



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2008128640/15**, 14.07.2008(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.07.2008(43) Дата публикации заявки: **20.01.2010**(45) Опубликовано: **10.05.2010** Бюл. № 13(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **RU 2296334 C2**, 27.03.2007. **SU 1545164**
A1, 23.02.1990. **RU 2130615 C1**, 20.05.1999.

Адрес для переписки:

**644001, г.Омск, ул. Лермонтова, 93, ГНУ
ВНИИБТЖ СО Россельхозакадемии**

(72) Автор(ы):

**Ощепков Владимир Григорьевич (RU),
Дюсенова Гульзайра Мухамеджановна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Министерство сельского хозяйства и
продовольствия Омской области (RU),
Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт бруцеллеза и туберкулеза
животных Сибирского отделения
Российской академии сельскохозяйственных
наук (ГНУ ВНИИБТЖ СО
Россельхозакадемии) (RU)****(54) СПОСОБ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии в медицине и ветеринарии. Способ прижизненной диагностики туберкулеза включает выделение полиморфноядерных лейкоцитов, сохранение их в стабилизирующем растворе и определение индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции с

использованием в качестве индуктора «дыхательного взрыва» опсонизированного зимозана, а в качестве дополнительного индуктора - инактивированной вакцины БЦЖ. Изобретение обеспечивает снижение трудоемкости, повышение безопасности и эффективности способа. 2 табл.

RU 2 389 020 C2

RU 2 389 020 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
G01N 33/49 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2008128640/15, 14.07.2008**

(24) Effective date for property rights:
14.07.2008

(43) Application published: **20.01.2010**

(45) Date of publication: **10.05.2010 Bull. 13**

Mail address:

**644001, g.Omsk, ul. Lermontova, 93, GNU
VNIIBTZh SO Rossel'khozakademii**

(72) Inventor(s):

**Oshchepkov Vladimir Grigor'evich (RU),
Djusenova Gul'zajra Mukhamedzhanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Ministerstvo sel'skogo khozjajstva i
prodovol'stvija Omskoj oblasti (RU),
Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie
Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut
brutselleza i tuberkuleza zhivotnykh Sibirskogo
otdelenija Rossijskoj akademii
sel'skokhozjajstvennykh nauk (GNU VNIIBTZh
SO Rossel'khozakademii) (RU)**

(54) METHOD OF LIFE-TIME EXCLUSION OF TUBERCULOSIS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method of life-time exclusion of tuberculosis includes elimination of polymorphonucleocytes, preservation them in stabiliser and determination of induced luminol-related chemical luminescence using opsonised

zymosan as an inductor of "respiratory explosion", and inactivated vaccine of Calmette and Guerin as supplementary inductor.

EFFECT: decrease of labour intensity, improving safety and efficiency of the method.

2 tbl, 2 ex

RU 2 389 020 C2

RU 2 389 020 C2

Изобретение относится к биологии, а именно к разделу иммунологии. Оно может быть использовано для хемилюминесцентного анализа в медицине и ветеринарии, науке, экологии.

Из описанных в литературе близким к изобретению является работа Л.М.Куртасовой, Е.И.Прахина, Н.А.Шакиной, Н.Н.Горбачевой, О.А.Лещенко «Структурно-функциональное состояние иммунной системы у детей раннего возраста, инфицированных микобактериями туберкулеза» (2004), которые изучали структурно-функциональное состояние иммунной системы у детей раннего возраста, инфицированных микобактериями туберкулеза. Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови исследовали в тесте с латексом. Оценку спонтанной и индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции проводили в течение 90 мин на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе CL3604 (Красноярск, Россия), Определяли следующие показатели: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение (I_{max}), площадь кривой (S^2). Регистрацию результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществляли посредством микро-ЭВМ IBM/PC/AT.

