



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **35190** (13) **U**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61B 10/00**  
**A61K 39/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ СПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПРОТИБРУЦЕЛЬОЗНИХ АНТИТІЛ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ВІД ССАВЦІВ "BRUCELISO TEST AB"**

1

2

(21) u200802760

(22) 03.03.2008

(24) 10.09.2008

(46) 10.09.2008, Бюл.№ 17, 2008 р.

(72) МАРТИНЕНКО ДМИТРО ЛЕОНІДОВИЧ, UA,  
РИБАЛЬЧЕНКО ДМИТРО ЮРІЙОВИЧ, UA, СПИ-  
РИДОНОВ ВЛАДІСЛАВ ГЕННАДІЙОВИЧ, UA, ЧУ-  
МАК РОСТИСЛАВ МАКСИМОВИЧ, UA

(73) МАРТИНЕНКО ДМИТРО ЛЕОНІДОВИЧ, UA,  
РИБАЛЬЧЕНКО ДМИТРО ЮРІЙОВИЧ, UA, СПИ-  
РИДОНОВ ВЛАДІСЛАВ ГЕННАДІЙОВИЧ, UA, ЧУ-  
МАК РОСТИСЛАВ МАКСИМОВИЧ, UA

(57)

1. Тест-система для специфічної імуноферментної діагностики протибруцельозних антитіл у біологіч-

них рідинах від ссавців, яка включає планшет або пластиковий гребінець, набір реагентів для імуноферментного аналізу та проявник, імунопероксидазний кон'югат, яка **відрізняється** тим, що як імунопероксидазний кон'югат використовують пероксидазний кон'югат на основі білка G, отриманого згідно зі стандартною методикою періодатного окиснення, по Вілсону-Накане.

2. Тест-система за п. 1, **яка відрізняється тим**, що як біологічну рідину використовують сироватку крові та молока тварин.

3. Тест-система за п. 1, **яка відрізняється тим**, що як біологічну рідину використовують міжкннинну рідину (сукровицю).

Корисна модель належить до імунохімії, ветеринарної медицини та може бути використана для діагностики інфікованості збудниками бруцельозу ссавців.

Бруцельоз - хронічно протікаюча хвороба тварин і людини, що викликається бактеріями, з'єднаними під загальною назвою *Brucella*. Бруцели відносяться до патогенних мікроорганізмів. Різні види володіють різною вірулентністю. Бруцели відрізняються високою інвазивністю, можуть проникати через непошкоджені слизисті покриви, відносяться до внутріклітинних паразитів.

Діагностика бруцельозу в основному проводиться по виявленню антитіл до антигенів збудника.

Імуноферментний аналіз (ІФА) широко використовується в діагностиці інфекційних захворювань завдяки широкому спектру обумовлених антитіл, антигенів або гаптенів, а також можливості автоматизації при читанні результатів і постановці реакції. Специфічність і чутливість ІФА обумовлені принципом його здійснення, при якому зафіксований на твердому носії антиген інкубується з тестуємою сироваткою, потім з антивидовим глобуліном, міченим ферментом. Взаємодія ферменту із субстратом дає кольорову реакцію, інтенсивність

якої залежить від кількості зв'язаних сироваткових антитіл.

Підвищення чутливості і специфічності ІФА досягається вибором твердого носія з досить стійкими імунологічними властивостями, чистотою й активністю антигенів і антитіл, вибором каталітично активних ферментів і хромогенних субстратів, оптимізацією умов реакції [Иммуноферментный анализ и его применение в инфекционной патологии. Обзорная информация под ред. В. И. Покровского, Е. П. Голубинского. - М.: ВНИИМИ, 1986].

Використання ІФА в діагностиці бруцельозу відомо давно, однак достатній специфічності і чутливості у виявленні антитіл до збудника бруцельозу поки не досягнуто.

Важливою особливістю захворювання на бруцельоз є сприятливість до нього майже всіх ссавців, про що свідчить постійна циркуляція збудника бруцельозу у природі. В такій ситуації цілком ймовірно виникнення спорадичних випадків захворювання у домашніх тварин. Основою профілактичних заходів на територіях вільних від бруцельозу є моніторингові (вибіркові) дослідження сприятливих тварин. До цього часу в Україні проводилися скринінгові (поголовні) дослідження всієї популяції сприятливих тварин, насамперед великої рогатої худоби (ВРХ). Дослідження проводилися застарі-

(13) **U**

(11) **35190**

(19) **UA**

лими методами, які є менш чутливими і не підлягають електронному протоколюванню результатів. Таку ситуацію повинно було змінити впровадження ІФА, але основним недоліком ІФА була його видоспецифічність, іншими словами, тест-система для діагностики ВРХ передбачала дослідження тільки ВРХ. Сьогодні виникла потреба налагодити серійне виробництво універсальної тест-системи ІФА, яка б дозволила проводити аналіз у ВРХ, малої рогатої худоби (МРХ), коней, свиней і навіть у м'ясоїдних та інших ссавців. Використання цієї тест-системи дозволить проводити дослідження в пулах сироваток і молоці. А саме головне за її допомогою можна перейти із скринінгових досліджень до моніторингових, що дасть економію державно-мюджету.

