



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37758 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61K 39/00  
G01N 21/00  
G01N 33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ІМУНОФЕРМЕНТНА ДІАГНОСТИЧНА ТЕСТ-СИСТЕМА "TRICHINELISO TEST AB" ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО TRICHINELLA SPIRALIS У ССАВЦІВ

1

2

(21) u200808004

(22) 12.06.2008

(24) 10.12.2008

(46) 10.12.2008, Бюл.№ 23, 2008 р.

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

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

(57) 1. Імуноферментна діагностична тест-система  
"Trichineliso test AB" для виявлення антитіл до

Trichinella spiralis у різних видів ссавців, яка вклю-  
чає планшет або пластиковий ґребінець, набір  
реагентів для імуноферментного аналізу, яка **від-  
різняється** тим, що як реагент застосовують іму-  
нопероксидазний кон'югат, а саме пероксидазний  
кон'югат на основі білка G, отриманий згідно стан-  
дартної методики періодатного окислення, по  
Вілсону-Накане.

2. Імуноферментна діагностична тест-система за  
п. 1, яка **відрізняється** тим, що як зразки для до-  
слідження крім сироваток крові та молока тварин  
може братись міжм'язова рідина (сукровиця).

Корисна модель належить до імунохімії та ве-  
теринарної медицини і може бути використана для  
діагностики трихінельозу у ссавців.

Трихінельоз - гельмінтозна хвороба тварин і  
людей, збудником якої є живородна нематода ро-  
ду Trichinella. Статевозрілі гельмінти паразитують  
у кишечнику людей і тварин, а личинкова стадія - у  
поперечно-посмугованих м'язах. Сприйнятливі до  
трихінельозу - свині, коні, собаки, коти, дикі каба-  
ни, ведмеді, вовки, лисиці, борсуки, щурі, їжаки та  
інші всеїдні та м'ясоїдні ссавці, а також люди. Ос-  
новними факторами передачі трихінельозу людині  
є уражена личинками трихінел свинина (м'ясо,  
сало, інші продукти забою) та конина.

Тварини заражаються при поїданні інвазова-  
ного личинками трихінел м'яса та не незаражених  
продуктів забою свиней (обрізки, кухонні відходи,  
субпродукти), коней, тушок хутрових звірів, а також  
інвазованих трупів собак, котів, щурів та інших  
гризунів. Розповсюдженню інвазії сприяють не  
обладнані скотомогильники, звалища, занедбані  
території ферм, населених пунктів.

У шлунково-кишковому каналі тварин через 2-  
4 доби після вживання інвазованого м'яса личинки  
стають статевозрілими, самки живуть 28-45 діб.  
Кожна самка за цей період народжує середньому

1500-2000 личинок, які мігрують з током крові і  
лімфи у м'язи діафрагми, язика, жувальні, гортані,  
міжреберні, грудні, м'язи кінцівок та інші м'язи.

Прижиттєвим методом діагностики трихіне-  
льозу є метод імуноферментного аналізу (ІФА) для  
виявлення протитрихінельозних антитіл у тварин.

Важливою особливістю захворювання на три-  
хінельоз є сприятливість до нього майже всіх сса-  
вців, про що свідчить постійна циркуляція збудни-  
ка трихінельозу в природі. В такій ситуації цілком  
ймовірне виникнення спорадичних випадків захво-  
рювання у домашніх тварин.

До цього часу в Україні на трихінельоз прово-  
дилися дослідження тільки шляхом післязайної  
діагностики туш свиней. Дослідження проводилися  
застарілими методами, які є менш чутливими і не  
підлягають електронному протоколюванню ре-  
зультатів. Таку ситуацію повинно було змінити  
впровадження ІФА, але основним недоліком ІФА  
була його видоспецифічність іншими словами,  
тест-система для діагностики свиней передбачала  
дослідження тільки свиней. Сьогодні виникла по-  
треба налагодити серійне виробництво універса-  
льної тест-системи ІФА, яка б дозволила проводи-  
ти аналіз у свиней, коней і м'ясоїдних та інших  
ссавців. Використання цієї тест-системи дозволить

(19) UA (11) 37758 (13) U

проводити дослідження сироваток крові живих тварин та міжм'язової рідини заморожених туш на трихинельоз.

