



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96997** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/553 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 10365**
(22) Дата подання заявки: **22.09.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.02.2015**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.02.2015, Бюл.№ 4**

(72) Винахідник(и):
Венгер Євген Федорович (UA),
Маслов Володимир Петрович (UA),
Ушенін Юрій Валентинович (UA),
Самойлов Антон Володимирович (UA),
Дорожинський Гліб Вячеславович (UA),
Громовой Юрій Сергійович (UA),
Клестова Зінаїда Сергіївна (UA),
Бабкін Михайло Валерійович (UA),
Годовський Олексій Вячеславович (UA)
(73) Власник(и):
Венгер Євген Федорович,
Стратегічне шосе, 17, кв. 142, м. Київ, 03028 (UA),
Маслов Володимир Петрович,
вул. Паньківська, 25, кв. 11, м. Київ, 01032 (UA),
Ушенін Юрій Валентинович,
вул. Пушкіна, 17/1, смт Глеваха,
Васильківський р-н, Київська обл., 08630 (UA),
Самойлов Антон Володимирович,
просп. Науки, 54-б, кв. 293, м. Київ, 03083 (UA),
Дорожинський Гліб Вячеславович,
вул. Ольжича Олега, 19/28, кв. 31, м. Київ, 04060 (UA),
Громовой Юрій Сергійович,
пр. Науки, 17/15, кв. 68, м. Київ, 03038 (UA),
Клестова Зінаїда Сергіївна,
вул. Петровського, 6, кв. 38, м. Київ, 03087 (UA),
Бабкін Михайло Валерійович,
вул. Виборзька, 31/37-а, кв. 129, м. Київ, 03056 (UA),
Годовський Олексій Вячеславович,
вул. Волгоградська, 21, кв. 14, м. Київ, 03141 (UA)

UA 96997 U

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики лейкозу великої рогатої худоби, за яким за допомогою імуносенсорного аналізу на основі поверхневого плазмонного резонансу у сироватці молока корів визначають наявність антитіл до білків р24, рg 51 вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Імобілізацію вказаних білків проводять приведенням у контакт їх розчину з поверхнею нанорозмірної плівки золота та нейтралізації таких активованих карбоксильних груп, які не прореагували на попередній стадії, за допомогою розчину, що містить аміни. Відпалюють чутливий елемент з поверхневим нанорозмірним шаром золота при температурі 100-140 °С протягом 10-40 хв. і/або

опромінюють золоту плівку чутливого елемента ультрафіолетом з довжиною хвилі 205-315 нм протягом 10-40 хв.

Корисна модель належить до способів діагностування стану здоров'я великої рогатої худоби.

Відомо, що збудником лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) є вірус гину С із родини ретровірусів, роду онковірусів. Вірус лейкозу, окрім ревертази, містить 6 білків, із яких визначальними є поверхневий (оболонковий) глікопротеїд gp51 та внутрішній білок р24. Це захворювання може передаватись різними шляхами та за короткий час одна хвора тварина може заразити все стадо. Запропонована корисна модель може бути використана у ветеринарії для неінвазійної експресної діагностики лейкозу ВРХ.

Для діагностики інфекційних хвороб широко застосовується серологічний аналіз для визначення антигенів та антитіл [1]. Зокрема, такий підхід використовується для діагностики вірусного лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ).

Недоліками аналога є недостатньо висока чутливість (в межах 5-50 мкг/мл) та дуже велика тривалість виконання аналізу (2-3 доби) в умовах стаціонарної лабораторії.

Відомий аналог є модифікації твердофазних імунохімічних методів (ELISA) [2]... Процедура діагностики лейкозу великої рогатої худоби методом ELISA включає адсорбцію антигену на поверхні полістиролового планшета з розрахунку 0,1 мл розчину антигену на лунку (розчин антигену готують в 0,1 М фосфатному буфері з рН 7,8) протягом 1 години при температурі 37 °С. Спосіб дозволяє визначити 1-10 нг/мл специфічного білка.

Недоліками аналога є те, що він потребує реактивів, високої вартості, які не виробляються в Україні, та має високу трудомісткість. Тому метод ELISA має високу вартість аналізу.

Відомий аналог є спосіб діагностування вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що передбачає визначення фрагмента ENV-гена вірусу лейкозу, який відрізняється тим, що для полімеразної ланцюгової реакції використовують праймери, що складаються з таких послідовностей: BIV1 5' - GAA TGT GAA CAC TTA ACT GCA ATA-3' та BIV2 5' - AAT GTC GGA CTA CAG TCT TCC-3', які характеризуються 100 % ступенем гомології. [3]. Цей спосіб забезпечує високу чутливість та специфічність детекції вірусу ВРХ.

