

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

201 4 г.

Регистрационный № 240-1213

**МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ПРОТЕАЗОУСТОЙЧИВОГО КОМПОНЕНТА
ПРИОННОГО БЕЛКА PrP^{Sc}27-30 ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АМИЛОИДОЗОВ ИНФЕКЦИОННОЙ
И НЕИНФЕКЦИОННОЙ ПРИРОДЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», Государственное научное учреждение «Институт химии новых материалов НАН Беларуси»

АВТОРЫ:

к.б.н. доцент Капитулец С.П., д.м.н. профессор Докукина Т.В., к.х.н. Жавнерко Г.К., к.б.н. доцент Капитулец Н.Н., к.м.н. Махров М.В., Парибок И.В., Ничипорук О.И.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

06.03.2014

Регистрационный № 240-1213

**МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ПРОТЕАЗОУСТОЙЧИВОГО КОМПОНЕНТА
ПРИОННОГО БЕЛКА PrP^{Sc}27-30 ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АМИЛОИДОВ ИНФЕКЦИОННОЙ
И НЕИНФЕКЦИОННОЙ ПРИРОДЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси»

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доц. С.П. Капитулец, д-р мед. наук, проф. Т.В. Докукина, канд. хим. наук Г.К. Жавнерко, канд. биол. наук, доц. Н.Н. Капитулец, канд. мед. наук М.В. Махров, И.В. Парибок, О.И. Ничипорук

Минск 2015

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью дифференциации заболеваний прионной этиологии («инфекционные» амилоидозы) от других церебральных амилоидозов (болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, Пика, сосудистая деменция, боковой амиотрофический склероз и др.) путем детекции протеазоустойчивого компонента прион-протеина PrP²⁷⁻³⁰ в клиническом материале с использованием возможностей современного активно разрабатываемого в мире метода атомно-силовой микроскопии (АСМ), чувствительность которого значительно превышает таковую всех рутинных лабораторных тестов.

Реализация данного метода обеспечивает дифференциацию клико-нозологических форм деменций различного генеза согласно критериям МКБ-10, позволяет решать вопрос о госпитализации пациента в соответствующее учреждение здравоохранения, является основанием для внесения изменений в тактику ведения и лечения конкретного пациента.

Инструкция предназначена для следующих врачей-специалистов: врачей-неврологов, врачей-психиатров, врачей лабораторной диагностики, врачей-инфекционистов.

Область применения: неврология, психиатрия, клиническая лабораторная диагностика, инфекционные болезни.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Инструментарий и одноразовая пластиковая посуда для забора аутопсийного и клинического материала, образцов венозной крови (скальпели, пинцеты, ножницы, шприцы с иглами, пробирки, микропробирки, чашки Петри, наконечники и др.).

2. Оборудование для получения гомогенатов органов и фракций мембран компонентов крови: лабораторный бокс с бактериологической лампой, весы лабораторные, гомогенизатор, мешалка магнитная, центрифуга настольная, таймер, термостат суховоздушный, холодильник-морозильник, набор автоматических пипеток переменного объема.

3. Приборная реализация метода АСМ и сопутствующие реактивы: атомно-силовой микроскоп, оборудованный D-сканером, пластины монокристаллического кремния, бычий сывороточный альбумин (БСА), протеиназа К, антиприонные моноклональные антитела и др.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Деменции неустановленного генеза (по МКБ-10) у пациентов с органическими и когнитивными нарушениями психики и умерших с подозрением на прионную инфекцию.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Нет.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Пробоподготовка

Все работы с подозрительным на зараженность биоматериалом должны выполняться в ламинарном боксе 2-го класса биологической защиты, в стерильных условиях с соблюдением всех правил асептики, индивидуально с каждым образцом, приняв все меры предосторожности для исключения возможности контаминации.

Аутопсийные образцы. Образцы мозга (кора больших полушарий, мозжечок, продолговатый мозг) погибших с подозрением на прионную инфекцию получают в асептических условиях. В стерильную фарфоровую ступку помещают 0,5 г образца, растирают пестиком до гомогенного состояния с добавлением 5 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ), рН 7,4, содержащего 1% додецилсульфата натрия. Полученную 10% мозговую суспензию (масса/объем) центрифугируют при 12000 об./мин в течение 15 мин при комнатной температуре. Собирают надосадочную жидкость в стерильный флакон и хранят при -20°C. В качестве отрицательного контроля используют образцы мозга интактных лабораторных животных (сирийские золотистые хомяки), приготовленные, как описано выше.

Примечание — Если образец мозга плохо растирается, добавить стерильный кварцевый песок. Допускается использовать для этих целей электрические гомогенизаторы различных производителей, имеющие необходимые технические характеристики.

Клинический материал. В качестве клинических образцов используют гепаринизированную венозную кровь, спинномозговую жидкость и/или лимфоциты периферической крови (ЛПК). Отрицательным контролем служат ЛПК здоровых доноров, приготовленные аналогичным образом.

