



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **100065**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/49** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/531** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2014 13675**

(22) Дата подання заявки: **19.12.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.07.2015**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.07.2015, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Комісаренко Сергій Васильович (UA),  
Колибо Денис Володимирович (UA),  
Олійник Олена Сергіївна (UA),  
Редчук Тарас Анатолійович (UA),  
Луговська Наталія Едуардівна (UA),  
Сіромолот Андрій Андрійович (UA),  
Стегній Борис Тимофійович (UA),  
Герілович Антон Павлович (UA),  
Завгородній Андрій Іванович (UA),  
Ніколаєнко Ігор Васильович (UA),  
Раєвська Галина Євгенівна (UA)**

(73) Власник(и):

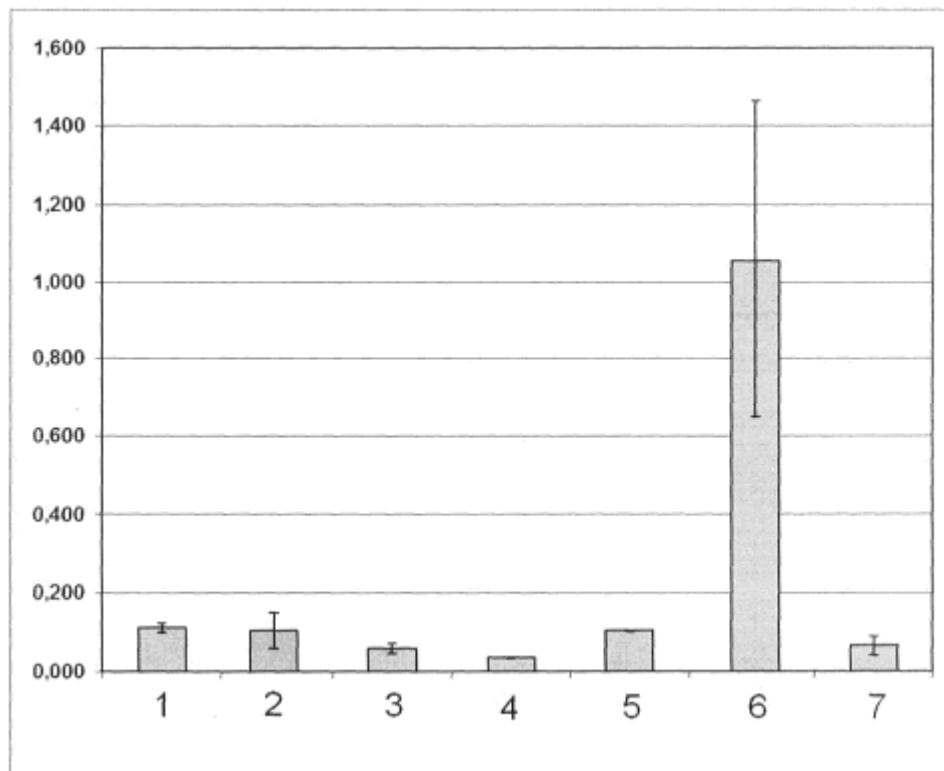
**ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК  
УКРАЇНИ,  
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601 (UA)**

**(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ІМУНОФЕРМЕНТНА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО MYCOBACTERIUM BOVIS**

**(57) Реферат:**

Тест-система імуноферментна для кількісного визначення антитіл до *Mycobacterium bovis* у сироватці або плазмі крові великої рогатої худоби методом непрямого твердофазного імуноферментного аналізу, що включає імуносорбент, кон'югат антивидових антитіл із ферментом та набір реагентів для імуноферментного аналізу. Імуносорбент виготовляють на основі високоімуногенного та високоспецифічного до антитіл проти *M. bovis* рекомбінантного генетично злитого антигену MPB63-MPB83 *M. bovis*, який одночасно має антигенні властивості двох індивідуальних антигенів *M. bovis*: MPB63 *M. bovis* і MPB83 *M. bovis*.

**UA 100065 U**



Корисна модель належить до біотехнології, імунохімії та ветеринарної медицини і може бути використана для виявлення антитіл до збудника туберкульозу великої рогатої худоби (ВРХ) *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) у сироватці або плазмі крові ВРХ методом непрямого твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА).

