



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **106886**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 39/104 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 11146**

(22) Дата подання заявки: **13.11.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.05.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.05.2016, Бюл.№ 9**

(72) Винахідник(и):

**Новгородова Олександра Юріївна (UA),
Стародуб Микола Федорович (UA),
Ушкалов Валерій Олександрович (UA)**

(73) Власник(и):

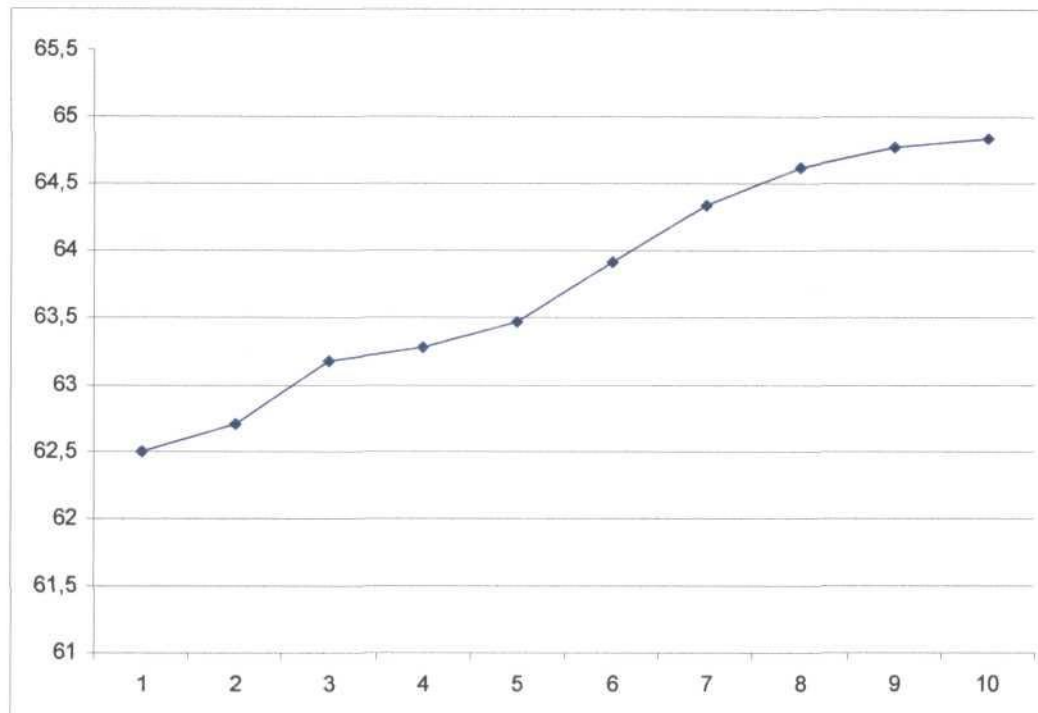
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41, 03041
(UA)**

(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ВИЗНАЧЕННЯ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

(57) Реферат:

Спосіб експрес-оцінки *Pseudomonas aeruginosa* передбачає вивчення активності ОН- і Н-антигенів *Ps. aeruginosa* в процесі імунізації тварин-донорів за допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції та реакції аглютинації з подальшим отриманням видоспецифічних сироваток, причому визначення *Ps. aeruginosa* здійснюють за допомогою аналітичного приладу - імунобіосенсора, на підготовлену поверхню трансдюцера наносять розчин антитіл і після промивки фізрозчином наносять розчин антигену відповідної концентрації, від 10 кл. в 1 мл, результат інтерпретують згідно з графіком на екрані.

UA 106886 U



Корисна модель належить до ветеринарної медицини та може бути використана для діагностики *Pseudomonas aeruginosa* у сільськогосподарських тварин.

Відомий аналог (Виготовлення діагностикуму для імунофлуоресцентної індикації та ідентифікації *Pseudomonas aeruginosa*: Методичні рекомендації для спеціалістів ветеринарної медицини, науковців та студентів / О.П. Бойко, Р.О. Кучерявенко, І.К. Бойко, В.О. Бусол, М.С. Мандигра. - Київ: НУБіП, 2010. - 20 с), передбачає використання методу флуоресціюючих антитіл (МФА) в лабораторній практиці, який дає можливість виявляти тест-мікроб у змішаній культурі при концентрації від 100 мікробних клітин в 1 мл. Суть аналога полягає у візуалізації антигену специфічними антитілами з флуоресцентними маркерами. В основі цього аналогу є виготовлення видоспецифічних високоактивних імунофлуоресцентних імуноглобулінів проти *Ps. aeruginosa*, який передбачає у процесі виконання чотири послідовні етапи: на першому етапі вивчають активність ОН- і О-антигенів *Ps. aeruginosa* в процесі імунізації тварин-донорів з допомогою реакції непрямой імунофлуоресценції (РШФ) та реакції аглютинації (РА). Другий етап передбачає отримання видоспецифічних сироваток проти *Ps. aeruginosa*. Третій - виготовлення мічених флуоресцеїну ізотіоціанатом (ФІТЦ) імуноглобулінів проти *Ps. aeruginosa*; четвертий застосування МФА в ході бактеріологічного дослідження на псевдомоназ тварин і птиці.