Выделение лимфоцитов периферической крови: 5–10 мл крови пациента с гепарином (25 Ед/мл) разводят ФСБ, рН 7,4, в соотношении 1:3, и наслаивают на градиент фикола в соотношении 2:5. Пробу центрифугируют при 1800 об./мин в течение 30 мин при комнатной температуре. Кольцо лимфоцитов на поверхности градиента собирают в пробирку типа «эппендорф», разводят ФСБ, рН 7,4, и центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Осадок промывают ФСБ, рН 7,4, дважды, осторожно удаляя супернатант и замораживают при -20°C.

Получение пула клеток компонентов крови: 5–10 мл крови пациента с гепарином (25 Ед/мл) обрабатывают стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:1 (осмотический шок) и подвергают 6-кратному центрифугированию при 12000 об./мин в течение 15 мин до полного освобождения от разрушенных эритроцитов и обесцвечивания осадка. Результирующий осадок клеточных компонентов крови хранят до использования при -20°C.

Ферментативное переваривание. Полученные аутопсийные (10% мозговые гомогенаты) и клинические (пулы клеток компонентов крови, осадки лимфоцитов из периферической крови) материалы лизируют буфером для гомогенизации (ФСБ, рН 7,4, содержащий 1% додецилсульфат натрия) в объеме 0,5 мл,

обрабатывают буфером для переваривания (ФСБ, pH 7,4, содержащий 1мМ CaCl₂ и протеиназу К — 100 мкг/мл), при конечной концентрации протеиназы К — 5 мкг/проба. Ферментативное переваривание проводят в течение 1 ч при 45°C. Протеиназу К инактивируют добавлением 2 мкл 1 мМ фенилметилсульфонил флюорида (PMSF, Sigma).

В зависимости от задачи исследования лизаты клинического материала могут использоваться без предварительной обработки протеиназой К.

Получение «биочипов»

В соответствии с предложенной методологией на первом этапе выполнения способа готовят специфические «биочипы» путем формирования нанокompозитного сенсорного покрытия на пластинах монокристаллического кремния (кремневые подложки) с заданными иммунореактивными характеристиками.

Для этого кремневые подложки (размером 10×10 мм) предварительно очищают и активируют путем гидрофилизации в смеси H₂O:H₂O₂:NH₄OH (в соотношении 5:1:1) в течение 15 мин при температуре 65–70°C с последующим тщательным отмыванием бидистиллированной водой и высушиванием в токе азота.

Для формирования активных микроструктурированных пленок на поверхности кристаллического кремния используют в качестве «мастера» кремневую калибровочную решетку для атомно-силового микроскопа TGZ3 (высота «ступенек» 540±2 нм, шаг 3 мкм). Реплику (микроштамп) получают, сшивая с помощью катализатора полидиметилсилоксановый олигомер (ПДМС) на «мастере» (рис. 1). Для этого форполимер и катализатор смешивают в массовом соотношении 10:1, смесь деаэрируют с помощью водоструйного насоса в течение 15–20 мин, после чего наносят тонким слоем (~0,5 мкм) на поверхность «мастера». Далее проводят термополимеризацию при температуре 100±5°C в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры микроштамп отделяют от «мастера» (рис. 1).

Для получения «биочипа» в качестве белка-сравнения используют бычий сывороточный альбумин для иммунологических исследований. БСА адсорбируют на поверхность приготовленного микроштампа из водного раствора с концентрацией 1 мг/мл, помещая каплю раствора на поверхность микроштампа на 15 мин. Затем поверхность микроштампа отмывают от избытка адсорбата и высушивают в токе азота.

Адсорбированный на микроштампе БСА переносят на твердую поверхность гидрофильного кремния, приводя микроштамп в соприкосновение с модифицируемой поверхностью на 40–60 с. В результате на поверхности кремния «отпечатываются» полосы БСА. Полученный образец высушивают при комнатной температуре и хранят до использования.