Відомий тест для виявлення зараженості бруцельозом базується на реакції зв'язування комплексу (РЗК) [1. Кайтмазова Е. И., Чернышева М. И. Лабораторная диагностика бруцеллеза. - В кн.: Бруцеллез (ред. П. А. Вершилова). - М.: «Медицина», 198-241].

Відомий тест для виявлення протибруцельозних антитіл тільки в сироватках крові людини та великої рогатої худоби (ВРХ) базується на імуноферментному аналізі (ІФА) (Пат. №48811 UA, від 27.05.2002).

До недоліків слід віднести те, що для визначення антитіл проти бруцел в молоці ця тест-система не призначена, а також для інших тварин теж не підходить.

Відома «Тест-система діагностична імуноферментна для визначення антитіл класу IgG до *Brucella abortus* у сироватках крові та в молоці великої рогатої худоби ("dia-brucella ab.-combi-v")» (пат. UA №63657, Кл. А61К39/00, від 15.01.2004). ІФА для визначення наявності антитіл класу IgG до *Brucella abortus* в сироватках крові та молоці ВРХ на основі антигенів, виділених з очищених культур штаму збудника бруцельозу - *Brucella abortus* 1119. Антигени сорбують на поверхні полістиролових планшетів. В складі кон'югатів використовуються моноклональні антитіла (анти IgG ВРХ), мічені ферментом.

Відома «Тест-система для специфічної імуноферментної діагностики протибруцельозних антитіл у біологічних рідинах від тварин "ІФА-бруцела АВ"» (пат. UA №58437, кл. А61К39/21, від 15.07.2003) яка включає планшет, набір реагентів для імуноферментного аналізу та проявник, яка має імунопероксидазний кон'югат на основі моноклональних антитіл, універсальний розчин для розведення біологічних компонентів та розчин для промивання.

На сьогодні не існує жодної комерційної тест-системи для визначення антитіл до збудника бруцельозу у ссавців. В основному тест-системи направлені на виявлення антитіл у окремих видів ссавців - крупний рогатий скот, малий рогатий скот, свині, коні, м'ясоїдні, верблюди або людини. Це обумовлено конструкцією одного з критичних компонентів тест-системи, під назвою - пероксидазний кон'югат. Тобто, в тест-системі видової належності присутні так звані антивидові кон'югати, а в тест-системі, що заявляється сконструйований

пероксидазний кон'югат котрий може виявляти антитіла майже всіх ссавців (мається на увазі наземних тварин і людини).

В основу корисної моделі поставлено задачу створення імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до збудника бруцельозу у ссавців, що дозволяє виявляти антитіла майже всіх ссавців шляхом сконструйованого пероксидазного кон'югату, завдяки чому система забезпечує виявлення антитіл проти антигенів збудника бруцельозу у майже всіх ссавців (мається на увазі наземних тварин і людини), тест-система проста, надійна в роботі, та проявляє високу чутливість та специфічність.

Методом генної інженерії був отриманий аналог природного білка G - компонента клітинної стінки штамів гемолітичних стрептококів, який здатний зв'язуватися з Fc фрагментами імуноглобулінів класу G різних видів ссавців. Білок G являє собою поліпептид з молекулярною вагою в біля 30кДа. Геноінженерний (рекомбінантний) білок G був модифікований на відсутність альбуміно-єднального домену. Одна молекула білка G здатна взаємодіяти із двома молекулами імуноглобуліну класу G. Пероксидазний кон'югат на основі білка G отримали згідно стандартної методики періодатного окиснення, по Вілсону-Нкане, після чого кон'югат використовують у вигляді інгредієнту тест-системи для виявлення антитіл ссавців

Поставлена задача вирішується таким чином, що у відомій тест-системі яка включає набір реагентів для імуноферментного аналізу, згідно з корисною моделлю, в якості одного з інгредієнтів використовують пероксидазний кон'югат на основі білка G отриманий згідно стандартної методики періодатного окиснення, по Вілсону-Нкане.