Недоліками аналога є те, що він потребує дорогих реактивів, послуг висококваліфікованого персоналу, а також не менше 2 годин для здійснення аналізу, причому в умовах добре обладнаної лабораторії.

Задачею корисної моделі є розробка способу на основі використання відомого явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР), який застосований в плані визначення антигенів та антитіл, який дозволяє безпосередньо реєструвати факт взаємодії антиген-антитіло в режимі реального часу.

Поставлена задача досягається тим, що спосіб експрес-оцінки *Pseudomonas aeruginosa* передбачає вивчення активності ОН- і Н-антигенів *Ps. aeruginosa* в процесі імунізації тварин-донорів за допомогою реакції непрямой імунофлуоресценції та реакції аглютинації з подальшим отриманням видоспецифічних сироваток, згідно з пропонованим рішенням визначення *Ps. aeruginosa* здійснюють за допомогою аналітичного приладу - імунобіосенсора, на підготовлену поверхню трансдюцера наносять розчин антитіл і після промивки фізіологічним розчином наносять розчин антигену відповідної концентрації, від 10 кл в 1 мл, результат інтерпретують згідно графіку на екрані.

Приклад здійснення способу.

При падінні плоскополяризованого лазерного променя на поверхню золота, при визначеному (критичному) куті, виникає явище поверхневого плазмонного резонансу, яке з'являється у виникненні осциляції щільності зарядів на межі між двома середовищами з діалектичними металом та діелектриком. Частина енергії променя витрачається на осциляцію і тому інтенсивність віддзеркаленого променя, при визначеному (критичному) куті, зменшується, а кут віддзеркалення є сталою характеристикою конкретного стану трансдюцера. При іммобілізації антигену (антитіла) на поверхню золота критичний кут, при якому виникає ППР змінюється, і величина зсуву кута знаходиться в прямій залежності від концентрації реагенту, який визначається. Зазвичай чутливість визначення ряду біологічних аналітів (окремих мікотоксинів, білків і т.д.) становить на рівні 5 нг/мл.

В даній розробці був використаний варіант ППР, де, як трансдюцер (сенсорний чип) використовується тонка плівка золота (20 нм), що наносилась на скляну пластинку, шляхом напилення у вакуумі. Цей сенсорний чип дозволяє, з великою чутливістю, виявляти речовини, при реєстрації імунореактивної взаємодії та явища поверхневого плазмонного резонансу.

При перевищенні критичного кута плоскополяризованого променя світла, при найвищому значенні коефіцієнта заломлення, відбувається повне внутрішнє віддзеркалення. В цих умовах, в поверхневих плазмонних поляритонах, спостерігають, обумовлений перекачкою енергії випромінювання, резонансний мінімум залежності інтенсивності віддзеркалення випромінювання від кута падіння лазерного променя на плівку золота. Взаємодія антигену (штам *Ps. aeruginosa* ATCC 9027) із специфічними до цього білка антитілами (отриманими внаслідок імунізації кролів), реєструється по зміні кута віддзеркалення по типу, зазначеної вище, залежності, що обумовлює можливість моніторингу процесу зв'язування антигену з антитілом і врешті решт обумовлювати високу чутливість при визначенні рівня антигену, а значить і можливість ранньої та статистично достовірної діагностики *Ps. aeruginosa*.

Аналіз здійснюється наступним чином. Поверхня трансдюцера попередньо обробляється розчином поліаліламіну гідрохлоридом (20 нг/мл), далі на ній іммобілізується білок А з *Staphylococcus aureus* при концентрації 20 нг/мл в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) рН 7,4, 140мМ NaCl, потім після промивки тим же буфером поверхня обробляється розчином,

що містить специфічні антитіла, попередньо розведені в ЗФР. На наступній стадії після промивки трансдюцера ЗФР на його поверхні іммобілізують бичачий сироватковий альбумін (БСА) і її знову промивають за допомогою ЗФР. Тривалість кожної з чотирьох стадій попередньої обробки трансдюцерної поверхні в межах 10-15 хвилин при кімнатній температурі.

- 5 По закінченні попередньої обробки трансдюцерної поверхні реєструють величину резонансного кута в присутності ЗФР. Після цього комірку, де знаходиться трансдюцерна поверхня, наповнюють досліджуваним розчином, що містить бактеріальні клітини, та фіксують величину резонансного кута. При утворенні на поверхні трансдюцера імунних комплексів спостерігається зсув резонансного кута. Зміна величини кута залежить від кількості імунних комплексів, утворених на трансдюцерній поверхні.