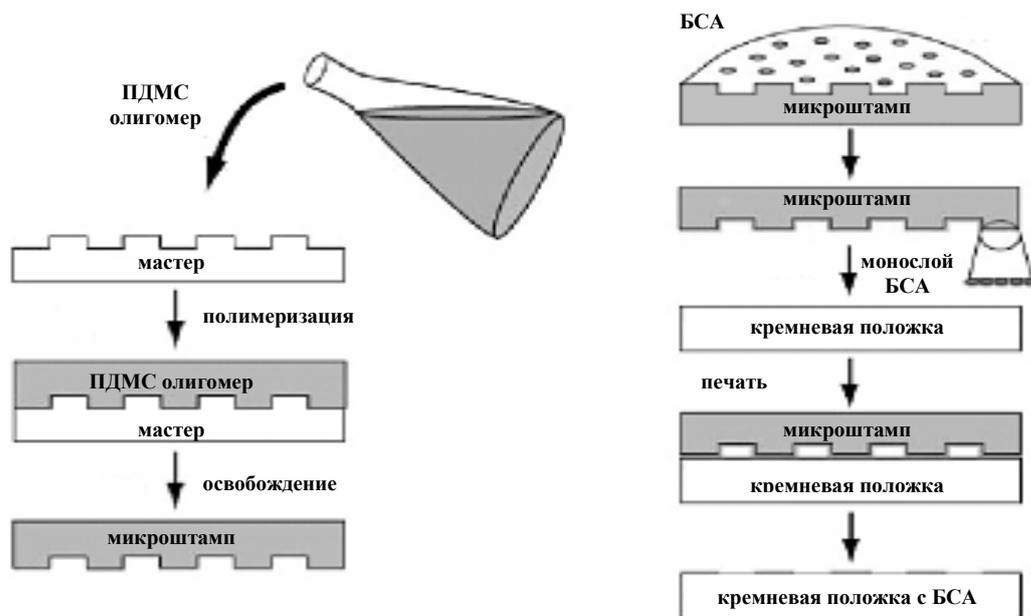


Рисунок 1 — Локальная модификация гидрофильной поверхности кремния методом микроконтактной печати: ПДМС — полидиметилсилоксановый олигомер; БСА — бычий сывороточный альбумин

Контроль иммобилизации БСА на поверхность гидрофильного кремния осуществляют методом АСМ.

Анализ сенсорной поверхности с помощью метода атомно-силовой микроскопии

Работу на атомно-силовом микроскопе проводят в соответствии с инструкцией производителя.

1. Образец микроструктурированной поверхности кремния прямоугольной формы, не превышающий 14×14 мм², закрепляют на специальном столике микроскопа «Nanoscope IIIa» с помощью двухстороннего скотча на металлической шайбе.

2. Металлическую шайбу с образцом помещают на поверхность пьезокерамического сканера.

3. В специальном держателе фиксируют кантилевер с иглой, константа упругости которой не должна превышать 0.5 Н/м, чтобы не деформировать пленку на поверхности образца.

4. Держатель с иглой закрепляют над образцом, при этом внимание обращают на то, чтобы между кантилеваром и образцом оставался зазор, обеспечивающий защиту от механического повреждения иглы микроскопа.

5. Перемещают лазерный луч с помощью микровинтов, расположенных над столиком так, чтобы он находился на кончике кантилевера, при этом отраженный луч с помощью зеркала направляют на четырехсекционный фотодиод.

6. Выбирают основной режим сканирования – контактный режим. В этом случае фотодиод перемещают так, чтобы разница между верхним и нижним сегментами фотодиода была равна 2 В, а разница между боковыми сегментами

равнялась нулю. В результате этих операций прибор считается отъюстированным и далее все манипуляции осуществляются с помощью программного обеспечения.

7. В программе в параметрах сканирования выбирают окно сканирования, не превышающее 1 мкм, интегральное и пропорциональное звенья выставляют равными 1, чтобы предотвратить возможную автовибрацию при контакте зонда (иглы) микроскопа с поверхностью, а отклонение изгиба иглы (Deflection setpoint) — равное нулю.

8. Следующий шаг — осуществляют автоматический подвод иглы к поверхности, при этом сканирование начинается автоматически при контакте иглы с поверхностью. В этот момент значение Deflection setpoint уменьшается до минимально возможного, но контакт иглы с поверхностью сохраняется.

9. Далее увеличивают значения интегрального и пропорционального звеньев для оптимизации обратной связи, отслеживающей изменение изгиба иглы при сканировании.

10. Выбирают направление сканирования, перпендикулярное быстрой оси перемещения иглы для записи изображения в режиме фазового контраста. При этом последовательно записываются окна сканирования 5, 10 и 20 мкм²: как на изображении высоты, так и на изображении трения должны быть видны полосы микроструктурированной поверхности в направлении, параллельном медленной оси сканирования.

11. При необходимости (когда полосы перпендикулярны оси сканирования), образец поворачивают на 90°.

12. Если на изображении полосы от микроконтактной печати отсутствуют, выбирают другой участок сканирования.

13. Полученные АСМ-изображения дальше анализируют с помощью программного обеспечения, при этом измеряется высота и ширина полос, а также шероховатость образца (рис. 2).

