



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012138835/10, 10.09.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.09.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.09.2012

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2014 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 20.08.2014 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2356575 C1, 27.05.2009. US,
4839275, 13.06.1989

Адрес для переписки:

344000, г.Ростов-на-Дону, пер. Газетный, 119,
ФБУН РостовНИИ микробиологии и
паразитологии

(72) Автор(ы):

Нагорный Сергей Андреевич (RU),
Васерин Юрий Иванович (RU),
Криворотова Елена Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Ростовский научно-исследовательский
институт микробиологии и паразитологии"
(ФБУН РостовНИИ микробиологии и
паразитологии) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННОГО СОМАТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА *Dirofilaria immitis*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и ветеринарии и касается способа получения очищенного антигена *Dirofilaria immitis*. Представленный способ включает механическую гомогенизацию, центрифугирование гомогената, отбор надосадочной жидкости и использование ее как антигена, при этом для гомогенизации используют головной конец длиной 2 см половозрелой самки *Dirofilaria immitis*, который помещают в 0,25 М водный раствор сахарозы в соотношении 1:3, замораживают при температуре -18°C, проводят механическую гомогенизацию и экстракцию белков в 0,25 М водном растворе сахарозы при 4°C в течение 12 часов, далее

проводят ультразвуковую гомогенизацию супернатанта при 70 кГц 5 раз по 30 секунд с интервалом в 30 секунд в 3 циклах при 0°C, образовавшийся после ультразвуковой гомогенизации супернатант растворяют в охлажденном ацетоне при температуре 0°C в соотношении 1:20 с экспозицией 1 час при температуре 4°C. Представленное изобретение позволяет получить антиген с высокими показателями чувствительности и специфичности и может быть использовано в диагностике диروفилариоза у людей и животных. 2 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 1/14 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012138835/10, 10.09.2012**(24) Effective date for property rights:
10.09.2012

Priority:

(22) Date of filing: **10.09.2012**(43) Application published: **20.03.2014** Bull. № 8(45) Date of publication: **20.08.2014** Bull. № 23

Mail address:

**344000, g.Rostov-na-Donu, per. Gazetnyj, 119,
FBUN RostovNII mikrobiologii i parazitologii**

(72) Inventor(s):

**Nagornyj Sergej Andreevich (RU),
Vaserin Jurij Ivanovich (RU),
Krivorotova Elena Jur'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Rostovskij nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii i parazitologii" (FBUN RostovNII
mikrobiologii i parazitologii) (RU)**(54) **METHOD FOR PRODUCING PURIFIED SOMATIC ANTIGEN OF *Dirofilaria immitis***

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and veterinary science and concerns a method for producing the purified antigen of *Dirofilaria immitis*. The presented method involves mechanical homogenisation, centrifugation of a homogenate, collection of a supernatant to be used as an antigen; the homogenisation involves a 2-cm head end of a mature female of *Dirofilaria immitis* placed in an aqueous solution of saccharose 0.25 M in a ratio of 1:3, frozen at a temperature of -18°C, that is followed by mechanical homogenisation and protein extraction in

the aqueous solution of saccharose 0.25 M at 4°C for 12 hours, wherein 3 cycles of five 30-second ultrasonic homogenisations of the supernatant is performed at 70 kHz every 30 seconds at 0°C; the supernatant prepared after ultrasonic homogenisation is dissolved in cooled acetone at a temperature of 0°C in a ratio of 1:20 with exposition for 1 hour at a temperature of 4°C.

EFFECT: presented invention enables producing the high-sensitivity and specificity antigen and can be used in diagnosis of dirofilariasis in humans and animals.

2 tbl, 1 ex

RU 2 525 688 C2

RU 2 525 688 C2

Изобретение относится к области медицины и ветеринарии, в частности иммунодиагностики дирофиляриоза, и может быть использовано для серодиагностики данного заболевания у человека и животных.

5 Дирофиляриоз является достаточно изученной в ветеринарии проблемой. По отчетным данным ветеринарных служб субъектов юга России, дирофиляриоз занимает лидирующее место в этиологической структуре заболеваемости собак заразными болезнями и стремительно распространяется до северных границ России.

10 Диагностика дирофиляриоза у человека затруднена из-за отсутствия прямых методов исследования. Сердечный дирофиляриоз собак диагностируют микроскопическим методом, основанным на обнаружении микрофилярий в крови. В то же время существуют скрытые формы данного гельминтоза, при котором личинок в крови обнаружить не удастся, в этом случае возникает необходимость использования серологических методов исследования. Отсутствие отечественных иммунологических тестов для проведения серологических исследований делает актуальной разработку
15 способа получения антигена *Dirofilaria immitis*.

