начальной абсорбирующей мембраны пробы и разбавляющего буфера и, через 10-15 мин, регистрацию результатов анализа.

5 Данная схема ИХ-серодиагностики предполагает взаимодействие всех иммуноглобулинов, содержащихся в пробе, с реагентом для связывания иммуноглобулинов. С антигеном же взаимодействует только небольшая доля специфических к нему иммуноглобулинов, которая обычно не превышает 1% от общей концентрации иммуноглобулинов в крови. Таким образом, сигнал ИХ-анализа
10 (интенсивность окраски аналитической зоны) в традиционной схеме зависит не только от концентрации специфических антител, но и от общего содержания иммуноглобулинов в пробе, что не является диагностически значимым параметром. Конкуренция между специфическими и общими иммуноглобулинами за связывание с иммуноглобулин-связывающим белком негативно сказывается на достоверности диагностики. Поэтому
15 иммунохроматография зачастую уступает по чувствительности альтернативным методам серодиагностики (*Sotnikov, D. V., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2017). Theoretical and experimental comparison of different formats of immunochromatographic serodiagnostics. Sensors, 18(1), 36.*).

Предлагаемый альтернативный способ ИХ-серодиагностики заключается в
20 разделении стадий связывания специфических иммуноглобулинов с иммобилизованным антигеном и меченым иммуноглобулин-связывающим белком. Для последовательного связывания иммуноглобулинов и меченого реагента в аналитической зоне проба, раствор, содержащий меченый иммуноглобулин-связывающий белок и смывающий буфер последовательно наносятся на начальную мембрану тест-полоски как показано
25 на рис. 1Б. На первой стадии специфические иммуноглобулины в пробе сначала взаимодействуют с антигеном в аналитической зоне, при этом не связавшиеся иммуноглобулины увлекаются потоком жидкости и вымываются из реакционной зоны. На второй стадии иммуноглобулины, связавшиеся в аналитической зоне, проявляются посредством взаимодействия с меченым иммуноглобулин-связывающим белком.
30 Смывающий буфер необходим для поддержания постоянного потока жидкости через мембраны теста. Состав тест-полоски отличается от традиционного только отсутствием подложки под конъюгат. Продолжительность анализа составляет 10-15 мин.

Преимущество предлагаемого подхода продемонстрировано на примере ИХ-системы для определения специфических антител против рекомбинантного антигена Р24 вируса
35 лейкоза крупного рогатого скота.

Пример

Для формирования тест-систем использовали набор мембран компании Advanced Microdevices (Индия), включающий рабочую мембрану CNPC15, подложку под конъюгат РТ-R5 (только в тест-системе с традиционным форматом), мембрану для нанесения
40 образца GFB-R4 и конечную адсорбирующую мембрану CFSP 223000 Millipore (США).

Для формирования аналитической зоны использовали антиген Р24 производства РГП «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан. На 1 см полосы наносили 2 мкл раствора антигена (1 мг/мл в 100 мМ Na - цитратном буфере, рН 6). Конъюгат коллоидного золота (средний
45 диаметр частиц 25 нм) со стрептококковым белком G синтезировали при концентрации белка 10 мкг/мл и оптической плотности золота $D_{520}=1$. Конъюгат очищали от не связавшегося белка посредством центрифугирования при 10000 g и концентрировали до $D_{520}=20$. Для тест-системы в традиционном формате (рис. 1А) конъюгат наносили

на подложку в объеме 15 мкл на 1 см полосы. В тест-системе в предложенном альтернативном формате (рис. 1Б) конъюгат использовали в жидком виде, нанося 5 мкл конъюгата $D_{520}=20$ на начальную адсорбирующую мембрану непосредственно после добавления анализируемой пробы. Для нанесения реагентов использовали диспенсер «IsoFlow» фирмы «Imagene Technology» (США). Листы мембран с нанесенными иммунореагентами нарезали на индивидуальные тест-полоски шириной 3,5 мм.