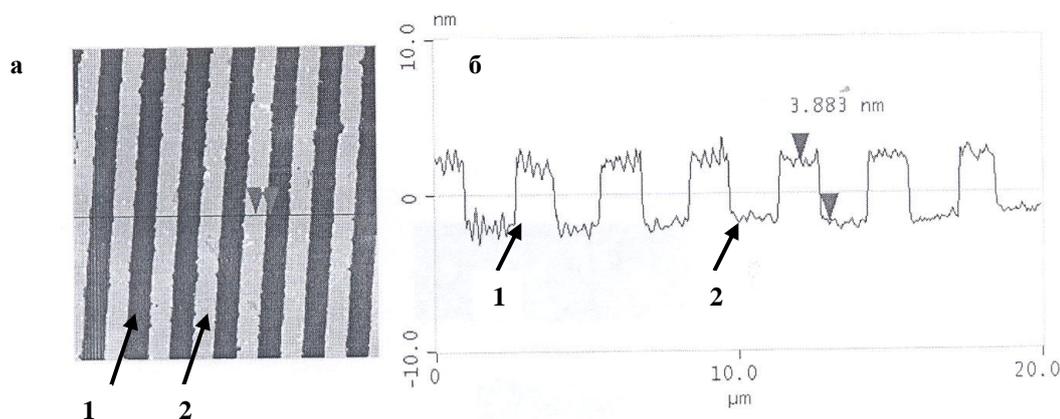


Рисунок 2 — Образец с микроконтактной печатью («биочип»): 1 — полосы БСА; 2 — активированная поверхность кремния: а — АСМ в контактном режиме; б — графический микропрофиль поверхности

В приготовленном «биочипе» локально-активированная альбумином кремневая поверхность имеет вид чередующихся широких полос БСА (ширина

полос $1,9 \pm 0,2$ мкм) и узких полос (ширина полос $1,1 \pm 0,2$ мкм), обладающих высокой гидрофильной активностью.

Полосы БСА четко отличаются от немодифицированных участков подложки, служащих поверхностью сравнения. Перепад высот у БСА в зависимости от препарата колеблется в пределах от 1,6 до 4,1 нм (в среднем $2,9 \pm 1,2$ нм). БСА блокирует неспецифическую адсорбцию на модифицированной поверхности, что обеспечивает эффективную иммобилизацию искомым биомолекул в промежутки между полосами БСА.

Примечание — АСМ-изображение поверхности «биочипов» получают на воздухе с помощью атомно-силового микроскопа, оборудованного «D-сканером» в контактном режиме (*contact mode*) или в режиме прерывистого контакта (*tapping mode*). Используют контактные 100- и 200-мкм кантилеверы из Si_3N_4 с константой упругости 0,12 и 0,36 N/m и тейпинговые иглы из кремния с резонансной частотой ~ 315 кГц. Сила воздействия иглы на образец в контактном режиме составляет единицы нН. Частота строчной развертки при получении изображения варьирует от 1 до 5 Гц.

Выявление протеазоустойчивого компонента PrP27-30 прионного белка в аутопсийном материале

Решение задачи достигается тем, что для детектирования компонента PrP27-30 патогенного прионного белка в биологическом образце на поверхности «биочипа» создаются регулярно чередующиеся полосы двух различных белков, один из которых (БСА) блокирует адсорбцию любых белков из биологической пробы, а второй (антиприонное моноклональное антитело) обеспечивает специфическое связывание компонента PrP27-30 патогенного прионного белка за счет взаимодействия типа «антиген-антитело». При наличии PrP27-30 в биологической пробе высота белковых полос изменяется (относительно контрольных полос БСА), а результат регистрируется методом АСМ (заявка на патент № а20110013 от 04.01.2011).

Алгоритм обнаружения компонента PrP27-30 патогенного прионного белка в аутопсийном образце мозга показан на рис. 3.

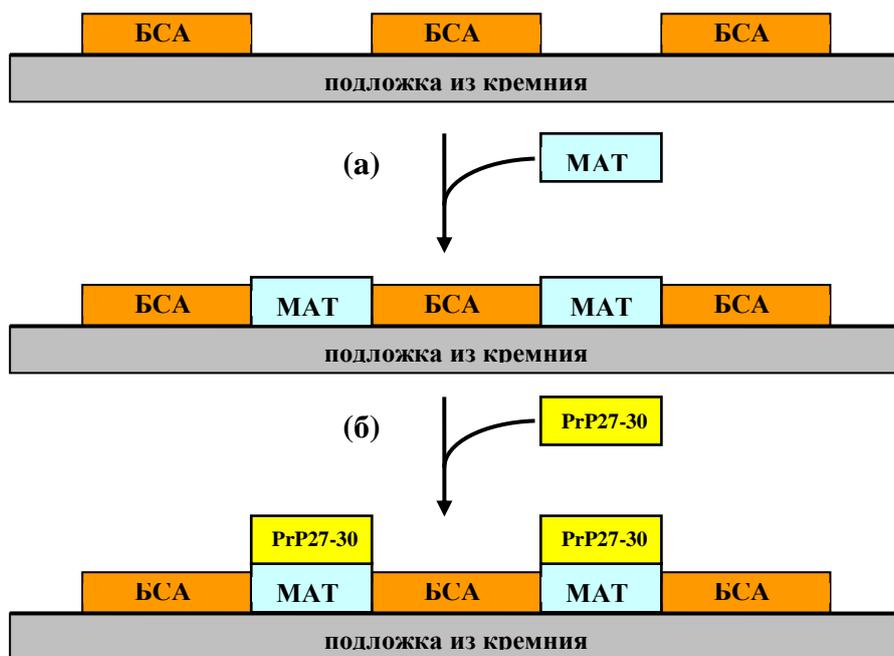


Рисунок 3 — Алгоритм управляемой фиксации протеазоустойчивого компонента PrP27-30 на локально-активированной поверхности кремния: БСА — бычий сывороточный альбумин; МАТ — моноклональное антитело: а — иммобилизация анти-PrP моноклонального антитела; б — иммунологическое взаимодействие типа «антиген-антитело»