Возбудителями дирофиляриоза являются как *D. immitis*, так и *D. repens*, но антиген для целей диагностики должен обладать высокой видоспецифичностью и чувствительностью в связи с разной патогенностью двух видов дирофилярий.

Известен способ получения соматического антигена *D. repens* (RU 2356575 C1, 20 27.05.2009). По данному способу для получения антигена используют неполовозрелые самки гельминта, удаленные у больных людей. Этот способ не может быть использован для получения антигена *D. immitis*, так как на сегодняшний день в РФ не зарегистрировано случаев обнаружения у человека гельминтов вида *D. immitis*. Использование неполовозрелых форм *D. immitis* от собак также проблемно в связи с
25 тем, что неполовозрелые *D. immitis* имеют подкожную локализацию, как и половозрелые самки *D. repens*, а морфологическая видовая дифференциация самок *Dirofilaria* разных видов, удаленных из подкожных тканей собак, очень сложна.

Известен способ получения соматического антигена *D. immitis*, при котором гельминтов помещают в физиологический раствор в соотношении 1:10, измельчают в
30 ступке на холоде до получения однородной массы, проводят экстрагирование белков в течение 24 часов в этом же растворе при 4°C на магнитной мешалке, по окончании экстрагирования гомогенат центрифугируют при 15000 об/мин в течение 30 мин на холоде, осадок удаляют, а супернатант фракционируют гель-хроматографией на колонке 16×70 см (Медведев А.Ю. Распространение дирофиляриоза собак в Краснодарском
35 крае и разработка его диагностики иммуноферментной реакцией // Автореф. дис. канд. вет. наук. М., 2007. - С.8). В данном способе для получения антигена использовали половозрелых самок гельминтов *D. immitis* от собак. Антиген, полученный по данному способу, обладал видоспецифичностью, но при этом имел достаточно высокий процент ложноотрицательных результатов (16%).

40 Целью изобретения является разработка способа получения соматического очищенного антигена *D. immitis* с высокими показателями чувствительности и специфичности.

В предлагаемом способе отделяют и используют головной конец половозрелой самки гельминта *D. immitis* от собак:

45 - учитывая, что в нем содержатся железистые клетки пищевода - стихоциты, которые обладают высокой секреторной активностью (Бритов В.А. Трихинеллы и их использование в медицине. - 2006. - С.56);

- исходя из того, что иммунизирующее воздействие гельминтов может осуществляться

за счет секретов и экскретов, выделяемых в процессе их жизнедеятельности (Шульц Р.С., Гвоздев Е.В. Основы общей гельминтологии. Т. III, Патология и иммунология при гельминтозах. - М., 1976. - С 108).

Способ включает следующие этапы:

5 1. Подготовка половозрелой самки *Dirofilaria immitis* к гомогенизации
Самку *Dirofilaria immitis*, удаленную хирургическим путем из сердца и легочных артерий собак, отмывают многократно физиологическим раствором, отделяют головной конец длиной 2 см и помещают его в 0,25 М водный раствор сахарозы (в соотношении 1:3). Пробу замораживают при температуре -18°C.

10 2. Получение соматического экстракта
Проводят механическую гомогенизацию паразита 5 раз по 30 секунд с интервалом 30 секунд в трех циклах при 0°C. Для дальнейшей экстракции белков гомогенат выдерживают при температуре 4°C в течение 12 часов.

15 Проводят ультразвуковую гомогенизацию супернатанта при 70 кГц 5 раз по 30 секунд с интервалом в 30 секунд в 3 циклах при 0°C.

3. Очистка экстракта в ацетоне

20 Суспензию антигена медленно по каплям добавляют во флакон с охлажденным ацетоном (1 объем суспензии на 20 объемов ацетона) при непрерывном быстром перемешивании при 0°C. Смесь во флаконах выдерживают 1 час в холодильнике при температуре 4°C. Проводят центрифугирование смеси в центрифуге при 2000 об/мин в течение 8 мин при температуре 0°C. Надосадочную жидкость удаляют. Пробирку с осадком высушивают под вакуумом в течение 3 часов при 0°C.