Иммунохроматографический анализ проводили при комнатной температуре. В тест-системе с традиционным форматом анализа (рис. 1А) на начальную адсорбирующую мембрану наносили 10 мкл сыворотки крови коровы зараженной вирусом лейкоза КРС. Затем в то же место наносили 50 мкл разбавляющего раствора (50 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,4, с 0,1 М NaCl и 1% Tween-20). Фиксацию результата тестирования осуществляли через 10 мин.

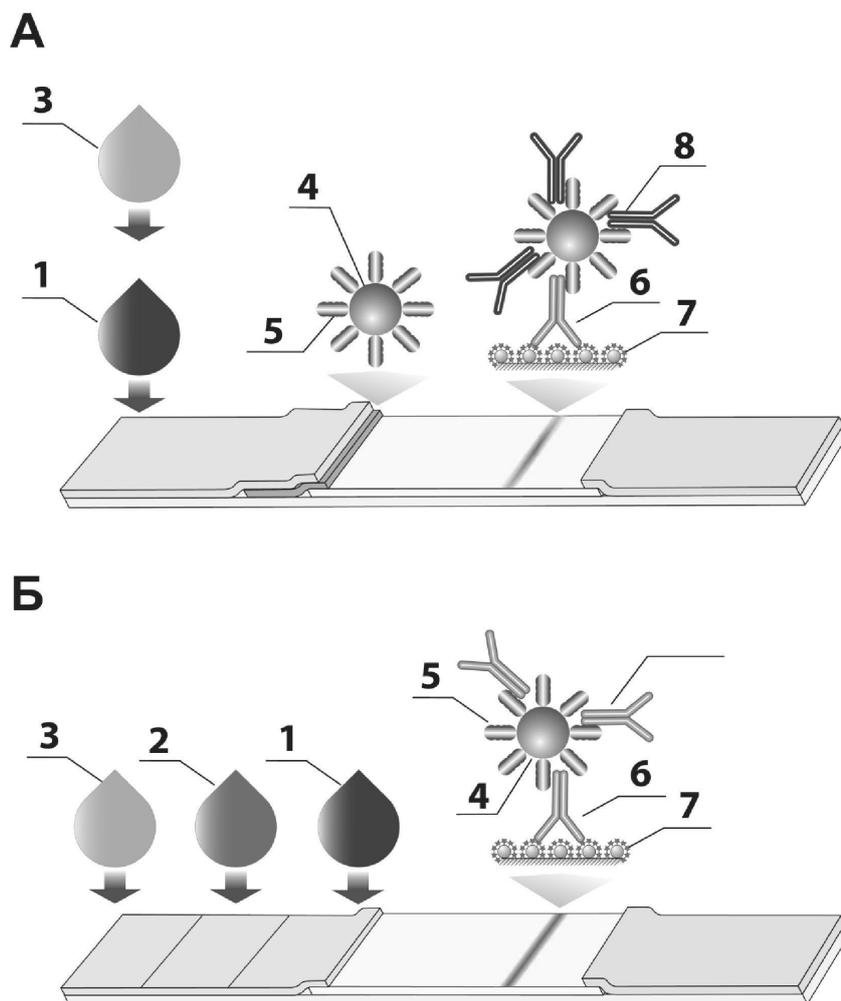
В тест-системе с предложенным альтернативным форматом анализа (рис. 1Б) на начальную адсорбирующую мембрану наносили 5 мкл сыворотки крови коровы зараженной вирусом лейкоза КРС. Далее примерно на 1 см ниже места нанесения сыворотки наносили 5 мкл конъюгата белка G с коллоидным золотом $D_{520}=20$. Затем примерно на 1 см ниже места нанесения конъюгата наносили 50 мкл смывающего раствора (50 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,4, с 0,1 М NaCl и 1% Tween-20). Фиксацию результата тестирования осуществляли через 10 мин.