Розроблена тест-система більш підходить до практичної діяльності тому, що в разі виникнення потреби діагностування окремого виду, чи декілька видів ссавців вона може оперативно використовуватися в осередках інфекції або для поточного моніторингу за епізоотичною ситуацією.

Завдяки використанню імунопероксидазного кон'югату на основі білка G тест-система дозволяє без зміни комплектації проводити діагностику бруцельозом різних видів тварин використовуючи різні біологічні проби від цих тварин.

До складу тест-системи входять наступні види сировини (таблиця 1). Кон'югат - специфічний рекомбінантний білок до імуноглобулінів тварин, що кон'югований із пероксидазою хрому.

Позитивний контроль - сироватка крові тварин, які проімунізовані бруцельозними антигенами та позитивно реагує у ІФА. Отримують в лабораторних умовах згідно з вимогами технологічних інструкцій.

Негативний контроль - сироватка крові тварин, що не містить антитіл до *Brucella abortus*. Отримують в лабораторних умовах згідно з вимогами технологічних інструкцій.

Хромоген ТМБ - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, імпортований, фірми Clinical science product inc., кат. №01016-1.

В залежності від комплектації система може випускатись в трьох варіантах (таблиця 2).

Можливість практичного використання тест-системи, що заявляється, ілюструється прикладом конкретного виконання з використанням повної сукупності ознак корисної моделі.

Приклад 1.

Проведення аналізу у розрахунку на одну постановку ІФА - 96 лунок.

Перед початком роботи компоненти набору необхідно витримати при температурі (18-22)°C протягом 30 хвилин. Приготувати розчин для промивання планшета (розчин №1). Вміст флакона концентрату розчину №1 інтенсивно струшують і розводять у 350см<sup>3</sup> очищеної води та перемішують. Якщо концентрат розчину кристалізований, його нагрівають перед застосуванням при (35-37)°C до повного розчинення кристалів. Розчин можна зберігати при температурі (2-8)°C не довше 5 діб. Далі готують розчин кон'югату. В окремий флакон вносять 12см<sup>3</sup> розчину для промивання планшета, відбирають (0,3-0,4)см<sup>3</sup> розчину і вносять в ампулу з кон'югатом. Після повного розчинення вміст ампули переносять у флакон. Вміст флакона ретельно перемішують піпетуванням, не допускаючи піноутворення. Цю процедуру повторюють тричі з метою повного вилучення кон'югату з ампули. Розчин кон'югату готують безпосередньо перед використанням.

Підготовка зразків до випробування.

1 Підготовка зразків сироваток крові тварин. Зразки сироваток, які містять осад необхідно освітлювати центрифугуванням. Зразки сироваток зберігають (4±2)°C протягом трьох діб; якщо немає можливості провести аналіз в даний термін, зразки необхідно заморозити. Процес заморожування та відтавання повинен бути не більше 2 разів. Зразки з гемолізом та бактеріальним проростом для аналізу не придатні.

2 Підготовка зразків сироваток крові для дослідження в пулах. Зразки 10 сироваток, що підготовлені для аналізу, змішують в однакових пропорціях (по 0,1см<sup>3</sup>) в окремій пробірці. Ретельно перемішують та використовують для аналізу. Пули сироваток зберіганню не підлягають.

3 Підготовка зразків сироваток молока ВРХ. Свіжовідбране молоко піддають центрифугуванню при 1500об/хв. протягом 10 хвилин для отримання молочної сироватки. Центрифужні стаканчики залишають при (4±2)°C протягом 30 хвилин, після чого проводять відбір молочної сироватки з під шару сливок. Зразки молочної сироватки довгостроково зберігають в замороженому стані. Процес заморожування та відтавання зразків сироватки повинен бути не більше 2 разів.

4 Підготовка зразків міжтканинної рідини для досліджень. Шматочок до 20гр замороженого м'яса (м'якоті) кладуть у чашку Петрі та розморожують при кімнатної температурі або в термостаті (37°C). Утворену сироватку (міжтканинну рідину) використовують для аналізу. Якщо немає можливості провести аналіз в цей термін, зразки необхідно заморозити. Процес розморожування зразків сироваток повинен бути не більше 2 разів.