5 Туберкульоз - поширене в усіх країнах світу інфекційне захворювання, що за даними ВООЗ є другою за значимістю причиною смертності від одного інфекційного агента, поступаючись лише ВІЛ/СНІДу. Дане захворювання здатна викликати група мікроорганізмів під загальною назвою *Mycobacterium tuberculosis complex*, до складу якої входить і збудник туберкульозу ВРХ - *M. bovis*.

10 Відомо, що туберкульоз ВРХ призводить до суттєвих економічних збитків у галузі тваринництва, а також становить загрозу для здоров'я людини через можливість передачі інфекції від тварини до людини. Ризик інфікування людини *M. bovis* зростає за умов імуносупресії, обумовленої, наприклад, ВІЛ інфекцією. У цьому випадку можлива трансмісія *M. bovis* навіть від людини до людини.

15 На сьогодні у ветеринарній медицині основним життєвим тестом для діагностики туберкульозу ВРХ є внутрішньошкірна проба з використанням туберкуліну або суміші антигенів збудника туберкульозу, результати якої можуть бути підтверджені або спростовані посмертним методом діагностики - патологоанатомічним і бактеріологічним дослідженням [1]. Однак даний тест має ряд недоліків. Для нього характерна суб'єктивність оцінки, трудомісткість, велика  
20 затрата часу та низька специфічність. Так, наприклад, сенсibiliзація тварин до туберкуліну в ряді випадків може бути обумовлена контактом з непатогенними або атипovими мікобактеріями, що призводить до хибно позитивних результатів даного тесту та потребує проведення додаткових досліджень із застосуванням симульованої алергічної проби. Крім цього при туберкульозній інфекції може розвиватися стан анергії, яка є причиною хибно позитивних  
25 результатів даного тесту [2]. Отже, залишається актуальною потреба у нових високо специфічних засобах діагностики.

Крім різних модифікацій внутрішньошкірної туберкулінової проби, [3-6], для діагностики туберкульозу ВРХ відомий інтерфероновий тест [7], а також тест-системи, засновані на методі полімеразної ланцюгової реакції для прямої детекції ДНК збудника [8-11]. Проте, такі тест-  
30 системи мають високу вартість і потребують використання досить складного обладнання великої вартості, що робить неможливим їх застосування при перевірці та моніторингу на рівні стад.

Все це обумовлює необхідність створення недорогих та чутливих тест-систем для своєчасного виявлення інфікування ВРХ *M. bovis* та для постійного моніторингу епізоотичного  
35 стану стад. На даний час розвивається напрямок, пов'язаний із застосуванням для діагностики туберкульозу ВРХ серологічних тест-систем, заснованих на методі імуоферментного аналізу (ІФА) [12] або імунохроматографії [13], що дозволяють виявляти антитіла проти збудника туберкульозу ВРХ *M. bovis*. При цьому імуоферментні тест-системи повинні мати у складі імуносорбенту високоімуногенні антигени *M. bovis*, які не характерні для непатогенних видів  
40 мікобактерій. Показано, що застосування високоімуногенних мікобактеріальних антигенів дозволяє виявляти туберкульозну інфекцію навіть до появи позитивної реакції при внутрішньошкірній пробі [14]. Отже, серологічні тест-системи можуть бути важливим комплементарним способом контролю стад ВРХ щодо зараження на туберкульоз, оскільки дозволяють своєчасно виявляти тварин, інфікованих *M. bovis*, тварин із латентним перебігом  
45 цієї інфекції, а також тварин, анергічних до туберкуліну, які є прихованими джерелами збудника туберкульозу, що важливо в період проведення оздоровчих заходів та необхідно для контролю епізоотичної ситуації.

На сьогодні у ветеринарній практиці в Україні не застосовується жодна імуоферментна тест-система для виявлення антитіл до *M. bovis*. Відомо вітчизняну імуоферментну тест-  
50 систему для виявлення антитіл до *M. bovis*, в якій у складі імуносорбенту використовуються антигени, виділені з очищених штамів *M. bovis* [15]. Проте, виділення таких антигенів потребує культивування потенційно небезпечного збудника, що несе певну біологічну небезпеку, займає багато часу та є трудомістким, при цьому чутливість та специфічність такої тест-системи є недостатньо високою.