Відома реакція мікропреципітації на живих личинках трихінел [Бессонов А.С. Диагностика трихинеллеза. Вильнюс, "Минтис", 1975, - с.383]. Принцип реакції полягає в тому, що живі личинки чи статевозрілі трихінели, які вміщені в гомологічну імунну сироватку, при температурі 37-40°C виділяють продукти життєдіяльності (секрети і екскрети), котрі преципітуються антитілами імунної сироватки, створюючи преципітати, які чітко видно під мікроскопом.

Негативна сторона методу полягає в тому, що в реакції використовують живих личинок або статевозрілих трихінел, які можуть бути небезпечними для виконавців реакції, трудомісткість їх одержання та зберігання, недостатня специфічність, ефективність та візуальний облік реакції.

Відома реакція ензимом мічених антитіл для діагностики трихинельозу [Белозеров С.Н. Гуданавичус Т.Н. Реакция ензимом меченых антител для диагностики трихинеллеза. Ж. "Ветеринария", 1982, Изд. "Колос" М. - С.41-44]. Принципова схема відтворення цієї реакції полягає в тому, що в лунки мікропланшета для імунологічних досліджень 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, мічених ферментом пероксидазою хрому, субстрат - суміш 0,08%-ий 5-аміносаліцилової кислоти з 0,05%-ого перекису водню у відношенні 9:1. В якості антигену використовується трихинельозний фракціонований антиген, що готується із свіжо-одержаних або ліофілізованих личинок трихінел. Антиген одержують в 2 етапи, спочатку готується цільний екстракт личинок трихінел, потім він фракціонується методом гель-хроматографії на сефадексі G-200.

Створений в процесі постановки реакції комплекс антиген-антитіло виявляється за допомогою кон'югата, що розщеплює субстрат, який характеризується появою темно-коричневого забарвлення, яке може реєструватись візуально по титру дослідних сироваток або за допомогою спектрофотометра, шляхом вимірювання оптичної щільності субстрату.

Описані етапи одержання компонентів для постановки реакції ензимом мічених антитіл, особливо трихинельозного антигену за двома етапами, досить трудомісткі і складні, крім того при використанні фракціонованого антигену при постановці реакції зустрічаються помилково-позитивні результати, реакція недостатньо специфічна, що значно знижує цінність реакції ензимом мічених антитіл при діагностиці трихинельозу.

Найбільш близьким аналогом є «Тест-система на основі імуноферментного аналізу для прижиттєвої ідентифікації антитіл до *Trichinella Spiralis* в сироватці і плазмі крові тварини» [№56971UA, від 15.05.2003, кл. А61К39/00, ТОВ «ЛОГО МЕД»], у цій тест-системі в м'язовій тканині тварини, яка включає набір реагентів для імуноферментного аналізу та концентрований трихинельозний анти-

ген, до лунок полістиролових планшетів де знаходиться адсорбований антиген *Trichinella spiralis* вносять досліджувані зразки сироваток або плазми крові при цьому специфічні до антигену антитіла зв'язуються з антигеном на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло, після відмивання антитіл, що не зв'язались, в лунки планшетів вносять імуноферментний кон'югат, позначений пероксидазою, який зв'язується з комплексами антиген-антитіло, а після інкубації та відмивання непов'язаного кон'югату, в лунки додають субстрат пероксидази перекис водню та хромоген - ортофенілдіамін, пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи 2М розчин сірчаної кислоти, і вимірюють оптичну густину суміші в лунках, яка при довжині хвилі світла 492нм та 620нм пропорційна концентрації специфічних антитіл у досліджуваних зразках.

Недоліком цієї тест-системи її трудомісткість і складність. Дослідження є менш чутливими і не підлягають електронному протоколюванню результатів.