Проведення випробування. Готують розчин №1 як описано вище. Виймають імуносорбент з пакувального пакету та вносять в усі лунки по

0,35см<sup>3</sup> розчину №1, витримують залитим 30-40 секунд і видаляють розчин з лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки, після чого позбавляються зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу. В кожну лунку вносять по 0,09см<sup>3</sup> розчину №3 для розведення сироваток. В лунки планшета вносять по 0,01см<sup>3</sup> зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролю). В дві лунки (A1, B1) вносять по 0,01см<sup>3</sup> позитивного контролю (K+), а в три інші (D1-E1) - по 0,01см<sup>3</sup> негативного контролю (K-). При внесенні контрольних та досліджуваних зразків необхідно обережно піпетувати суміш. Під час піпетування відбувається зміна кольору розчину в лунках. Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37°C протягом 60 хвилин. По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином №1, після чого позбавляються зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

Готують розчин кон'югату. В лунки імуносорбенту вносять по 0,1см<sup>3</sup> розчину кон'югату. Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 37°C протягом 20 хвилин. По закінченні інкубації видаляють розчин кон'югату з лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином №1, після чого позбавляються зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу. Вносять в лунки планшета по 0,1см<sup>3</sup> розчину хромогену ТМБ. Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при (18-22)°C в темному місці протягом 20 хвилин. Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 0,05см<sup>3</sup> розчину №2 (стоп-реагенту). Не більше як через 1 хвилину після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) в лунках в двохвильовому режимі (450nm відносно 620nm).

Розраховують середнє значення оптичної густини (ОГ) для лунок негативного контролю (ОГ K-) і для позитивного контролю (ОГ K+). Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГ K- не вище 0,2 оптичної одиниці (ОО), а ОГ K+ не нижче 0,6 ОО.

Якщо одне з трьох значень ОГ K- більше 0,2 ОО його відкидають та ОГ K-розраховують за рештою значень ОГ K-. Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи константну для кожної серії наборів величину до значення ОГ K-. Значення константної величини встановлює для кожної серії тест-систем виробник, і вказує його в настанові по використанню тест-системи (Фіг.).

"Сіра зона" - зона значень ОГ, яка простягається від ГЗ до значень менших ГЗ на 10%. Результати аналізу вважаються негативними, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше рівня ОГ "сірої зони". Результати аналізу вважаються позитивними, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ. Зразки, які мають значення ОГ в межах "сірої зони", вважаються невизначеними. Зразки, що дали позитивний або невизначений результат, необхідно досліджувати повторно не

менш як у двох лунках системи. Зразки, позитивні в одній або більше лунках, слід вважати позитивними. Зразки, негативні в двох або більше лунках, слід вважати негативними. В разі отримання позитивного або невизначеного результату у випадку дослідження пулів сироваток необхідно переставити кожний зразок сироватки окремо в розрахунку один зразок - одна лунка.

Приклад 2. Визначення чутливості та специфічності пропонованої тест-системи.

Основними показниками якості тест-системи є показники чутливості та специфічності. Чутливість тест-системи повинна бути не нижче 98%, а специфічність не нижче 95% при визначенні методом ІФА з використанням стандартного набору позитивних та негативних сироваток

Використовуючи названі тест-системи, досліджували сироватки крові та зразки молока (10 достеменно позитивних сироваток, 10 достеменно позитивних проб молока та 100 достеменно нега-

тивних зразків сироваток та молока). Усі зразки досліджували у чотирьох повторностях кожної тест-системою за описаною методикою. З 20 позитивних зразків наявність антитіл проти збудника бруцельозу показали 20, що становить 100% чутливості. З 100 негативних сироваток у пропонованій тест-системі виявилися справді негативними 95 (специфічність - 95%). В порівняльній тест-системі з 20 достеменно позитивних зразків 1 проба молока визначена як негативна. Чутливість становила 95%. З 100 негативних зразків виявилися справді негативними 95 зразка (специфічність - 95%).

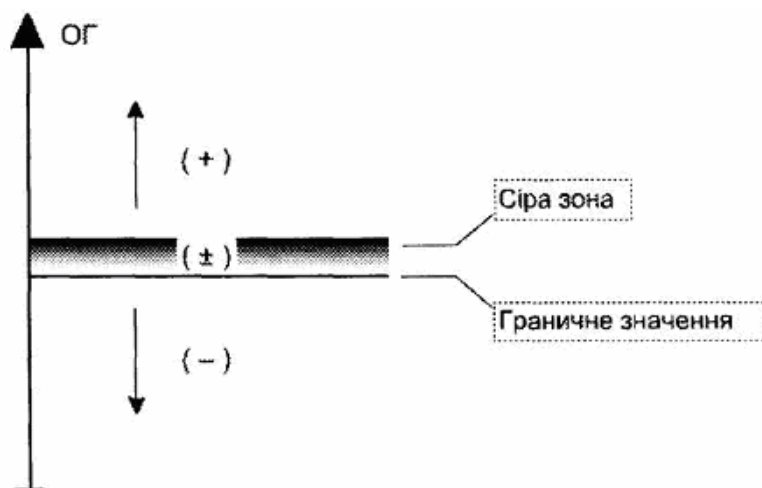
Таким чином, пропонована тест-система забезпечує виявлення антитіл проти антигенів збудника бруцельозу у різних видів тварин використовуючи різні біологічні проби від цих тварин. Проста і надійна в роботі, проявляє високу чутливість та специфічність.