Методика постановки

1. На подготовленную локально-активированную БСА кремневую подложку («биочип») автоматической пипеткой накладывают 50 мкл анти-PrP МАТ, например, 3F4 (Sigma) в рабочем разведении 1:5000. Подложку помещают во влажную камеру (чашка Петри с помещенной на дно смоченной фильтровальной бумагой) и обрабатывают в течение 30 мин в термостате при 37°C. БСА блокирует неспецифическую адсорбцию МАТ на модифицированную поверхность кремния и обеспечивает их эффективную иммобилизацию в промежутки между полосами БСА.

2. Подложку тщательно отмывают ФСБ, рН 7,4, содержащим 0,5% твин-20 (2 раза по 1 мл), затем дистиллированной водой (5 раз по 1 мл), струйно, с использованием автоматической пипетки и высушивают на воздухе в течение 20 мин.

3. Затем на поверхность «биочипа» помещают 50 мкл приготовленного 10% гомогената мозга погибшего пациента после ферментативного переваривания протеиназой К. Подложку инкубируют в течение 30 мин во влажной камере в термостате при 37°C.

4. Далее проводят отмывание поверхности «биочипа», как описано выше, и анализируют.

Учет и оценка результатов

АСМ-анализ образованных макромолекулярных комплексов «антиген-антитело» на поверхности кремния проводят на воздухе в контактном режиме и режиме прерывистого контакта, как описано выше (рис. 4).

При анализе АСМ-изображений, полученных после иммобилизации МАТ на поверхность гидрофильного кремния, уровень полос иммобилизованных МАТ был лишь незначительно выше/ниже уровня полос БСА (~0,1 нм). После иммунологического взаимодействия МАТ с PrP27-30 наблюдаются узкие полосы белковых комплексов, превышающие уровень полос БСА в среднем на $1,8 \pm 0,2$ нм (рис. 4). Высота комплекса «МАТ+PrP27-30» составляет в среднем $3,4 \pm 0,4$ нм.

PrP27-30 эффективно адсорбируется на полосы МАТ как из исходного гомогената, так и из растворов после их обработки ферментазой (протеиназой К). О наличии возбудителя судят по увеличению высоты полос с антителами по крайней мере на 2 нм и более.

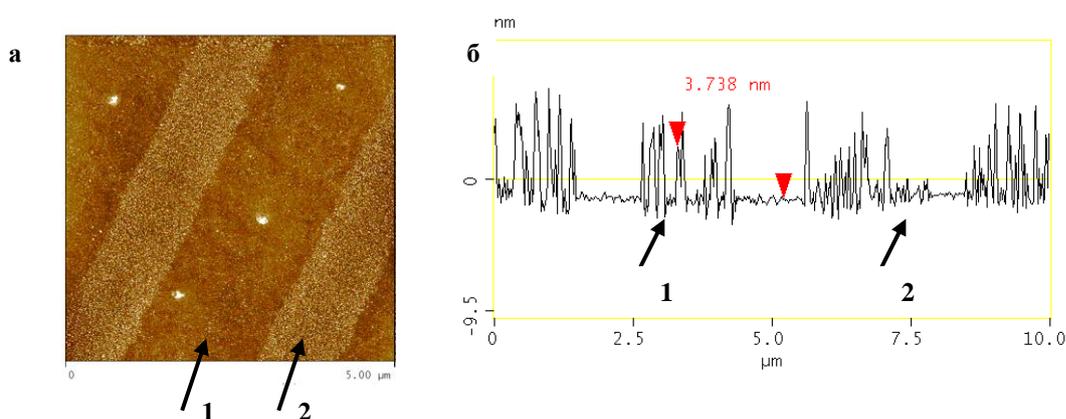


Рисунок 4 — Выявление специфического иммунокомплекса прион-протеина PrP27-30 с антиприонными моноклональными антителами 3F4 (узкие полосы) методом АСМ на локально-активированной микроконтактной печати БСА поверхности кремния (широкие полосы): 1 — полосы БСА; 2 — топография иммунокомплекса 3F4+PrP27-30: а — АСМ в контактном режиме; б — графический микропрофиль

Примечание — Факт выявления только малых агрегатов PrP, специфически связывающихся с МАТ, свидетельствует о том, что иммунологическое взаимодействие эффективно осуществляется только когда PrP27-30 находится в состоянии, близком к мономерному, и его вторичная и третичная структуры обеспечивают расположение активных антиген-связывающих сайтов на поверхности глобулы, разрешающее иммунологическое связывание со специфическим антителом.