55 Відомо імуоферментні та імунохроматографічні тест-системи, в яких до складу імуносорбенту входять окремі рекомбінантні аналоги антигенів *M. bovis* [16] або їх коктейлі [17-18]. Застосування рекомбінантних аналогів антигенів *M. bovis* дозволяє значно знизити собівартість тест-систем та підвищити їх специфічність, а їх одержання не несе інфекційної загрози для оточуючих. Проте, ці тест-системи, створені з їх застосуванням, все ж таки не  
60 мають достатню чутливість або специфічність, що обумовлено індивідуальними особливостями

прояву імунних реакцій проти цих білків у кожної інфікованої тварини. Крім цього використання коктейлів антигенів у твердофазних тест-системах знижує ефективність розпізнавання деяких антигенів, що входять до складу цих коктейлів, через недостатнє експонування епітопів індивідуальних антигенів у зв'язку з їх низькою сорбційною здатністю, пов'язаною з малою молекулярною масою.

Одержання генетично злитих рекомбінантних антигенів є більш економічно вигідним, ніж одержання декількох індивідуальних антигенів. В злитих білках всі складові антигени представлені в еквівалентній кількості, що дозволяє контролювати співвідношення антигенних детермінант у складі імуносорбенту. Крім цього злиті білки мають більшу молекулярну масу, а тому й кращі сорбційні властивості, ніж окремі антигени, та краще експонування антигенних детермінант на твердій фазі.

Відомо експериментальні тест-системи, в яких у складі імуносорбенту використовують генетично злиті рекомбінантні антигени, що складаються з аналогів антигенів *M. bovis* CFP10 та MPT64 [19], ESAT6 та CFP10 [20], RV3872, ESAT6 та CFP10 [21], ESAT-6, MPB64, MPB70, MPB63, HSP65 та Ag85B [22]. Проте, не всі антигени *M. bovis*, що застосовуються в таких-тест-системах, мають достатню імуногенність та забезпечують необхідну чутливість та специфічність тест-систем.

Найближчим аналогом вибрано тест-систему, в якій як імуносорбент використовують рекомбінантний злитий антиген, що складається з послідовностей антигенів *M. bovis* RV3872, ESAT6 та CFP10 [21]. Проте, антигени ESAT6 та CFP10 *M. bovis* не мають достатню імуногенність через невеликі розміри (6 кДа та 10 кДа відповідно), а отже не забезпечують необхідну чутливість тест-системи.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу створити високочутливу та високоспецифічну імуноферментну тест-систему для виявлення антитіл до збудника туберкульозу ВРХ *M. bovis* у сироватці або плазмі крові ВРХ методом непрямого твердофазного ІФА з використанням імуносорбенту власної розробки.

Поставлена задача вирішується шляхом застосування в непрямому твердофазному ІФА, одержаного в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, рекомбінантного антигену *M. bovis* у складі імуносорбенту [23]. Рекомбінантний антиген *M. bovis* є генетично злитим химерним протеїном MPB63-MPB83, що складається з послідовностей двох діагностично важливих антигенів *M. bovis* MPB63 та MPT83. Дані антигени є високоімуногенними та характерними для *M. bovis* і не характерними для непатогенних видів мікобактерій. Антиген MPB63 є секреторним білком *M. bovis*, а антиген MPB83 є поверхневим білком бактерій. Отже, одночасне використання обох антигенів у складі імуносорбенту дозволяє одночасно оцінювати імунну відповідь як до секреторних, так і мембранних білків патогену, і, таким чином, діагностувати інфекцію на різних стадіях прояву. Злитий протеїн MPB63-MPB83 має антигенні властивості своїх складових та, в порівнянні з ними, має значно вищі сорбційні властивості, що обумовлює краще експонування епітопів, чим забезпечується вищий рівень сигналу в ІФА, а, отже, й чутливість тест-системи. У складі кон'югату в даній тест-системі використовують антивидові моноклональні антитіла. Візуалізацію утворених імунних комплексів проводять шляхом дії хромогену, наприклад 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ).