На сьогодні не існує жодної комерційної універсальної тест-системи для визначення антитіл до *Trichinella spiralis* у різних видів ссавців. В основному тест-системи направлені на виявлення антитіл у окремих видів ссавців -свині, коні, м'ясоїдні, гризуни, тощо або людина. 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 *Trichinella spiralis* у різних видів ссавців, що дозволяє виявляти антитіла майже всіх ссавців шляхом сконструйованого пероксидазного кон'югату, завдяки чому система забезпечує виявлення антитіл проти антигенів *Trichinella spiralis* 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. Генотехнологічний (рекомбінантний) білок G був модифікований на відсутність альбуміно-еднального 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-Накане, 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 окислення, 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 трихінелозу 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 антигенами *Trichinella spiralis* та позитивно реагує у ІФА. Отримують в лабораторних умовах згідно з вимогами технологічних інструкцій.

Негативний контроль - сироватка крові тварин, що не містить антитіл до антигенів *Trichinella spiralis*. 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 випускатися 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 розрахунок 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 міжтканинної рідини для досліджень. Шматочок до 20гр замороженого м'яса (м'якоті) кладуть у чашку Петрі та розморожують при кімнатній 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. У 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 двоххвильовому 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 спе-

цифічність не нижче 95% при визначенні методом ІФА з використанням стандартного набору позитивних та негативних сироваток.

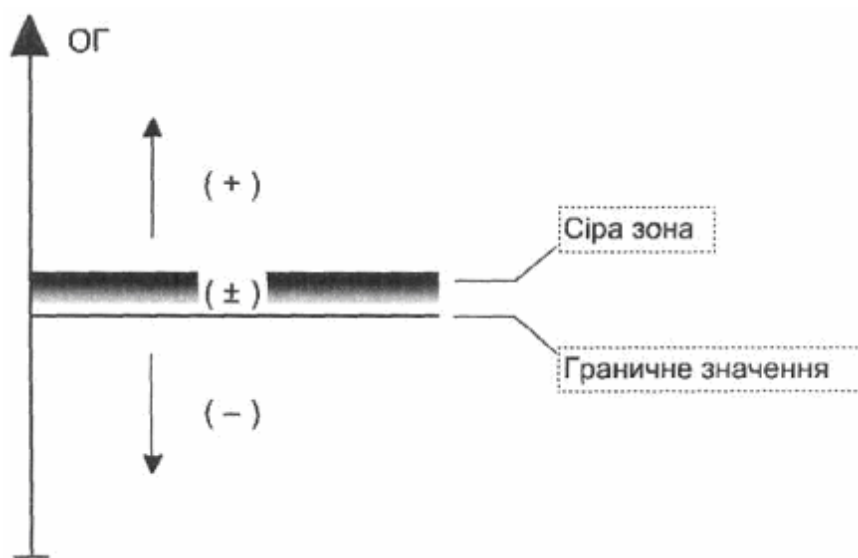
Використовуючи названі тест-системи, досліджували сироватки крові (10 достеменно позитивних сироваток, 10 достеменно позитивних проб міжм'язової та 100 достеменно негативних зразків сироваток). Усі зразки досліджували у чотирьох повторностях кожною тест-системою за описаною методикою. З 20 позитивних зразків наявність антитіл проти *Trichinella spiralis* 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 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 *Trichinella spiralis* 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	Світло-солом'яна опалесцентна рідина
- позитивний контроль (K <sup>+</sup> )	Світло-солом'яна трохи опалесцююча рідина
- негативний контроль (K <sup>-</sup> )	Світло-солом'яна трохи опалесцююча рідина
- хромоген ТМБ	Прозора безбарвна рідина
- концентрат розчину №1	Безбарвна опалесцююча рідина, допускається розшарування та випадіння кристалічного осаду, що розчиняється при температурі (35-37)°C протягом (15-20) хвилин.
- розчин №2	Прозора безбарвна рідина
- розчин №3	Фіолетова трохи опалесцююча рідина
- імуносорбент	Полістироловий суцільний або стріповий планшет або пластиковий гребінець з сорбованим на ньому антигенами <i>Trichinella spiralis</i> , 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 <sup>+</sup> )	0,1 або 0,3
- негативний контроль (K <sup>-</sup> )	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

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 стріповий планшет (6 стріпів 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.