



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **51125** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 31/505

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

**(54) ІМУНОСЕНСОРНА ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ
ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ПРОТИ ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР**

1

2

(21) u200905251

(22) 26.05.2009

(24) 12.07.2010

(46) 12.07.2010, Бюл.№ 13, 2010 р.

(72) НЕСТЕРОВА НАДІЯ ВІТАЛІЇВНА, ЗАГОРОД-
НЯ СВІТЛАНА ДМИТРІВНА, БАРАНОВА ГАЛИНА
ВАСИЛІВНА, ГОЛОВАНЬ АННА ВОЛОДИМИРІВ-
НА, УШЕНІН ЮРІЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ, ХРИСТО-
СЕНКО РОМАН ВАСИЛЬОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ.
Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ

НАУК УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ ФІЗИКИ НАПІВПРОВІ-
ДНИКІВ ІМ. В.Є. ЛАШКАРЬОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Імуносенсорна тест-система на основі повер-
хневого плазмонного резонансу для виявлення
антитіл проти вірусу Епштейна-Барр, яка характе-
ризується тим, що містить кварцовий біочип з зо-
лотим напиленням, на якому іммобілізований вірус
Епштейна-Барр як антиген.

Імуносенсорна тест-система, яка відрізняється
тим, що виявляє специфічні антитіла проти вірусу
Епштейна-Барр (ВЕБ) в сироватках крові хворих.

Корисна модель відноситься до медицини та
може бути використана для проведення імунологі-
чних досліджень, зокрема діагностичних аналізів
інфікованих осіб та скринінгових досліджень насе-
лення на виявлення антитіл в крові хворих до ві-
русу Епштейна-Барр (ВЕБ). Метод поверхневого
плазмонного резонансу (ППР) містить в собі багаті
потенційні можливості для дослідження різних
аспектів взаємодії вірусів зі специфічними агрега-
тами, а також змін структури, викликаних різними
факторами. Однак в області вірусології даний ме-
тод практично не використовувався для детекції
вірусних антигенів та антитіл безпосередньо в
реальній пробі [1].

Клінічною формою первинного інфікування
людини вірусом Епштейна-Барр є інфекційний
мононуклеоз. ВЕБ може бути агентом, який спри-
чиняє лімфому Беркитта, назофарингіальну карце-
ному, різні лімфопроліферативні синдроми, хроні-
чну втомленість та аутоімунні розлади, вірус
уражує центральну і периферійну нервову систему
[2,3,4,5].

В медичній практиці для діагностики герпетич-
ної інфекції широко використовуються імунофер-
ментний та імунофлюорисцентний аналізи. До
недоліків слід віднести складність технологічного
процесу одержання рекомбінантних білків та бага-
тоступінчатість процесу виявлення антитіл проти

вірусу Епштейна-Барр і, як наслідок, високу ціну
таких тест-систем.

В основу даного корисної моделі на основі по-
верхневого плазмонного резонансу (ППР) з вико-
ристанням приладу "Плазмон 6" була поставлена
задача створити імуносенсорну тест-систему, яка
б дозволила виявляти імуноглобуліни класу G в
крові інфікованих осіб, що дасть змогу визначати
захворювання та призначати ефективне лікування.

Ця задача вирішується виготовленням біочи-
пів. Для створення сенсорного чипа, що викорис-
товується в біосенсорних пристроях із застосуван-
ням явища поверхневого плазмонного резонансу,
один з партнерів по взаємодії повинен бути іmmo-
білізований на сенсорній поверхні [6]. Була прове-
дена іммобілізація білків вірусу Епштейна-Барр в
якості антигену на кварцових чипах з золотим на-
пиленням. Визначені оптимальні умови адсорбції
антигену, що важливо для утворення комплексу
антиген-антитіло. Тобто корисна модель являє
собою імуносенсорну тест-систему на основі по-
верхневого плазмонного резонансу для виявлення
антитіл проти вірусу Епштейна-Барр, яка відрізня-
ється тим, що містить кварцовий біочип з золотим
напиленням, на якому іммобілізований білок вірусу
Епштейна-Барр як антиген.

Аналогів імуносенсорної тест-системи на ви-
явлення антитіл проти вірусу Епштейна-Барр в
сироватках крові людини не має.