В качестве индуктора дыхательного взрыва" использовали опсонизированный зимозан в дозе 2 мг/мл ("Sigma", США). Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, относительно спонтанной оценивали по соотношению $s^2_{зим.} / s^2_{спонт.}$

Недостатками этого метода являются: использование фагоцитарной активности одного типа лейкоцитов - нейтрофилов, использование в качестве индуктора латекса, обладающего неспецифическим стимулирующим действием в отсутствие сывороточных опсонов и низкой дыхательной активностью.

Наиболее близким к изобретению является «Способ прижизненной диагностики туберкулеза» (см. патент РФ №2296334 от 27 марта 2007 г., G01N 33/569). Способ прижизненной диагностики туберкулеза включает выделение полиморфноядерных лейкоцитов, сохранение их в стабилизирующем растворе, определение индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции с использованием в качестве индуктора «дыхательного взрыва» опсонизированного зимозана, отличающийся тем, что в качестве дополнительного индуктора используют специфический туберкулезный антиген в разведении 1:100, представляющий собой специфическую фракцию клеточных стенок микобактерий туберкулеза *M.bovis* штамм 8, дезинтеграцию которых проводят ультразвуком при параметрах 22 кГц, 0,5 А, и при повышении свечения по сравнению с контролем в 3-5 раз диагностируют туберкулез.

Специфичность реакции при данной инфекции обусловлена туберкулезным антигеном. Специфическими являются поверхностные антигены, расположенные в стенках микобактериальных клеток. Детерминанты поверхностных антигенов комплементарно взаимодействуют с сенсibilизированными антителами (Olitzki A.L. et al., 1967).

При приготовлении туберкулезного антигена, определяющего специфичность хемилюминесцентной (ХЛ) реакции, не требуется источник гамма-облучения. Бактериальную массу двухмесячной культуры *M.bovis* штамм 8, выращенную на синтетической среде ВКЛ (Вагенгут, Козловой, Лещинской), осаждали центрифугированием и промывали дистиллированной водой. Суспензию бактериальных клеток бакмассы подвергали ультразвуковой дезинтеграции на аппарате УЗДН-1, фракции отделяли центрифугированием, осадок ресуспендировали и вновь воздействовали УЗДН-1. Осадок отделяли центрифугированием, а из

надосадочной жидкости осаждали протеиновую фракцию. Осадок растворяли в минимальном количестве 0,5%-ного раствора фенола и доводили концентрацию белка до 0,6-0,7 мг/мл.

5 Однако наращивание бактериальной массы - процесс трудоемкий, его длительность 2-3 мес, работа с живой культурой патогенных микобактерий представляет определенную опасность для исследователя, что является недостатком этого метода.

10 Задачей изобретения является снижение трудоемкости способа, повышение безопасности и эффективности путем использования в качестве специфического индуктора инактивированной вакцины БЦЖ.

Способ осуществляют следующим образом: проводят забор крови; выделяют полиморфноядерные лейкоциты, добавляют люминол, определяют функциональную активностью лейкоцитов опсонизированным зимозаном, в качестве специфического индуктора используют вакцину БЦЖ инактивированную.

15 Выделение полиморфноядерных лейкоцитов путем гипотонического лизиса эритроцитов дистиллированной водой с последующим центрифугированием и отмыванием выделенных лейкоцитов 1-кратным раствором Хэнкса без фенолового красного, трилоном Б (см. патент РФ №2232395 от 10 июля 2004 г.).

20 Суспензию полученных отмывших лейкоцитов ресуспендируют в стабилизирующем растворе (см. патент РФ №2280689 от 27 июля 2006 г.).

25 Определяют жизнеспособность клеток 1% трипановым синим в камере Горяева (90-95%).

Добавляют: раствор люминола;

суспензию лейкоцитов в стабилизирующем растворе с концентрацией лейкоцитов 2 млн в 1 мл;

зимозан опсонизированный;

30 антиген туберкулезный - вакцина БЦЖ инактивированная в стандартном разведении;

стабилизирующий раствор для контроля антигена.

