



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **115888**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/48** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 12664**

(22) Дата подання заявки: **12.12.2016**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.04.2017**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.04.2017, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):

**Галат Марина Владиславівна (UA),  
Шаванова Катерина Євгенівна (UA),  
Шпирка Неля Федорівна (UA),  
Шпильовий Павло Борисович (UA),  
Лебедєва Тетяна Станіславівна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ,  
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41, 03041  
(UA)**

## (54) СПОСІБ ІМУНОДІАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМОЗУ ТВАРИН НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

(57) Реферат:

Спосіб імунодіагностики токсоплазмозу тварин на основі поверхневого плазмонного резонансу включає визначення у сироватці крові тварин наявності антитіл до збудника токсоплазмозу. Визначення включає послідовне нанесення на поверхню трансдюсера: поліаліламіну гідрохлориду, розчину білка А, токсоплазменного антигену, бичачого сироваткового альбуміну і позитивної та негативної досліджуваних сироваток крові, після кожного етапу проводиться промивання фізіологічним розчином, оцінку результатів реакції проводять за зміною кута відбиття на сенсорограмі за умови попередньої обробки поверхні трансдюсера, загальний час аналізу становить 30-40 хвилин.

**UA 115888 U**



Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини та біотехнології і може бути використана для захиттєвої діагностики токсоплазмозу.

Відомий аналог (Інструкція з застосування набору реагентів для імуноферментного виявлення сумарних антитіл до *Toxoplasma gondii* у сироватці (плазмі) крові (ВектоТоксо-антитіла); Klun I., Djurković-Djaković O., Thulliez P. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally exposed sheep /Zoonoses Public Health, 2007. - № 54 (3-4). - С. 165-168; Галат М.В. Сучасні методи діагностики токсоплазмозу котів /М.В. Галат //Тваринництво України, 2015. - № 1-2. - С. 27-30. [http://nbuv.gov.ua/j-pdf/TvUkr\\_2015\\_1-2\\_9.pdf](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/TvUkr_2015_1-2_9.pdf)), на планшет з іммобілізованим антигеном вносять контрольні зразки (позитивний, слабо позитивний і негативний), а також досліджувані сироватки (по 100 мкл). Лунки планшету закривають та інкубують 30 хвилин при 37 °С.

Після закінчення інкубації за допомогою спеціального пристрою промивають лунки планшету 5 разів буферним розчином (ФСБ-Т одноразовий розводили з дистильованою водою у співвідношенні 1:25). При цьому чергують аспірацію і негайне заповнення лунок кожного стрипу. В кожну лунку вносять не менше 400 мкл рідини у процесі кожного циклу промивання. Час між заповненням і випорожненням лунок триває не менше 30 секунд. Повного випорожнення лунок досягають після кожного їх заповнення. По закінченні промивання залишки вологи із лунок ретельно видаляють. З цією метою перевернутим планшетом постукують по фільтрувальному паперу. На наступному етапі вносять в усі лунки по 100 мкл кон'югату та інкубують 30 хвилин при 37 °С. Після закінчення інкубації лунки промивають 5 разів, як описано вище і вносять у кожну лунку по 100 мкл розчину ТМБ (тетраметилбензидин). Витримують у темному місці упродовж 25 хвилин при 18-25 °С, а потім результати реєструють за допомогою спектрофотометра.

Недоліками аналога є те, що він потребує дорогих реагентів, обладнання (вошер, імуноферментний аналізатор), послуг висококваліфікованого персоналу, а також не менше 2 годин для здійснення аналізу в умовах добре обладнаної лабораторії.