Выявление протеазоустойчивого компонента PrP27-30 прионного белка в клиническом материале

С целью повышения точности способа и возможности его применения для прижизненного обнаружения протеазоустойчивого компонента PrP27-30 патологического прионного белка в клиническом материале пациента с дегенеративным поражением мозга неустановленной этиологии, в т. ч. при церебральных амилоидозах и деменциях неясного генеза, используется

модификация способа, заключающаяся в первоначальной иммобилизации анализируемого образца, предположительно содержащего патологический прионный белок на приготовленный «биочип» (участки поверхности гидрофильного кремния, активированного микроконтактной печатью БСА). Затем проводится поэтапная ферментативная обработка протеиназой К, обработка специфическими антиприонными моноклональными антителами и детектирование созданного иммунокомплекса «антиген–антитело» методом АСМ, что позволяет доказать наличие патологического прионного белка в анализируемом образце (заявка на патент № а20121529 от 02.11.2012).

Алгоритм обнаружения компонента PrP²⁷⁻³⁰ патогенного прионного белка в анализируемом образце показан на рис. 5.

Методика постановки

1. Образцы клинического материала (лимфоциты периферической крови, пул клеток компонентов крови) обрабатывают 0,5 мл буфера для гомогенизации (ФСБ, рН 7,4, содержащий 1% додецилсульфат натрия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Осадки перемешивают с использованием вортекса.

2. На подготовленную локально-активированную БСА кремневую подложку («биочип») автоматической пипеткой наслаивают 50 мкл лизата. Подложку помещают в чашку Петри с находящейся на дне смоченной фильтровальной бумагой (влажная камера) и обрабатывают в течение 30 мин при 37°C.

3. Подложку тщательно отмывают ФСБ, рН 7,4, содержащим 0,5% твин-20 (2 раза по 1 мл), затем дистиллированной водой (5 раз по 1 мл), струйно, с использованием автоматической пипетки и высушивают на воздухе в течение 20 мин.

4. Затем на поверхность кремневой подложки помещают 50 мкл буфера для переваривания (ФСБ, рН 7,4, содержащий 1 мМ CaCl₂ и 5 мкг/проба протеиназы К). Подложку инкубируют в течение 30 мин во влажной камере при 37°C.

5. Поверхность кремния отмывают и высушивают, как описано выше.

6. Далее на подложку наслаивают 50 мкл анти-PrP МАТ, например, 3F4 (Sigma) в рабочем разведении 1:5000 и инкубируют во влажной камере 30 мин при 37°C.

7. Поверхность кремния отмывают, высушивают и анализируют.

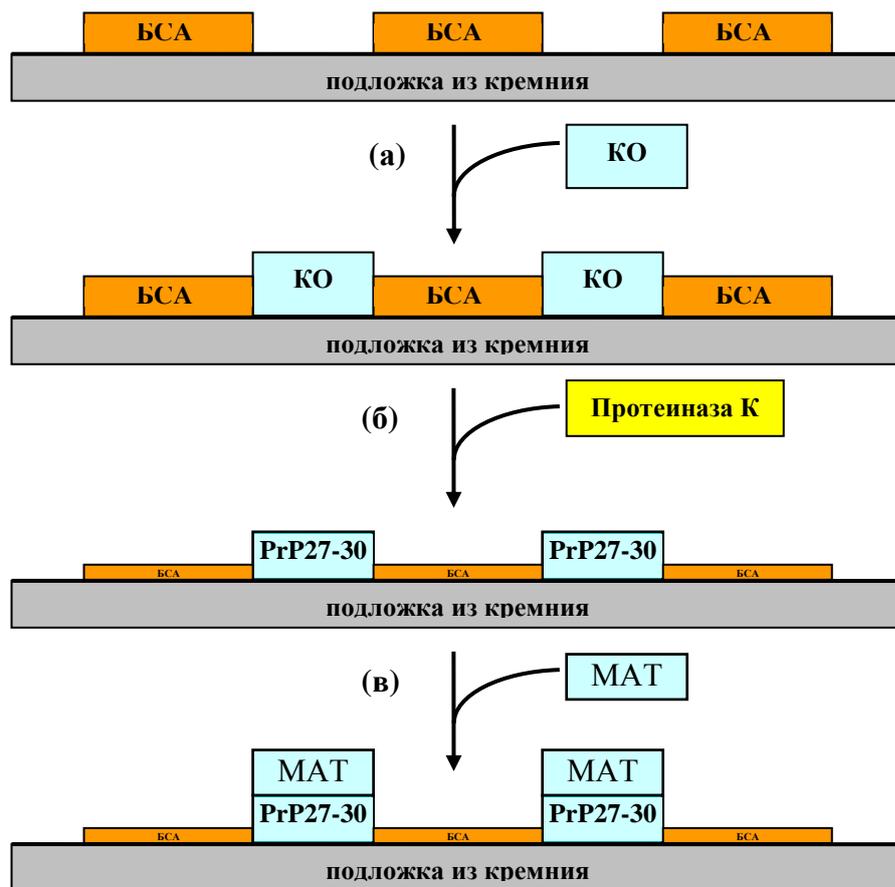


Рисунок 5 — Алгоритм прижизненного выявления протеазоустойчивого компонента PrP27-30 при церебральных амилоидозах: БСА — бычий сывороточный альбумин; КО — клинический образец, содержащий протеазоустойчивый компонент PrP27-30; МАТ — анти-PrP моноклональное антитело: а — иммобилизация анализируемой пробы, содержащей PrP^d; б — ферментативная обработка протеиназой К; в — иммунологическое взаимодействие типа «антиген-антитело»

Учет и оценка результатов

АСМ-анализ кремневой подложки проводят на воздухе в контактном режиме и режиме прерывистого контакта, как описано выше.