Недоліком аналога є те, що він потребує трудомісткої попередньої підготовки зразків до аналізу, дорогих витратних матеріалів та обладнання для діагностування лейкозу, що обумовлює високу вартість аналізу.

Найбільш близьким аналогом до корисної моделі є спосіб [4] неінвазійної діагностики лейкозу великої рогатої худоби, за яким за допомогою імуносенсорного аналізу на основі поверхневого плазмонного резонансу у сироватці молока корів визначають наявність антитіл до білків р24, рg 51 вірусу лейкозу великої рогатої худоби, присутність яких вказує на наявність хвороби в тварини.

Найближчий аналог простий у реалізації, не потребує високовартісних вихідних матеріалів і тому дешевший від аналогів. Важливою перевагою запропонованого метода є то, що його можна здійснювати на обладнанні, що виробляється в Україні (прилади серії "Плазмон").

Недоліком найближчого аналога є неоднорідність чутливого шару сенсора, що призводить до неповної взаємодії по всій поверхні площини, причиною неоднорідності є, в першу чергу, неоднорідність сформованого напорошуванням випаровуваного у вакуумі золотого шару. Тому неоднорідність поверхневого чутливого шару сенсора змінюється від чипа до чипа, що знижує точність вимірювання.

В основу корисної моделі поставлена задача створення високоточного способу неінвазійної діагностики лейкозу великої рогатої худоби.

Поставлена задача вирішується тим, що пропонується спосіб діагностики лейкозу великої рогатої худоби, за яким за допомогою імуносенсорного аналізу на основі поверхневого плазмонного резонансу у сироватці молока корів визначають наявність антитіл до білків р24, рg 51 вірусу лейкозу великої рогатої худоби, присутність яких вказує на наявність хвороби в тварини, при якому іммобілізацію вказаних білків проводять приведенням у контакт їх розчину з поверхнею нанорозмірної плівки золота та нейтралізації таких активованих карбоксильних груп, які не прореагували на попередній стадії, за допомогою розчину, що містить аміни, згідно з корисною моделлю, для підвищення точнісних характеристик відпалюють чутливий елемент з поверхневим нанорозмірним шаром золота при температурі 100-140 °С протягом 10-40 хв. і/або опромінюють золоту плівку чутливого елемента ультрафіолетом з довжиною хвилі 205-315 нм протягом 10-40 хв.

Завдяки опроміненню золотої плівки чутливого елемента ультрафіолетом з довжиною хвилі 205-315 нм протягом 10-40 хв. відбувається очистка і окислення шару золота. Довжина хвилі вибрана з урахуванням наявності відомих джерел (ламп), що випускаються промисловістю. Тривалість опромінювання вибрана на основі експериментальних результатів, а саме при

опромінюванні менше 10 хв. ефект незначний, а при тривалості опромінювання більше 40 хв. подальше опромінювання не ефективне.

При відпалюванні чутливого елемента з поверхневим нанорозмірним шаром золота при температурі 100-140 °С протягом 10-40 хв. в атмосфері повітря досягається також ефект окислення поверхневого шару, що дозволяє при цих операціях досягнути активацію поверхні цього чутливого шару до біологічних розчинів, які в подальшому досліджуються методом поверхневого плазмонного резонансу. Відпал при температурі нижче 100 °С неефективний, а вище 140 °С відпал може призвести до рекристалізації поверхневого шару золота, що негативно впливає на точність подальших вимірювань. Відпал тривалістю менше 10 хв. навіть при температурі 140 °С неефективний і призводить до зменшення повторюваності результатів, а тривалість більше 40 хв. не дозволяє суттєво покращити результати і до того ж призводить до неефективного використання обладнання та ресурсів.

Проведення обробки за двома операціями послідовно є бажаним тому, що забезпечує високу повторюваність результатів, однак при масових обстеженнях з метою скорочення часу підготовчих операцій та контролю можна використовувати тільки одну з цих операцій, що забезпечить достатньо високу точність і повторюваність.

Запропоновані операції, матеріали та обладнання не є дорогими.

Загальний позитивний ефект запропонованого технічного рішення полягає в тому, що розроблені операції створюють по всій площині чутливого сенсора рівномірний, однорідний та цілісний чутливий шар без випадкових зон меншої чутливості та підвищують точність вимірювання, в порівнянні з прототипом, в 1,5-2,0 рази.

Приклади виконання корисної моделі.