Предлагаемый нами способ позволяет провести прижизненную экспресс-диагностику острой фазы туберкулеза сельскохозяйственных животных хемилюминесцентным (ХЛ) методом в течение 3 часов с момента доставки крови; подготовка компонентов достаточно проста, в качестве дополнительного (специфического) индуктора используется вакцина БЦЖ (инактивированная).

40 Предлагаемый способ диагностики снижает трудоемкость и сокращает процесс подготовки специфического индуктора с 2,5-3 мес (известный способ) до 2 час, снижает материальные затраты в 10-15 раз. Кроме того, предлагаемый способ является более безопасным.

45 Приготовление стабилизирующего раствора. В однократном растворе Хэнкса (К 90 мл дистиллированной воды добавить 10 мл концентрата Хэнкса без фенолового красного) растворить на магнитной мешалке при подогреве не выше 50°C 100 мг сухого бычьего лиофилизованного альбумина, 50 мг глюкозы («хч»).

Приготовление люминола - люминол-гидразид - 3 - фталевой кислоты

50 40 мг люминола растворяют горячим (~100°C) раствором 0,01 Н NaOH. Определяют рН 7,2, доводят общий объем до 20 мл 1-кратным раствором Хэнкса без фенолового красного.

Приготовление опсонизированного зимозана для определения функциональной (фагоцитирующей) активности лейкоцитов крови.

Взвешивают 20 (30, 40) мг зимозана, помещают в мерную колбу, заливают 10-кратным концентратом Хэнкса без фенолового красного (1 мл на 10 мг), кипятят 1 час. Центрифугируют 2 раза по 15 мин при 3000 об/мин. 0, 15 М NaCl опсонизируют нормальной сывороткой (пулом) в термостате 37°C - 30 мин. Центрифугируют, суспендируют осадок в 1-кратном растворе Хэнкса без фенолового красного (1 мг/1 мл).

При высокой активности «дыхательного взрыва» исследуемых лейкоцитов уровень свечения превышает спонтанную хемилюминесценцию в 10 и более раз.

Приготовление дополнительного индуктора инактивированной вакцины БЦЖ.

Исходя из того, что вакцинный штамм БЦЖ имеет филогенетическое родство с патогенными микобактериями, в качестве антигена используют вакцину БЦЖ (Медгамал вакцина Имурон) - производства Государственное учреждение НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН (серия 174, к. 2423, годен до 07. 2008 г., серия 178, к. 2517, годен до 08.2008 г.), инактивированную.

Для получения стандартного разведения сухую вакцину (1 ампула содержит 25 мг лиофилизированной живой бактериальной массы штамма БЦЖ) растворили в 5,0 мл изотонического раствора NaCl, т.е. в 0,2 мл раствора содержится 1 мг сухого вещества.

Для использования в ХЛ-реакции *in vitro* вакцину БЦЖ в стандартном разведении инактивировали автоклавированием при режимах: 1 атм 130-150°C - 2 час и 2 атм 130-150°C - 1 час. Контрольный посев инактивированной вакцины на питательные среды Левенштейна-Йенсена и ФАСТ-3Л показал отсутствие роста культуры при вышеуказанных режимах инактивации.

Предварительно в РСК провели проверку специфической активности различных разведений вакцины БЦЖ. В качестве эталона (контроля) использовали показатели аналогичной титрации в РСК антигена ВНИИБТЖ.

Титрация туберкулезного антигена (вакцина БЦЖ)							Таблица 1
стандартное разведение БЦЖ	1:10	1:20	1:40	1:60	1:80	1:100	1:120
++	+	-	-	-	-	-	-

Из таблицы 1 видно, что оптимальным разведением является стандартное разведение вакцины БЦЖ, применяемое для вакцинации *in vivo* и способное индуцировать ХЛ реакцию *in vitro*.

Пример 1. Изучение диагностической эффективности хемилюминесцентного (ХЛ) метода в условиях эксперимента с использованием в качестве специфических индукторов вакцины БЦЖ (живой), вакцины БЦЖ (инактивированной).