Согласно предложенной методологии иммобилизация PrP^d из образца осуществляется в промежутки между полосами БСА с последующим ферментативным перевариванием всех протеазочувствительных белков, представленных на кремниевой подложке. При этом протеолитическая обработка удаляет только N-концевую область прионного белка PrP^d с образованием протеазоустойчивого компонента 27-30 кДа (рис. 6).

При анализе АСМ-изображений, полученных после иммобилизации искомого клинического материала на «биочип» и ферментативной обработки поверхности кремния, видно, что в анализируемом образце, содержащем прион-протеин, уровень полос иммобилизованных белков лишь незначительно выше

уровня полос деградированного протеолизом БСА (≤ 2 нм). После ферментативной обработки образцов, не содержащих прион-протеин, поверхность кремния остается практически ровной, без четко наблюдаемого перепада высот.

После иммунологического взаимодействия протеазоустойчивого компонента PrP²⁷⁻³⁰ со специфическими антиприонными МАТ (3F4, разведение 1:5000), нанесенными на кремневую подложку, на АСМ-изображениях отмечается повышение уровня высот соответствующих полос вследствие образования иммунокомплексов «антиген-антитело».

На рис. 7 показаны результаты данного эксперимента.

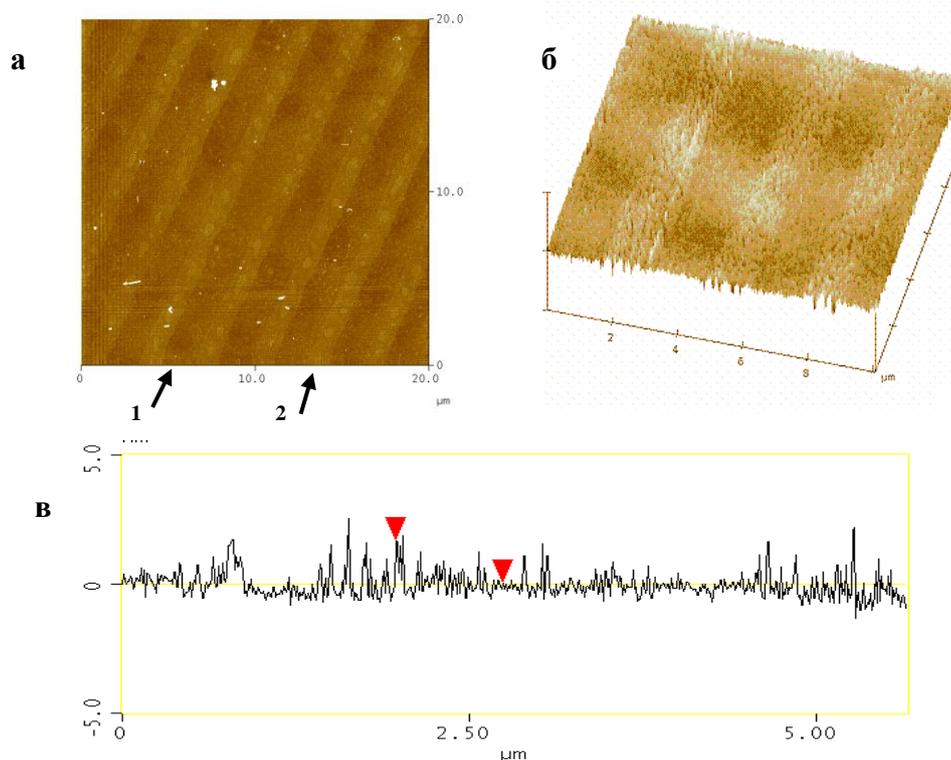


Рисунок 6 — АСМ-изображение пространственных форм положительного прионного образца на локально-активированной подложке кремния после иммобилизации PrP^d и этапа ферментативной обработки: 1 — БАС, деградированный протеолизом; 2 — протеазоустойчивый компонент PrP²⁷⁻³⁰: а — АСМ в контактном режиме; б — трехмерное изображение; в — графический микропрофиль

Отмечаются четко выраженные полосы белковых иммунокомплексов, превышающие уровень полос деградированного протеолизом БСА. Высоты иммунных комплексов PrP²⁷⁻³⁰+анти-PrP МАТ в положительных образцах могут варьировать в широких пределах от 8,6 до 38,7 нм (в среднем на 11 ± 5 нм), что определяется особенностями анализируемых образцов, из которых ведущими являются: 1) биохимические свойства самих прион-протеинов; 2) их концентрация в образце, находящаяся в прямой зависимости от сроков болезни; 3) пространственная локализация на подложке.