25 К сухому остатку во флаконе добавляют 1 мл фосфатного буфера pH 6,4. Флакон энергично встряхивают в течение 1-2 мин, затем помещают в холодильник при 4°C на 12 часов для полной гидратации препарата.

Раствор центрифугируют при 5000 об/мин в течение 60 минут при температуре 0°C. Надосадочную жидкость используют как антиген.

4. Анализ диагностических свойств соматического очищенного антигена

30 Чувствительность и специфичность полученного антигена определяли в ИФА по общепринятой методике. Полученный антиген использовали в концентрации 8 мкг/мкл в объеме 100 мкл на лунку. Разведение сывороток 1:200.

Пример

Исследование диагностической эффективности в ИФА очищенного соматического антигена *D. immitis* с сыворотками крови животных.

35 В опытах использовали сыворотки крови собак, больных сердечным диروفилариозом (*D. immitis*), собак с микст инвазией *D. immitis* и *D. repens*, свободных от данной инвазии собак и сыворотки крови собак, больных токсокарозом. Кровь всех животных предварительно исследовали на наличие микрофилярий классическим способом.

40 Таблица 1

Диагностическая эффективность ИФА с соматическим очищенным антигеном *D. immitis*

№п.п.	Группы обследованных	Кол-во обследованных	Результаты ИФА				Диагностическая эффективность антигена (%±m)	
			положительный		отрицательный			
			абс.	%±m	абс.	%±m		
45 1.	Собаки, больные диروفилариозом (с микрофиляриемией):	89	83	93,26	6	6,74	чувствительность	93,26
	- <i>D. immitis</i>	41	38	92,68	3	7,32		
	- <i>D. repens</i> и <i>D. immitis</i>	48	45	93,75	3	6,25		
2.	Собаки, свободные от микрофилярий:	61	8	13,11	53	86,89	специфичность	86,89
	- без клинических признаков	31	7	22,58	24	77,42		

дирофиляриоза						
- щенки в возрасте до 5 мес.	21	1	4,76	20	95,24	
- больные токсокарозом	10	-	0	10	100	

Результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют, что чувствительность и специфичность очищенного соматического антигена с сыворотками крови животных составила 93,26% и 86,89% соответственно.

В таблице 2 приведены результаты сравнительных испытаний в ИФА антигенов *D. immitis*, полученных по предлагаемому и приведенным выше способам.

№ п.п.	Антиген <i>D. immitis</i>	Чувствительность	Специфичность
1	полученный по прототипу (Медведев А.Ю., 2007) из целой половозрелой самки <i>D. immitis</i>	84,00%	84,46%
2	полученный по способу, описанному в патенте (RU 23566575) из целой половозрелой самки <i>D. immitis</i>	83,14%	85,24%
3	полученный по предлагаемому способу из головного конца половозрелой самки <i>D. immitis</i>	93,26%	86,89%

Из таблицы 2 (строка 2) видно, что приготовление антигена *D. immitis* из целой половозрелой самки (по Медведеву А.Ю., 2007) с использованием этапов по способу, описанному в предназначенном для получения антигена *D. repens* патенте (RU 23566575), не повышает его специфичность и чувствительность в ИФА по сравнению с антигеном, полученным по способу Медведева А.Ю.

Наиболее высокие результаты чувствительности и специфичности в ИФА получены при исследовании антигена, полученного по предлагаемому способу с использованием головного конца гельминта *D. immitis*.

Таким образом, заявляемый способ обеспечивает получение соматического очищенного антигена *D. immitis* с высокими показателями чувствительности и специфичности.

Формула изобретения

Способ получения очищенного соматического антигена *Dirofilaria immitis*, включающий механическую гомогенизацию, центрифугирование гомогената, отбор надосадочной жидкости и использование ее как антигена, отличающийся тем, что для гомогенизации используют головной конец длиной 2 см половозрелой самки *Dirofilaria immitis*, который помещают в 0,25 М водный раствор сахарозы в соотношении 1:3, замораживают при температуре -18°C, проводят механическую гомогенизацию и экстракцию белков в 0,25 М водном растворе сахарозы при 4°C в течение 12 часов, далее проводят ультразвуковую гомогенизацию супернатанта при 70 кГц 5 раз по 30 секунд с интервалом в 30 секунд в 3 циклах при 0°C, образовавшийся после ультразвуковой гомогенизации супернатант растворяют в охлажденном ацетоне при температуре 0°C в соотношении 1:20 с экспозицией 1 час при температуре 4°C.