Попередньо підготовлені трансдюцерні поверхні можуть зберігатись (в підсушеному на повітрі при кімнатній температурі виді) до 10 днів в холодильнику. Такі поверхні можуть бути використані при необхідності визнання наявності клітин *Ps. aeruginosa* та їх концентрації. В такому разі спочатку реєстрували резонансний кут при введенні у вимірювальну комірку (об'ємом 10 мкл) ЗФР. Потім у неї вводили розчин, що містив пробу з клітинами патогену, витримували його там 10-15 хв. при кімнатній температурі, комірку промивали ЗФР та реєстрували зсув резонансного кута. Для побудови калібрувальної кривої використовували послідовне розведення популяції *Ps. aeruginosa* з забезпеченням в розчині від 10^4 до 10^5 клітин в мл.

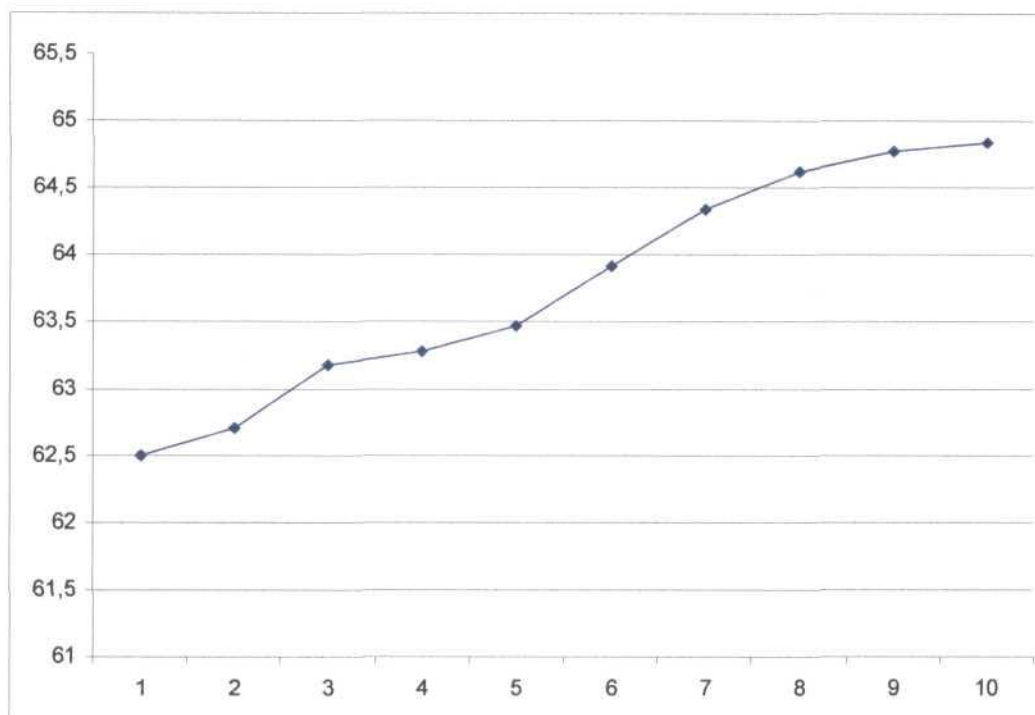
- 20 Результати тестування різних концентрацій *Ps. aeruginosa* представлені на графіку (граф.).

Спосіб дозволяє виявляти в межах 10 клітин в 1 мл, причому їх концентрація в межах 100 клітин в 1 мл може бути виявлена з великою статистичною достовірністю. Калібрувальна крива дозволяє визначати *Ps. aeruginosa* в межах 10^1 - 10^6 клітин в 1 мл. Причому чутливість даного імунного аналізу, як і іншого імунного типу, може бути суттєво підвищена при використанні високоафінних специфічних моноклональних антитіл. Окрім того, запропонований спосіб дає можливість різко прискорити час необхідний для аналізу *Ps. aeruginosa* у разі попередньої підготовки трансдюцерної поверхні, до 10-15 хвилин.

- 25 Технічне рішення способу експрес-визначення *pseudomonas aeruginosa* дозволяє використовувати його як для скринінгу, так і моніторингу соціально значущих бактеріальних інфекцій тварин з метою їх оздоровлення, оскільки в силу своїх властивостей і переваг дозволяє здійснювати діагностику у польових умовах і в короткі терміни.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 35 Спосіб експрес-оцінки *Pseudomonas aeruginosa*, що передбачає вивчення активності ОН- і Н-антигенів *Ps. aeruginosa* в процесі імунізації тварин-донорів за допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції та реакції аглютинації з подальшим отриманням видоспецифічних сироваток, який **відрізняється** тим, що визначення *Ps. aeruginosa* здійснюють за допомогою аналітичного приладу - імунобіосенсора, на підготовлену поверхню трансдюцера наносять розчин антитіл і після промивки фізрозчином наносять розчин антигену відповідної концентрації, від 10 кл. в 1 мл, результат інтерпретують згідно з графіком на екрані.



Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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