1. Контроль стану здоров'я великої рогатої худоби відповідно до захворювання на лейкоз здійснювали запропонованим неінвазійним способом з використанням як біологічного матеріалу сироватку молока. Експерименти проводили з чипами, які відпалювали при температурі 90-145 °С протягом 7-45 хв. в атмосфері повітря. Відпал при температурі нижче 100 °С неефективний, а вище 140 °С відпал призводить до рекристалізації поверхневого шару золота, що негативно впливає на точність подальших вимірювань. Відпал тривалістю менше 10 хв. навіть при температурі 140 °С неефективний і призводить до зменшення повторюваності результатів, а тривалість більше 40 хв. не дозволяє суттєво покращити результати і до того ж призводить до неефективного використання обладнання та ресурсів. Потім ці оброблені чипи використовували у приладі "Плазмон", який розроблений та виготовлений в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Проводили контакт сироватки молока з чутливим шаром чіпа та фіксували зміни кута поверхневого плазмонного резонансу при наявності молочної сироватки та після її видалення нейтралізуючим розчином.

2. Чутливі елементи з напорошеним шаром золота опромінювали ультрафіолетовою бактерицидною лампою типу ДБ - 60М з довжиною хвилі 205-315 нм. Лампу розміщували на висоті 0,5 м від поверхні чипів. Тривалість опромінювання варіювали від 7 хв. до 45 хв. Потім ці оброблені чипи використовували у приладі "Плазмон", який розроблений та виготовлений в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Проводили контакт сироватки молока з чутливим шаром чіпа та фіксували зміни кута поверхневого плазмонного резонансу при наявності молочної сироватки та після її видалення нейтралізуючим розчином.

Експерименти показали, що при тривалості опромінювання менше 10 хв. ефект незначний (точність збільшується не більше ніж на 10 %). Оптимальним режимом було опромінювання протягом 10-40 хв., що дозволило збільшити точність вимірювання в діапазоні 1,5-2 рази. При тривалості опромінювання більше 40 хв. подальше опромінювання не ефективне, тому що практично не збільшувало точність вимірювання.

3. Запропоновані операції за пунктами 1 і 2 можна проводили як послідовно, так і окремо. Проведення обробки за двома операціями послідовно є бажаним тому, що забезпечує високу повторюваність результатів, однак при масових обстеженнях з метою скорочення часу підготовчих операцій та контролю можна використовувати тільки одну з цих операцій, що забезпечить достатньо високу точність (1,7-2 рази) і повторюваність.

Таким чином, експерименти показали, що використання корисної моделі підвищує в 1,5-2 рази точність та відтворюваність результатів вимірювань. При необхідності корисна модель може бути використана і для інших біологічних рідин, що відповідають життєдіяльності худоби (інвазивний контроль за зразками крові та інш.)

Джерело інформації:

1. O. Ouchterlony. Acta Path. Microbiol. Scand., 32 (1953), p. 23 1

2. Абрамова Л.О., Собко Ю.А., Собко І.О., Прискока В.А. Сучасний метод лабораторної діагностики лейкозу великої рогатої худоби // Ветеринарна медицина України. - 2003. - № 9. - С 39-41.

3. С.В. Новіков, О.І. Доброскок, А.Ю. Волинський, О.Ю. Лиманська, Н.П. Волянська, В.А. Маполов, О.П. Лиманський Спосіб детекції вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби // патент України на винахід № 66291 А, опуб. 15.04.2004, бюл. № 4.

4. Пирогова Л.В., Стародуб М.Ф. Спосіб неінвазійної діагностики лейкозу великої рогатої худоби шляхом визначення антитіл до вірусу у молоці корів імуносенсором поверхневого плазмонного резонансу // патент України на винахід № 81045 А, опуб. 26.11.2007

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики лейкозу великої рогатої худоби, за яким за допомогою імуносенсорного аналізу на основі поверхневого плазмонного резонансу у сироватці молока корів визначають наявність антитіл до білків р24, рg 51 вірусу лейкозу великої рогатої худоби, присутність яких вказує на наявність хвороби в тварини, при якому іммобілізацію вказаних білків проводять приведенням у контакт їх розчину з поверхнею нанорозмірної плівки золота та нейтралізації таких активованих карбоксильних груп, які не прореагували на попередній стадії, за допомогою розчину, що містить аміни, який **відрізняється** тим, що для підвищення точнісних характеристик, відпалюють чутливий елемент з поверхневим нанорозмірним шаром золота при температурі 100-140 °С протягом 10-40 хв. і/або опромінюють золоту плівку чутливого елемента ультрафіолетом з довжиною хвилі 205-315 нм протягом 10-40 хв.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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

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