Задачею корисної моделі є розробка нового способу діагностики токсоплазмозу тварин з використанням імунного біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб імунодіагностики токсоплазмозу тварин на основі поверхневого плазмонного резонансу, який включає визначення у сироватці крові тварин наявності антитіл до збудника токсоплазмозу згідно з пропонуваним рішенням визначення включає послідовне нанесення на поверхню трансдюсера: поліаліламіну гідрохлориду (ПААГ), розчину білка А, токсоплазменного антигену, бичачого сироваткового альбуміну і позитивної та негативної досліджуваних сироваток крові, після кожного етапу проводиться промивання фізіологічним розчином, оцінку результатів реакції проводять за зміною кута відбиття на сенсорограмі за умови попередньої обробки поверхні трансдюсера, загальний час аналізу становить 30-40 хвилин.

Приклад здійснення способу

Чутливий шар біосенсора формується на скляній пластинці, поверхня якої покрита 1-2 нм адгезійного шару ніобію та 50 нм плівкою золота, на якій відбувається виникнення поверхневого плазмонного резонансу. З призмою пластинка поєднується і фіксується за допомогою імерсійної рідини. Це дає змогу легко змінити використану на нову, що значно скорочує час проведення аналізу.

Спочатку у вимірювальну комірку вносили ФР для отримання базової лінії. Поліелектролітна плівка на золотій поверхні трансдюсера формувалась з використанням розчину поліаліламіну гідрохлориду (ПААГ). Поліелектроліт використовували у концентрації 20 мкг/мл. Потім на поверхню, вкрити плівкою поліелектроліту, наносили розчин білку А з концентрацією 20 мкг/мл. Після цього здійснювали адсорбцію розчину антигену (Ag) *Toxoplasma gondii* протягом 15 хв. за температури 25 °С. Наступним етапом було проведено нанесення розчину бичачого сироваткового альбуміну (БСА) у концентрації 20 мкг/мл. Обробка поверхні 1 % розчином БСА після іммобілізації антитіл не внесла суттєвих змін у значення резонансного кута, що реєструється. Це означає, що на поверхні практично не залишались вільні місця зв'язування, а концентрація антитіл була достатньою для створення максимально щільного шару.

Наступним етапом експерименту було нанесення розчинів антитіл (Ab) негативної та позитивної сироватки до *Toxoplasma gondii* на попередньо підготовлену поверхню перетворювача.

На кожному етапі здійснювали промивання комірки ФР. Швидкість осідання реагентів на поверхні трансдюсера відслідковували по зміні кута відбиття на сенсорограмі приладу. Час експозиції кожного розчину становив до 15 хвилин за температури 25 °С, оскільки надалі зміна кута відбиття не спостерігалася. Це свідчить про закріплення біологічного шару на поверхні

перетворювача. При введенні у вимірювальну комірку сироватки крові тварини, що позитивно реагувала на наявність збудника токсоплазмозу величина відгуку біосенсора суттєво збільшувалася у порівнянні з негативною сироваткою.

5 Загальний час проведення аналізу за попередньої модифікації поверхні трансдюсера становить близько 30-40 хв.

Короткий час проведення аналізу за умови попередньої підготовки поверхні перетворювача, а також використання підготовлених для аналізу колекцій сироваток крові різних видів тварин дозволяє здійснювати діагностику хвороби у польових умовах.

10 Технічне рішення способу імунодіагностики токсоплазмозу тварин на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу дає можливість використовувати його з метою вчасної діагностики даної хвороби серед різних видів тварин.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Спосіб імунодіагностики токсоплазмозу тварин на основі поверхневого плазмонного резонансу, який включає визначення у сироватці крові тварин наявності антитіл до збудника токсоплазмозу, який **відрізняється** тим, що визначення включає послідовне нанесення на поверхню трансдюсера: поліаліламіну гідрохлориду, розчину білка А, токсоплазменного антигену, бичачого сироваткового альбуміну і позитивної та негативної досліджуваних

20 сироваток крові, після кожного етапу проводиться промивання фізіологічним розчином, оцінку результатів реакції проводять за зміною кута відбиття на сенсорограмі за умови попередньої обробки поверхні трансдюсера, загальний час аналізу становить 30-40 хвилин.

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601