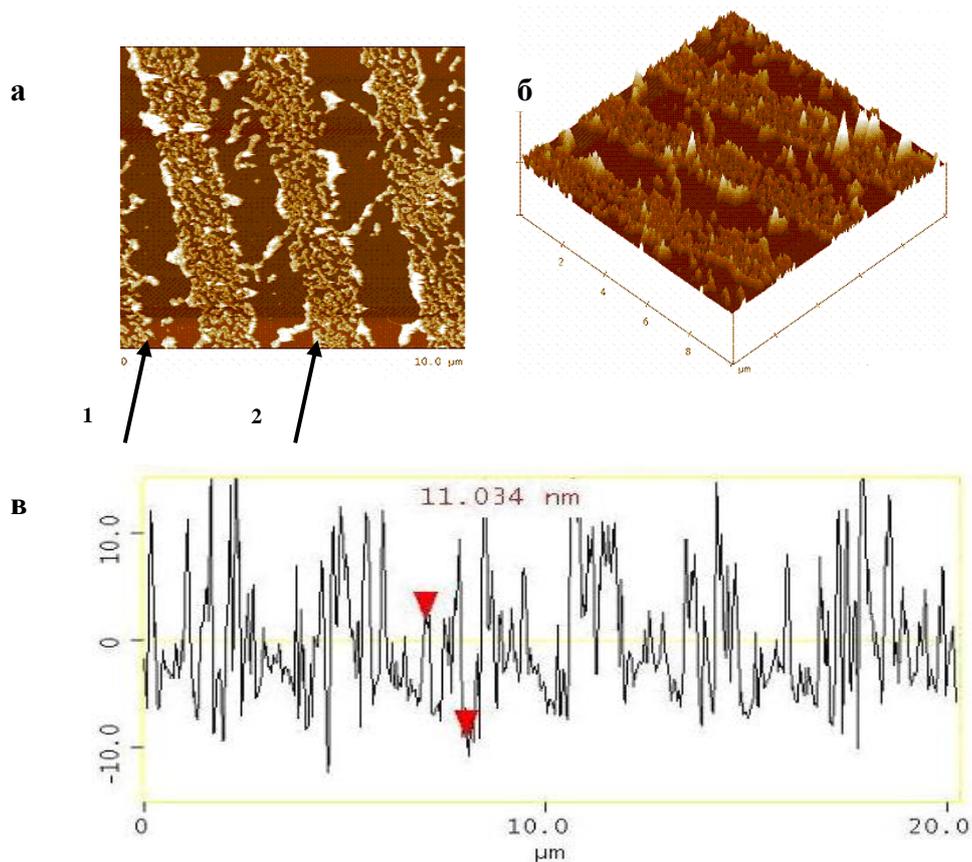


Рисунок 7 — АСМ-изображение пространственных форм положительного прионного образца на локально-активированной подложке кремния после иммобилизации PrP^d, ферментативной обработки и этапа обработки анти-PrP моноклональными антителами: 1 — БАС, деградированный протеолизом; 2 — иммунный комплекс PrP27-30+анти-PrP МАТ: а — АСМ в контактном режиме; б — трехмерное изображение; в — графический микропрофиль

В случае выявления даже низких концентраций PrP27-30 в клинических образцах венозной крови у пациентов с деменциями неустановленного генеза ставится диагноз прионной болезни. У здоровых лиц образования специфических иммунокомплексов PrP27-30+анти-PrP МАТ нет.

Примечания:

1. Количество наблюдаемых иммунокомплексов у пациентов с прионными болезнями увеличивается обратно пропорционально кратности разведения анализируемого образца.

2. Допускается использование при постановке анализа анти-PrP МАТ других производителей. Применение нескольких МАТ, имеющих сродство к различным эпитопам прион-протеина, и их комбинации позволяет существенно повысить чувствительность способа за счет увеличения уровней высот образовавшихся иммунокомплексов.

3. При этом иммобилизации анти-PrP МАТ на полосы деградированного БСА не происходит.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении способа не зарегистрировано.

Для обеспечения достоверности результатов образцы следует исследовать в 4-кратной повторности.

Ошибки при оценке результатов детекции протеазоустойчивого компонента прион-протеина PrP27-30 методом АСМ могут обусловлены:

- нарушениями технологии на этапе приготовления анализируемых образцов (пробоподготовка), что приводит к получению ложноотрицательных результатов;

- сверхнизкой концентрацией прион-протеина в анализируемом образце, обусловленной ранними сроками заболевания. Использование для этих целей данного способа может не позволить детектировать наличие протеазоустойчивого компонента PrP27-30 у части пациентов;

- использованием реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся.

Для исключения подобных ошибок необходимо учитывать соответствие результатов клинико-anamnestических и лабораторных исследований, проведенных с интервалом 3–6 мес., строго соблюдать все методические требования.