Приклад способу приготування біочипа.

(13) **U**
(11) **51125**
(19) **UA**

Приклад 1. Чипи з напиленням золотом промивали дистильованою водою та очищали сумішшю, яка містила дистильовану воду, 35%-й перекис водню та 37%-у сірчану кислоту у співвідношенні 5:1:1. Далі чипи тричі промивали дистильованою водою. Для покращання іммобілізації антигену всю поверхню чипа покривали розчином (2мг/мл) Dextran 17 000 (Sigma)-0,05% цитратний буфер, рН 5,0-5,2, і витримували протягом 5 год. при кімнатній температурі (20-25°C). Промивали скельця трьома зміними цитратного буферу і покривали всю поверхню золота розчином антигену (білки вірусу Епштейна-Барр) в цитратному буфері. Витримували при 4-8°C протягом 18-24 год. Тричі промивали цитратним буфером і блокували вільні місця на біочипах 1% БСА в цитратному буфері протягом 1 год. при кімнатній температурі. Біочипи тричі промивали цитратним буфером і ретельно висушували на повітрі. Готові біочипи зберігали при 4-8°C у малих стерильних ємкостях, які заклеювали клейкою плівкою з метою запобігання дії повітря.

Використання способу пояснює приклад 2.

Приклад 2. Для визначення антитіл проти ВЕБ використовували біочипи отримані способом, що заявляється, з іммобілізованими білками ВЕБ на поверхні та двоканальний "Плазмон 6"-біосенсор. Канал 1 використовували в якості контрольного. Через канал 2 - дослідний, щоб уникнути неспецифічного зв'язування ВЕБ-антитіл, спочатку пропускали негативну сироватку людини. Відмивали матеріал, що не зв'язався, і пропускали сироватку крові хворого на ВЕБ-інфекцію. Облік результатів взаємодії антиген-антитіло здійснювали шляхом кількісного визначення кута відхилення у кутових секундах (к.с.) впродовж часу і аналізували дані за допомогою комп'ютерної програми Origin 6.0 (Фіг.).

При розробці імуносенсорної тест-системи виходили з граничного значення (ГЗ), сумуючи середнє значення показника кута відхилення негативних сироваток (аналізували 25 сироваток) та трьох середніх відхилень. При проведенні аналізу значення сироватки вважається позитивним, якщо її показник кута відхилення перевищує ГЗ на 10%. У разі, якщо значення показника кута відхилення нижче ГЗ на 10%, сироватка є негативною. Отримані дані в імуносенсорній тест-системі порівнювали з даними цих сироваток в імуноферментному аналізі.

Для сконструйованої тест-системи визначали чутливість та специфічність. Чутливість є відношення кількості сироваток, які мали позитивні результати в аналізі, до їх суми з кількістю хибно

негативних результатів, що виражено у відсотках. Чутливість імуносенсорної тест-системи становила 98%. Специфічність тест-системи є відношення кількості сироваток, які показали негативний результат в аналізі, до їх суми з кількістю хибно позитивних результатів, що виражено у відсотках. Специфічність сконструйованої імуносенсорної тест-системи становила 100%. Усі сироватки тестували у трьох повторях. Аналіз отриманих даних свідчить про досить високу відтворюваність результатів (95%).

Аналізуючи одержані результати по розробці імуносенсорної тест-системи для виявлення антитіл проти ВЕБ в сироватках крові хворих можна зробити висновок про можливість застосування методу ППР поряд з імунохімічним методом, в тому числі і ІФА. В той же час метод ППР має ряд переваг: він одноступінчатий, не потребує мічених макромолекул, дозволяє стежити та отримувати інформацію в ході проведення аналізу. Він може бути достатньо перспективним для використання в лабораторній діагностиці вірусних інфекцій.

Перевагою застосування методу ППР в діагностиці інфекційних захворювань є експресне отримання інформації в реальному часі стосовно етіологічного збудника захворювання, відсутність використання мічених реагентів та автоматизоване проведення аналізу.