До складу тест-системи, що заявляється, входить:

ІФА-планшет стріповий з іммобілізованим рекомбінантним протеїном MPB63-MPB83 *M. bovis*;

позитивний контроль - мікропробірка, що містить розчин імуноглобулінів великої рогатої худоби, специфічних до *M. bovis*;

негативний контроль - мікропробірка, що містить сироватку крові великої рогатої худоби без імуноглобулінів, специфічних до *M. bovis*;

розчин для розведення сироваток у флаконі;

розчин кон'югату у флаконі, що містить розчин антивидових моноклональних антитіл, кон'югованих з ферментом;

розчин субстрату у флаконі;

концентрат розчину для промивання у флаконі;

стоп-реагент у флаконі;

клейка плівка;

бланк внесення проб.

Виявлення антитіл до збудника туберкульозу ВРХ *M. bovis* в плазмі крові або сироватці корів із використанням тест-системи, що заявляється, проводять, згідно з методикою, заснованою на непрямому твердофазному ІФА [24], як описано в Прикладі.

Приклад. Виявлення антитіл до збудника туберкульозу ВРХ *M. bovis* у сироватці корів.

До лунок стрипів вносять по 90 мкл розчину для розведення сироваток. Після цього до необхідних лунок вносять по 10 мкл відповідних контролів та досліджуваних зразків сироватки ВРХ. Стрипи заклеюють клейкою плівкою та інкубують протягом 30 хв. при температурі 37 °С. Після закінчення інкубації знімають клейку плівку та промивають лунки п'ять разів із використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки. Далі до лунок стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накривають новою клейкою плівкою та інкубують протягом 30 хв. при температурі 37 °С. Після закінчення інкубації знімають клейку плівку та промивають лунки стрипів п'ять разів. Далі до лунок вносять по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату. Інкують ІФА-планшет протягом 30 хв. у темному місці при температурі 18-25 °С. Реакцію зупиняють шляхом внесення до лунок стрипів по 100 мкл стоп-реагенту. Оптичну густину вимірюють за допомогою ІФА-рідера в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450 та 620 нм протягом 5 хв. після зупинення реакції (облік результатів аналізу можна проводити й в одноквильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, при цьому слід залишити лунку для встановлення бланку, до якої вносять лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

Для обліку результатів та їх інтерпретації спочатку визначають достовірність результатів аналізу. Розраховують середнє значення негативного контролю за формулою:

$$ОГ K_{\text{середнє}} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3})/3, (1)$$

де:

ОГ K<sub>середнє</sub> - середнє значення оптичної густини в лунці з негативним контролем;

ОГ K<sub>-1</sub> - значення оптичної густини в лунці з негативним контролем № 1;

ОГ K<sub>-2</sub> - значення оптичної густини в лунці з негативним контролем № 2;

ОГ K<sub>-3</sub> - значення оптичної густини в лунці з негативним контролем № 3.

Результати аналізу вважають достовірними, якщо:

оптична густина позитивного контролю (ОГ K+) не нижча 0,8 оптичних одиниць,

оптична густина в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вища за 0,15 оптичних одиниць.

оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше, ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто:

$$ОГ K_{\text{середнє}} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{\text{середнє}} \times 2,0, (2)$$

де:

ОГ K<sub>-n</sub> - оптична густина кожного значення негативного контролю. Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K за рештою значень негативного контролю.

Облік результатів аналізу проводять наступним чином. Рівень граничного значення (Cut off) розраховують, додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,2, тобто

$$\text{Граничне значення} = ОГ K_{\text{середнє}} + 0,2. (3)$$

Для кожного досліджуваного зразка розраховують індекс позитивності (ІП):

$$ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{Граничне значення}}. (4)$$

Досліджувані зразки зі значенням ІП, що вище 1,1, вважають позитивними щодо наявності специфічних антитіл до M. bovis (ІП>1,1). Зразки із значенням ІП, що нижче 0,9, вважають негативними щодо наявності специфічних антитіл до M. bovis (ІП<0,9). Зразки із значенням ІП в межах 0,9-1,1 вважають невизначеними (0,9≤ІП≤1,1). Невизначені сироватки досліджують повторно в двох лунках стрипу. Якщо результати знову будуть в межах невизначених, проводять тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. У разі одержання невизначених результатів вважають, що сироватка не містить специфічних до M. bovis антитіл.

