



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 55269

(13) A

(51) 7 A61K39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ПРИЖИТТЄВОЇ ДІАГНОСТИКИ  
ТРИХІНЕЛЬОЗУ СВИНЕЙ

1

2

(21) 2002097226

(22) 05 09 2002

(24) 17 03 2003

(46) 17 03 2003, Бюл. № 3, 2003 р.

(72) Синицин В'ячеслав Анатолійович

(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ УК-  
РАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК(57) Тест-система на основі імуноферментного  
аналізу для прижиттєвої діагностики трихінельозу  
свиней, яка включає імуноферментний аналіз звикористанням екскреторно-секреторного  
трихінельозного антигену, яка відрізняється тим,  
що при проведенні імуноферментного аналізу для  
виявлення захворювання використовують екскре-  
торно-секреторний антиген, який концентрують та  
очищують методом адсорбційної хроматографії на  
макропористому сорбенті з діаметром пор 8000 Å  
та гель-хроматографії на макропористому сор-  
бенті, модифікованому полівінілпіролідом з  
діаметром пор 2000 Å

Винахід відноситься до ветеринарної медици-  
ни, а саме до лабораторної діагностики і призна-  
чений для прижиттєвої діагностики трихінельозу  
свиней

Аналог винаходу - близьким технічним рішен-  
ням винаходу є реакція мікропреципітації на живих  
личинках трихінел. Принцип реакції заключається  
в тому, що живі личинки чи статевозрілі трихінели,  
які вміщені в гомологічну імунну сироватку, при  
температурі 37-40°C виділяють продукти життєді-  
яльності (секрети і екскрети), котрі преципітуються  
антитілами імунної сироватки, створюючи преципі-  
тати, які чітко видно під мікроскопом

Негативна сторона методу заключається в то-  
му, що в реакції використовують живих личинок  
або статевозрілих трихінел, які можуть бути не-  
безпечними для виконавців реакції, трудомісткість  
їх одержання та зберігання, недостатня специфіч-  
ність, ефективність та візуальний облік реакції (1)

Прототип винаходу є реакція ензимом мічених  
антитіл для діагностики трихінельозу. Принципова  
схема відтворення цієї реакції полягає в тому, що  
в лунки мікропланшета для імуноопонічних дослі-  
джень одноразового використання, які виконують  
роль інертного носія антигену і антитіл, послідовно  
вносяться розчинний антиген, дослідна сироватка  
крові з припустимою наявністю антитіл, кон'югат і  
субстрат

Кон'югат це розчин антивидових антитіл, міче-  
них ферментом пероксидазою хрину, субстрат -  
суміш 0,08%-ий 5-аміносаліцилової кислоти з  
0,05%-ого перекису водню у відношенні 9:1

В якості антигену використовується трихінел-  
поз ний фракціонований антиген, що готується із  
свіжоодержаних або ліофілізованих личинок трихінел.  
Антиген одержують в 2 етапи, спочатку готу-  
ється цільний екстракт личинок трихінел, потім він  
фракціонується методом гель-хроматографії на  
сефадексі G-200,

Створений в процесі постановки реакції ком-  
плекс антиген-антитіло виявляється за допомогою  
кон'югата, що розщеплює субстрат, який характе-  
ризується появою темно-коричневого забарвлен-  
ня, яке може реєструватись візуально по титру  
дослідних сироваток або за допомогою спектро-  
фотометра, шляхом вимірювання оптичної щіль-  
ності субстрату (2)

Описані етапи одержання компонентів для по-  
становки реакції ензимом мічених антитіл, особли-  
во трихінельозного антигену за двома етапами,  
досить трудомісткі і складні, крім того при викорис-  
танні фракціонованого антигену при постановці  
реакції зустрічаються помилково-позитивні ре-  
зультати, реакція недостатньо специфічна, що  
значно знижує цінність реакції ензимом мічених  
антитіл при діагностиці трихінельозу

В основу винаходу поставлено завдання

Розробити тест-систему на основі імунофер-  
ментного аналізу (ІФА) для прижиттєвої діагности-  
ки трихінельозу свиней більш ефективною і про-  
стішою при одержанні компонентів для постановки  
реакції, усунувши недоліки прототипу

Тест-система на основі імуноферментного  
аналізу, представляє собою набір реагентів для

(13) A

(11) 55269

(19) UA

виявлення антитіл з використанням високо специфічного, очищеного, концентрованого екскреторно-секреторного трихінельозного антигену

Активними компонентами тест-системи являються трихінельозний антиген іммобілізований в лунках планшет, кон'югат антивидових антитіл, мічених ферментом пероксидазою хрину, контрольні позитивні та негативні сироватки

Метод виявлення антитіл до антигенів трихінел представляє собою твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА), в ході якого при взаємодії дослідних зразків сироватки крові з іммобілізованими в лунках планшетів антигенами трихінел відбувається зв'язування специфічних антитіл та утворення комплексу антиген-антитіло на поверхні лунок. Після відмивання незв'язаних компонентів сироватки і додаванням в лунки мікропланшета кон'югату антивидових антитіл з пероксидазою відбувається включення ферментної мітки в імунний комплекс. В результаті ферментативної реакції, що відбулася в лунках (відмитих від надмірного кон'югату) з субстратним розчином для пероксидази, що містять перекис водню і 5% аміносаліцилової кислоти, утворюється забарвлений продукт. Інтенсивність забарвлення цього продукту пропорційна концентрації антитіл до антигенів трихінел в дослідному зразку сироватки