Таблиця 1

Назва показника	Характеристика та норма
Зовнішній вигляд, колір: - кон'югат імуноферментний - позитивний контроль ( $K^+$ ) - негативний контроль ( $K^-$ ) - хромоген ТМБ - концентрат розчину №1  - розчин №2 - розчин №3 - імуносорбент	Світло-солом'яна опалесцентна рідина  Світло-солом'яна трохи опалесцююча рідина Світло-солом'яна трохи опалесцююча рідина Прозора безбарвна рідина Безбарвна опалесцююча рідина, допускається розшарування та випадіння кристалічного осаду, що розчинюється при температурі (35-37)°C протягом (15-20) хвилин. Прозора безбарвна рідина Фіолетова трохи опалесцююча рідина Полістироловий суцільний або стріповий планшет або пластиковий гребінець з сорбованим на ньому антигенами бруцельозу, не повинен мати тріщин та пошкоджень
Концентрація водневих іонів (pH):	
- розчин №1	(7,3±0,1) при розчиненні 12см <sup>3</sup> розчину у 350мл очищеної води
- розчин №3	(7,3±0,1)
Номінальний об'єм см <sup>3</sup> :	
- кон'югат імуноферментний	Від 0,3 до 2,0
- позитивний контроль ( $K^+$ )	0,1 або 0,3
- негативний контроль ( $K^-$ )	0,1 або 0,3
- хромоген ТМБ	12 або 22
- концентрат розчину №1	5 або 12
- розчин №2	6 або 12
- розчин №3	12
Чутливість та специфічність	
- чутливість	Не нижче 98%, при визначенні методом імуноферментного аналізу з використанням стандартного набору позитивних сироваток
- специфічність	Не нижче 95%, при визначенні методом імуноферментного аналізу з використанням стандартного набору негативних сироваток

Таблиця 2

Варіант №1	Варіант №2	Варіант №3
1. Імуносорбент - 2 суцільних планшета; 2. Кон'югат імуноферментний - 2 ампули від 0,1 до 2,0см <sup>3</sup> ; 3. Концентрат розчину №1 для промивання планшета - 2 флакони по 12см <sup>3</sup> ; 4. Розчин №2 (стоп-реагент) - 1 флакон - 12см <sup>3</sup> ; 5. Розчин №3 для розведення сироваток - 2 флакони по 12см <sup>3</sup> ; 6. Хромоген ТМБ - 2 флакони по 12см <sup>3</sup> , або 1 флакон - 21см <sup>3</sup> ; 7. Позитивний контроль (К+) - 2 ампули по 0,10см <sup>3</sup> ; 8. Негативний контроль (К-) - 2 ампули по 0,10см <sup>3</sup> ; 9. Клейка плівка - 6 шт.	1 Імуносорбент - 1 стриповий планшет (6 стрипів по 2 ряди кожен); 2. Кон'югат імуноферментний - 3 ампули від 0,1 до 2,0см <sup>3</sup> ; 3. Концентрат розчину №1 для промивання планшета - 3 флакони по 5см <sup>3</sup> ; 4. Розчин №2 (стоп-реагент) - 1 флакон - 6см <sup>3</sup> ; 5. Розчин №3 для розведення сироваток - 1 флакон - 12см <sup>3</sup> ; 6. Хромоген ТМБ - 1 флакон - 12см <sup>3</sup> ; 7. Позитивний контроль (К+) - 1 ампула - 0,3см <sup>3</sup> ; 8. Негативний контроль (К-) - 1 ампула - 0,3см <sup>3</sup> ; 9. Клейка плівка - 9 шт.	1. Імуносорбент - пластиковий гребінець - 3 шт. 2. Розчин №1 для розведення сироваток та кон'югату - 1 флакон 22см <sup>3</sup> ; 3. Кон'югат імуноферментний - 3 ампули по 0,05-0,1см <sup>3</sup> ; Хромоген ТМБ - 1 флакон 7см <sup>3</sup> ; 4. Позитивний контроль (К+) - 1 ампула - 0,2см <sup>3</sup> ; 5. Негативний контроль (К-) - 1 ампула - 0,2см <sup>3</sup> ; 6. Планшет для проведення реакції багаторазового використання - 1 шт. (за вимогою споживачів)



Фіг.