В результаті проведеного дослідження виявлено, що позитивні значення ІП, а, отже, і наявність специфічних антитіл до M. bovis, спостерігається лише у тварин, експериментально інфікованих M. bovis. У здорових тварин, тварин, інфікованих непатогенними видами мікобактерій, та майже всіх тварин, хворих на лейкоз, значення ІП є негативним, а отже і не спостерігаються підвищені титри специфічних антитіл до M. bovis. На кресленні показано, як працює тест-система, що заявляється. При моніторингу сироваток крові здорових інтактних корів (1), здорових корів, вакцинованих вакциною BCG (2), корів, інфікованих непатогенними мікобактеріями: M.Intracellulare (3), M.Sorofalaceum (4), M.fortuitum (5), корів, інфікованих M.bovis (6), та корів хворих на лейкоз (7) наявність специфічних антитіл до M.bovis спостерігається лише у тварин, експериментально інфікованих M.bovis (6).

Перевагами тест-системи імуноферментної, що заявляється, є:

висока чутливість тест-системи (до 90 %);

використання високоімуногенного та специфічного рекомбінантного антигену M. bovis власного дизайну;

автоматичне кількісне визначення антитіл до *M. bovis*;  
швидке виконання аналізу (до 3 годин);  
простота та надійність в роботі.

Таким чином, тест-система, що заявляється, забезпечує швидке та точне виявлення в сироватці або плазмі крові ВРХ антитіл до збудника туберкульозу ВРХ *M. bovis*, що має важливе значення для своєчасного виявлення тварин, інфікованих *M. bovis* на рівні стад, тварин із латентним перебігом цієї хвороби, а також тварин, анергічних до туберкуліну, які є прихованими джерелами збудника туберкульозу, що важливо в період проведення оздоровчих заходів та необхідно для контролю епізоотичної ситуації.

Тест-система проста та надійна в роботі, має високу чутливість та специфічність.

Джерела інформації:

1. "Інструкція з профілактики та боротьби з туберкульозом тварин", затверджена Державним комітетом ветеринарної медицини України (Наказ N 316 від 03.09.2009).

2. Lepper A.W., Pearson C.W., Corner L.A. Allergy to tuberculin in beef cattle // Aust. Vet. J.-1977.-53, № 5.-214-216.

3. Пат. UA 54653-15.06.2005.

4. Pat. KR20110052295 (A) - 2011-05-18.

5. Pat. CN102692509 (A) - 2012-09-26.

6. Pat. US 6120776 (A) - 2000-09-19.

7. Jungersen G., Huda A., Hansen J J., Lind P. Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle // Clin. Diagn. Lab. Immu\_ nol.-2002.-9, № 2. - P. 453-460.

8. Пат. UA 3080-15.10.2004.

9. Vitale F., Capra G., Maxia L. et all. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in Cattle by PCR using milk, lymph node aspi\_ rates, and nasal swabs // J. Clin. Microbiol.-1998.-36, № 4. - P. 1050-1055.

10. Pat. KR20130031146 (A) — 2013-03-28

11. Pat. KR20130077165 (A) — 2013-07-09

12. Liu S., Guo S., Wang C et all. A novel fusion proteinI based indirect enzyme^ linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis // Tuberculosis (Edinb).-2007.-87, № 3. - P. 212-217.

13. Chakraborty N., Bhattacharyya S., De C, Mukherjee A. et all. A rapid immunochromatographic assay for the detection of Mycobacterium tuberculosis antigens in pulmonary samples from HIV seropositive patients and its comparison with conventional methods // J. Microbiol. Meth.-2009.-76, № 1. - P. 12-17

14. Cockle P.J., Gordon S.V., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of mycobacterium bovis in cattle clinical and vaccine // Immunology.-2006.-13, №10.-P. 1119-1124.