Постановка реакції виявлення антитіл до збудника трихінельозу методом ІФА

В лунки сенсибілізованих трихінельозним антигеном мікропланшет вноситься по 0,1 см<sup>3</sup> фізіологічний розчин твіну (ФРТ). В першу лунку ряду "А" вноситься 0,1 см<sup>3</sup> специфічної до трихінельозу сироватки крові. В першу лунку ряду "В" вноситься 0,1 см<sup>3</sup> сироватки крові негативної, а в перші лунки рядів С, D, E, F, G, H вносяться по 0,1 см<sup>3</sup> дослідні сироватки і шляхом подвійних розведень розтираються всі проби, ретельно перемішуючи їх протягом 5-7 секунд. Після цього накрити мікропланшет кришкою і помістити в термостат на 1 годину при температурі +37,5°C. Після інкубації вміст лунок злити, заповнити їх ФРТ і знову злити, повторюючи це 6-7 разів

У відмиті лунки мікропланшета вноситься по 0,1 см<sup>3</sup> кон'югат антисвинячий, інкубується 1 годину в термостаті + 37,5°C, з наступним ретельним відмиванням мікропланшета 6-7 разів ФРТ та дистильованою водою

До всіх лунок мікропланшета вноситься по 0,1 см<sup>3</sup> розчин субстратної суміші і ведеться спостереження за забарвленням ферментативної реакції. При досягненні забарвлення позитивного контролю реакцію зупиняють додаванням до кожної лунки по 30-35 мкл 1N HCL і проводиться облік реакції

Облік результатів ферментативної реакції проводять за допомогою автоматичного спектрофотометру, або візуально з врахуванням інтенсивності забарвлення за 4-х хрестовою системою

- |      |                               |                     |
|------|-------------------------------|---------------------|
| ++++ | - (яскраво-жовте забарвлення) | - позитивна реакція |
| +++  | - (жовте забарвлення)         | - позитивна реакція |
| ++   | - (слабо-жовте забарвлення)   | - сумнівна реакція  |
| -    | - (забарвлення відсутнє)      | - негативна         |

реакція

При обліку реакції ІФА на спектрофотометрі показник оптичної щільності вище 0,15 - реакція позитивна. Діагностичний титр 1:100

Проведені нами дослідження показали, що кращі результати при постановці реакції ІФА по виявленню антитіл до збудника трихінельозу одержані при використанні екскреторно-секреторного трихінельозного антигену

Екскреторно-секреторний трихінельозний антиген одержували шляхом інкубації личинок *Trichinella spiralis* живих інвазованих личинок *T. spiralis* відмивали в стерильному фізіологічному розчині, потім в розчині Хенкса з додаванням 1000 ОД/мл пеніциліну і 1 мг/мл стрептоміцину. Після чого личинки вмишували в пробірку з середовищем Ігла з додаванням 20 мкл/мл 1,5%-ного розчину L-глутаміну і 2 мкг/мл 4%-ного розчину гентаміцину. Інкубували в термостаті при t 37°C протягом 4 діб. Після цього для підвищення активності та специфічності одержані трихінельозні антигени концентрували та очищали методом адсорбційної хроматографії на макропористому сорбенті з діаметром пор 8000 Å та гель-хроматографії на макропористому сорбенті модифікованому полівілпіролідом з діаметром пор 2000 Å

Одержаний таким чином антиген використовували для прижиттєвої діагностики трихінельозу методом ІФА

У відповідності до наказу головного державного інспектора ветеринарної медицини України №1 від 10.01.1997р комісією проведена міжвідомча комісійна перевірка "Набору прижиттєвої діагностики трихінельозу методом імуоферментного аналізу (ІФА)" до складу якого увійшов одержаний нами екскреторно-секреторний антиген

Результати міжвідомчої комісії перевірки набору діагностиків для ІФА для прижиттєвої діагностики трихінельозу показали 100% чутливість та специфічність

Виробничі дослідження по вивченню ефективності діагностичної тест-системи ІФА для прижиттєвої діагностики трихінельозу проводили в Кіровоградській, Миколаївській, Хмельницькій, Одеській та Закарпатській областях. В Миколаївській області було досліджено 585 проб сироватки крові, з них в Новобузьському районі (КСП "Нива") позитивних виявили 292 гол., в Кіровоградській області досліджено 193 сироватки крові, із них виявили 19 проб позитивних на трихінельоз. Всього в реакції імуоферментного аналізу було досліджено 1723 проби сироваток крові свиней. При цьому виявили 340 позитивних проб у ІФА з розробленим набором

Компоненти набору Тест-системи для прижиттєвої діагностики трихінельозу перевірялась на специфічність та стабільність з гетерологічними сироватками від хворих свиней на ехінокоз, аскаридоз, саркоцистоз та імунними сироватками проти класичної чуми свиней, ентеновірусний гастроентерит свиней (ЕВГС), трансмісивний гастроентерит свиней (ТГС), хвороби Тешена та бешихи свиней. При цьому одержані стабільні негативні результати

Таким чином, розроблена тест-система для

прижиттєвої діагностики трихинельозу методом імуноферментного аналізу з використанням екскреторно-секреторного трихинельозного антигену, одержаного по методиці розробленій лабораторією діагностики, дає можливість уникнути неспецифічних позитивних реакцій, підвищити діагностичну цінність компонентів набору та спростити їх одержання

Використана література

- 1 Бессонов А С Диагностика трихинеллеза Вильнюс, "Минтис", 1975, -с 383
- 2 Белозеров С Н Гуданавичус Т Н Реакция ферментом меченых антител для диагностики трихинеллеза Ж "Ветеринария", 1982, Изд "Колос" М - С 41-44