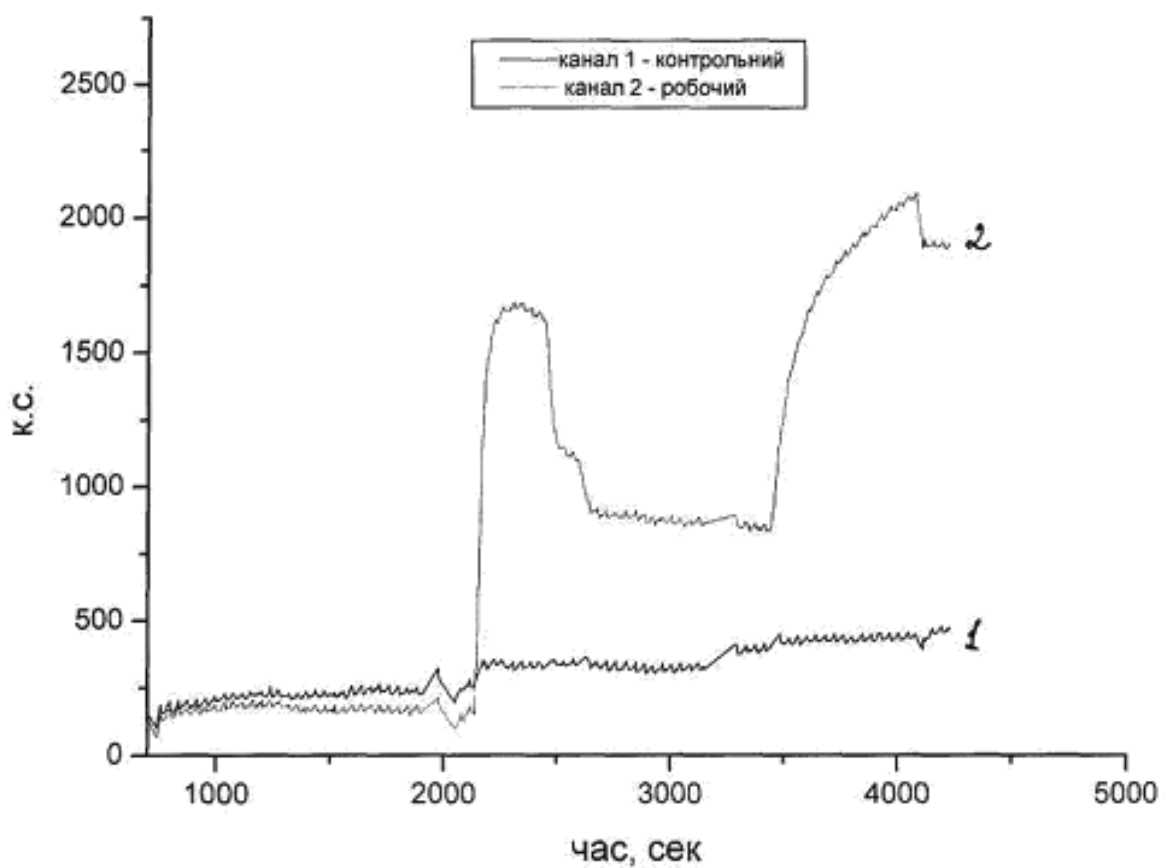
На Фіг. зображена крива аналізу сироватки крові хворого при використанні двоканального пристрою "Плазмон 6":

по осі ординат - кут відхилення (к.с.)

по осі абсцис - час проведення експерименту (сек.).

Джерела інформації:

1. П.М. Болтовець, Н.В. Нестерова. Застосування методу поверхневого плазмонного резонансу у вірусологічних дослідженнях // Мікробіол. журн.- 2006.- 68, N3. - С.86-98.
2. J.L.Kutok and F.Fang. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases // Annu. Rev. Mech. Dis. - 2006. - 4, N1. - P.375-404.
3. Anne K. Junker. Epstein-Barr Virus // Pediatrics in Review. - 2005. - 26, N3. - P.79-84.
4. Matthew P. Thompson and Razelle Kurzrock. Epstein-Barr Virus and cancer//Clinical Cancer Research.-2004. - 10, N3. - P.803-813.
5. Murray P.G., Young L.S., The Role of the Epstein-Barr Virus in Human disease // Front. Biosci. - 2002. - 2, N3. - P.519-540.
6. Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors//Anal. Bioanal. Chem. - 2003. - 377. - P.528-539.



Фіг.