Пример результата тестирования сыворотки крови коровы с диагнозом «лейкоз» в двух форматах анализа представлен на рис. 2. Представленные результаты демонстрируют повышение интенсивности сигнала в аналитической зоне в предложенном способе серодиагностики и, таким образом, повышение достоверности анализа.

(57) Формула изобретения

Способ иммунохроматографической серодиагностики с последовательным добавлением реагентов для определения специфических антител посредством использования (1) мультимембранного композита, в котором на функциональном участке иммобилизуется антиген патогенного организма, (2) раствора, содержащего меченый иммуноглобулин-связывающий белок; (3) смывающего буфера, характеризующийся тем, что на разные участки начальной мембраны мультимембранного композита последовательно добавляются: проба, раствор, содержащий меченый иммуноглобулин-связывающий белок; и смывающий буфер; при этом зоны для нанесения реагентов располагаются следующим образом: зона для меченого иммуноглобулин-связывающего белка располагается между зоной для нанесения пробы и зоной для нанесения смывающего буфера; зона для нанесения пробы соприкасается с рабочей мембраной тест-полоски, на которой располагается аналитическая зона, и при этом отсутствует подложка для нанесения конъюгата.

1



Схемы иммунохроматографических систем для серодиагностики. А. – традиционный способ анализа. Б. – предложенный альтернативный способ анализа. 1. – Сыворотка крови; 2. – Раствор конъюгата белка G с золотыми наночастицами; 3. – Разбавитель; 4. – Золотые наночастицы; 5. – Белок G; 6. – Специфические иммуноглобулины; 7. – Антиген; 8. – Неспецифические иммуноглобулины

Рис. 1

2

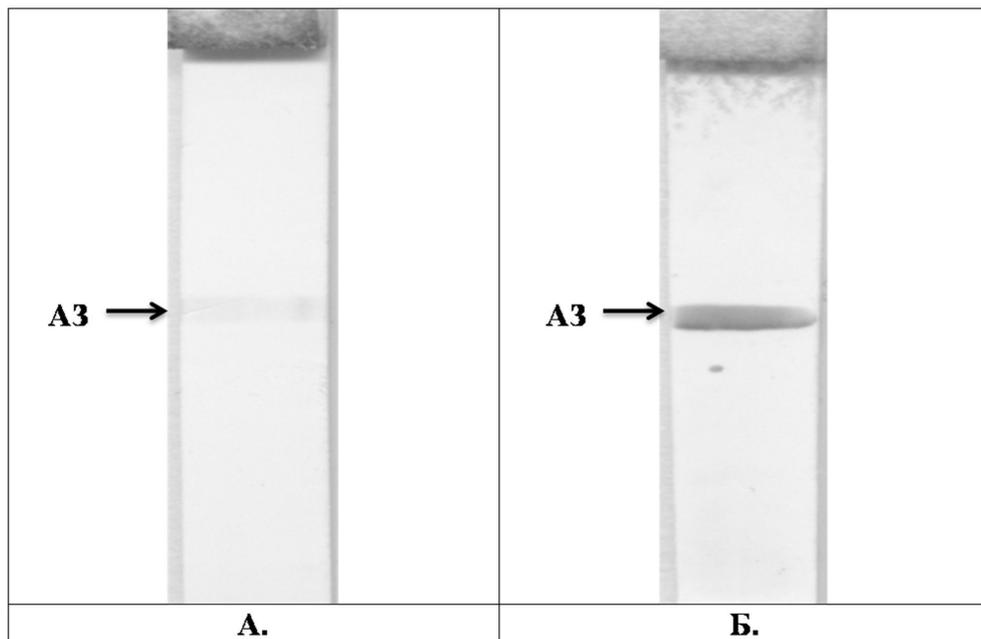


Рис. 2. Тестирование сыворотки крови коровы, зараженной вирусом лейкоза крупного рогатого скота (А) традиционным способом иммунохроматографической серодиагностики и (Б) альтернативным способом иммунохроматографической серодиагностики, предлагаемом в настоящей заявке. АЗ – аналитическая зона