В эксперименте на морских свинках провели сравнительную оценку активности специфических антигенов, находящихся на поверхности цельных клеток микобактерий вакцинного штамма БЦЖ (живой), вакцинного штамма БЦЖ (инактивированной) и молекулярного антигена ВНИИБТЖ (Аг), выделенного из клеточной стенки патогенного штамма 8 M.bovis. В качестве предлагаемого специфического индуктора взята вакцина БЦЖ инактивированная, прототип - антиген ВНИИБТЖ (патент №2296334 от 27 марта 2007 г., G01N 33/569).

Для проведения эксперимента сформировали 2 группы животных: 1-я группа - морские свинки массой 250 - 300 г (15 гол.) - опытная - подкожно заражена культурой M.bovis шт.14 в дозе 0,001 мг в 1 мл растворителя,

2-я группа (5 гол.) - контрольная. Контрольным животным вводили физиологический раствор в объеме 1 мл.

Результаты представлены в табл.2.

Таблица 2

Абсолютные значения максимальных показателей ХЛ лейкоцитов морских свинок, экспериментально зараженных *M.bovis* шт.14, при стимуляции антигенами (вакцина БЦЖ живая, вакцина БЦЖ инактивированная), (имп./сек)

Опытная группа	Прототип антиген ВНИИБТЖ		Вакцина БЦЖ живая		Вакцина БЦЖ инактивированная	
	M±m	P	M±m	P	M±m	P
Сроки взятия крови после заражения:						
3-й день	6882,33±3323,63	0,508	16627,6±9815,9	0,199	7881,3±348,91	0,24
7-й день	14780±4701,74	0,124	9306,8±1109,76	0,092	34936,33±11560,2	0,047
14-й день	23433,16±2669,7	0,21	31608,6±2002,67	0,32	47213±11832,76	0,019
21-й день	38605,5±10,308,4	0,05	43772,5±14110,5	0,09	43371±7978,3	0,005
28-й день	10357±6589,0	0,27	Животные пали	-	16673±1572,0	0,003
Контроль	1514±362		1756±566,0		2040±243,71	

Примечание: *P<0,001 уровень достоверно значимых различий между подопытной и контрольной группами.

Из таблицы 2 видно, что в эксперименте на морских свинках, зараженных *M.bovis* шт.14, при использовании *in vitro* в хемилюминесцентных исследованиях антигенов - прототипа (антиген ВНИИБТЖ), вакцины БЦЖ живой, вакцины БЦЖ инактивированной - на 3-й день после заражения увеличение уровня свечения по сравнению с контролем составляет соответственно 4,5; 9,4; 3,8 раза.

На 7-й день после заражения - 9,7; 5,3; 17,1 раза - вакцина БЦЖ инактивированная показала более высокие результаты.

На 14-й день - 15,5; 18,0; 23,1 раза соответственно.

На 21-й день - результаты примерно одинаковые - в 25; 24,9; 21,26 раза превышение уровня свечения лейкоцитов крови опытных животных по сравнению с контролем.

На 28-й день - в 6,8 и 8,17 раза превышение свечения лейкоцитов крови опытных животных по сравнению с контролем.

Таким образом, при хемилюминесцентном исследовании лейкоцитов крови при диагностике туберкулеза индуктор вакцина БЦЖ инактивированная по специфичности не уступает индукторам антигену ВНИИБТЖ и вакцине БЦЖ живой, достоверность БЦЖ инактивированной не снижается.

Учет результатов реакции. Положительной на туберкулез считается проба при превышении уровня хемилюминесцентного свечения исследуемой по сравнению с контролем в 3-5 и более раз.

Общее время постановки реакции на приборе при условии, что компоненты ХЛ реакции подготовлены заранее, а клетки крови выделены непосредственно перед постановкой реакции - не более 3 часов.

Примечание: Абсолютные значения зависят от настройки хемилюминометра к калибровочному источнику.