15. Пат. UA 68240 A — 15.07.2004.

16. CN103323591 (A) — 2013-09-25.

17. CN102707052 (A) — 2012-10-03.

18. CN101846677 (A) — 2010-09-29.

19. Pat. CN101846677 (A) — 2010-09-29.

20. Pat. CN102175875 (A) — 2011-09-07.

21. Pat. CN101900727 (A) — 2010-12-01.

22. Pat. CN101533017 (A) — 2009-09-16.

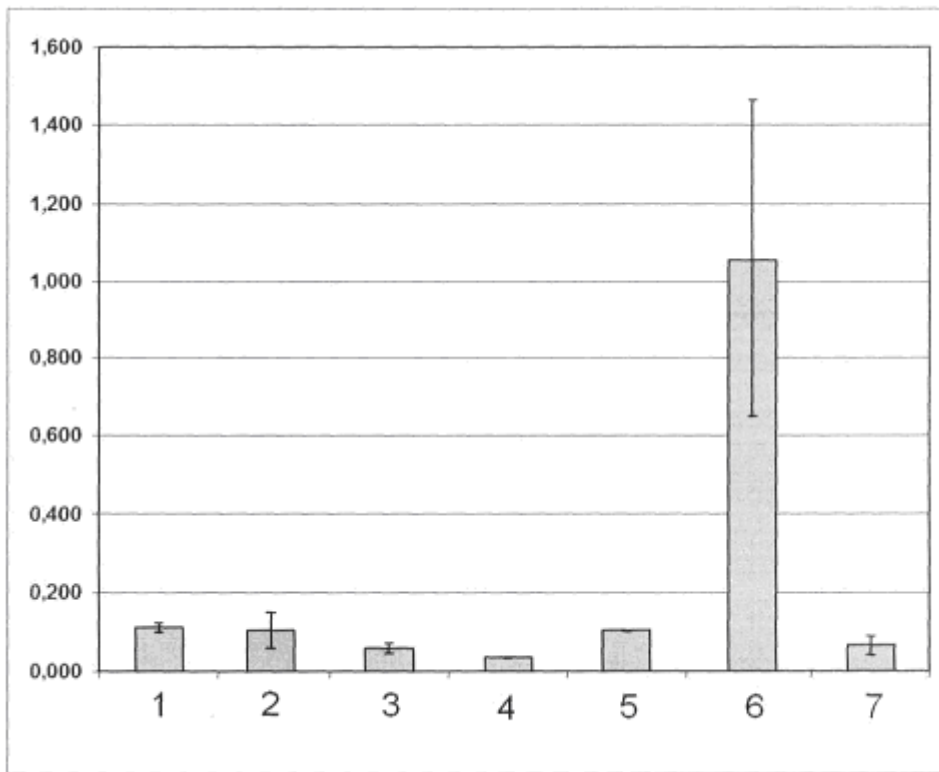
23. Redchuk T., Korotkevich N., Gorbatiuk O., Gilchuk P., Kaberniuk A., Oliynyk O., Kolibo D., Komisarenko S. Expression of Mycobacterium tuberculosis proteins MPT63 and MPT83 as a fusion: purification, refolding and immunological characterization // Journal of applied biomedicine.-2012.-10. -P. 169-176.

24. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. - Москва: Высшая школа. - 1991.-288 с.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Тест-система імуноферментна для кількісного визначення антитіл до *Mycobacterium bovis* у сироватці або плазмі крові великої рогатої худоби методом непрямого твердофазного імуноферментного аналізу, що включає імуносорбент, кон'югат антивидових антитіл із ферментом та набір реагентів для імуноферментного аналізу, яка **відрізняється** тим, що імуносорбент виготовляють на основі високоімуногенного та високоспецифічного до антитіл

проти *M. bovis* рекомбінантного генетично злитого антигену MPB63-MPB83 *M. bovis*, який одночасно має антигенні властивості двох індивідуальних антигенів *M. bovis*: MPB63 *M. bovis* і MPB83 *M. bovis*.



---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

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