По окончании экспериментов у опытных (зараженных) животных при патолого-анатомическом исследовании отмечено увеличение селезенки в 4-5 раз, в легких выявлены мелкие крошковатые узелки желтоватого цвета. Взят патологический материал (кусочки печени, селезенки, легких), проведено бактериологическое исследование и выделены исходные заражающие культуры *M.bovis* шт.14.

Таким образом, данные хемилюминесценции лейкоцитов крови подопытных лабораторных животных положительно коррелировали с бактериологическими данными.

Пример 2. При аллергическом исследовании 1049 коров и нетелей ЗАО «Дружба» Марьяновского района Омской области в октябре 2007 г. положительно реагировали

на ППД-туберкулин 62 гол.

Всем положительно реагирующим на ППД-туберкулин животным дополнительно проведена пальпебральная проба ППД-туберкулином согласно наставлению по диагностике туберкулеза (2002).

5 При хемилюминесцентном (ХЛ) анализе с использованием в качестве специфического индуктора вакцины БЦЖ инактивированной клеток крови 3 коров (инв. №32043, 3158, 1030), давших положительную реакцию на пальпебральную пробу, результат - отрицательный, превышения уровня свечения исследованной пробы по
10 сравнению с контролем не наблюдали. При комиссионном убое проведена патолого-анатомическая экспертиза туш 3 коров, давших положительную реакцию на пальпебральную пробу. Изменений, характерных для туберкулеза, в органах не обнаружено. Проведены бактериологические исследования биоматериала от этих
15 животных с применением традиционных питательных сред Левенштейна-Йенсена, Гельберга, ФАСТ-3Л. Возбудителей туберкулеза бычьего, человеческого и птичьего видов не выделено. Биопробы на морских свинках - отрицательные.

Таким образом, по результатам комплексных диагностических исследований подтверждено благополучие ферм ЗАО «Дружба» по туберкулезу крупного рогатого
20 скота.

Экономическая эффективность. За 2007 г. по результатам исследований и внедрения новых методов, включая ХЛ-метод дифференциальной диагностики, в ЗАО «Дружба» для дальнейшего хозяйственного использования сохранено 104 гол. крупного рогатого скота.

25 По данным бухгалтерского учета ЗАО «Дружба» за последние 3 года прибыль от хозяйственного использования одной коровы в год составила: от производства молока 4901 руб., и стоимости телят при рождении 1227 руб., т.е. в общей сумме 6128 руб.

30 Таким образом, годовая чистая прибыль от хозяйственного использования дополнительно сохраненных 104 коров составила 637312 руб. (6128 руб.×104).

Полученные результаты подтверждают теорию фагоцитоза при туберкулезе (А.М.Коваленко с соавт., 2002) - поглотившая микроб клетка реализует свой бактерицидный эффект, в первую очередь, посредством кислородного взрыва, в
35 процессе которого образуются активированные формы кислорода, инициирующие в мембранных структурах возбудителя процесс перекисного окисления липидов с последующим их разрушением. Затем по мере утяжеления инфекционного процесса снижается способность клеток развивать кислородный взрыв при встрече с
40 микобактериями туберкулеза.

Анализ показал, что в отличие от известного способа использование предлагаемого способа прижизненной диагностики туберкулеза снижает трудоемкость и сокращает процесс подготовки специфического индуктора с 2,5-3 мес (известный способ) до 2 час
45 снижает материальные затраты в 10-15 раз. Кроме того, предлагаемый способ является более безопасным, таким образом решает поставленную нами задачу.

Формула изобретения

50 Способ прижизненной диагностики туберкулеза, включающий выделение полиморфно-ядерных лейкоцитов, сохранение их в стабилизирующем растворе, определение индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции с использованием в качестве индуктора «дыхательного взрыва» опсонизированного зимозана, отличающийся тем, что в качестве дополнительного индуктора используют

инактивированную вакцину БЦЖ.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50