



(51) МПК
G01N 33/00 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

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

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2009130585/15**, **11.08.2009**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.08.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **11.08.2009**

(45) Опубликовано: **27.03.2011** Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ДАНЬШИНА М.С. Саркоцистоз сельскохозяйственных животных. - Кишинев: Штиинца, 1986, с.74-79. ЗАЙЦЕВА А.В. Диагностика некоторых гельминтозов, передающихся через мясо и мясные продукты// Ветеринария Кузбасса, №5(178), январь, 2009. Ветеринарные правила по лабораторной диагностике трихинеллеза животных в Республике Беларусь. Утверждено (см. прод.)**

Адрес для переписки:

109316, Москва, ул. Талалихина, 33, МГУПБ, отдел маркетинга и патентной работы

(72) Автор(ы):

**Уша Борис Вениаминович (RU),
 Гламаздин Игорь Геннадьевич (RU),
 Давыдов Евгений Владимирович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет прикладной биотехнологии" (RU)

(54) СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ ТРОФОЗОИТОВ САРКОЦИСТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии. Искусственный желудочный сок составляют по прописи вода дистиллированная температуры 41-42°C - 1000,0 мл, кислота соляная концентрированная удельной массой 1,2-12,0-15,0 мл, пепсин пищевой свиной 20-30 г. Инкубирование проводят в аппарате «Гастрос» при температуре 41-42°C. Перевар отстаивают, после чего осадок подвергают центрифугированию. После этого

из пробирки аспирируют 8,0 мл верхнего слоя жидкости, из нижнего слоя берут каплю и делают мазок на предметном стекле. Оставшуюся часть наносят пипеткой на предметные стекла и высушивают, далее приготовленные препараты окрашивают по Романовскому-Гимза в течение 10 минут и исследуют под микроскопом при увеличении $\times 400$ и $\times 1250$ с иммерсией. Способ удобен и прост в применении, позволяет достоверно обнаруживать трофозоитов саркоцист.

(56) (продолжение):

Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь 16.12.2005, №79. SU 1386169 A1, 07.04.1988. US 2009074818 A1, 19.03.2009.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 415 416** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/00 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2009130585/15, 11.08.2009**

(24) Effective date for property rights:
11.08.2009

Priority:

(22) Date of filing: **11.08.2009**

(45) Date of publication: **27.03.2011 Bull. 9**

Mail address:

**109316, Moskva, ul. Talalikhina, 33, MGUPB,
otdel marketinga i patentnoj raboty**

(72) Inventor(s):

**Usha Boris Veniaminovich (RU),
Glamazdin Igor' Gennad'evich (RU),
Davydov Evgenij Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovaniya
"Moskovskij gosudarstvennyj universitet
prikladnoj biotekhnologii" (RU)**

(54) **METHOD TO DETECT SARCOCYST TROPHOZOITES**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary science.

SUBSTANCE: artificial gastric acid is composed according to prescription: distilled water of temperature 41-42°C - 1000.0 ml, concentrated hydrochloric acid with specific weight of 1.2 - 12.0-15.0 ml, porcine food pepsin 20-30 g. Incubation is carried out in "Gastros" device at the temperature of 41-42°C. Broth is settled, afterwards the residue is centrifuged. Then 8.0 ml of upper fluid level is aspirated from test tube, a drop is taken from lower

level, and a smear is made on slide plate. Remaining part is applied with a dropper onto slide plates and dried, then made preparations are stained according to Romanovskiy-Giemsa for 10 minutes and are investigated under microscope with increase of ×400 and ×1250 with immersion.

EFFECT: method is convenient and simple to use, makes it possible to validly detect sarcocyst trophozoites.

1 ex

RU 2 4 1 5 4 1 6 C 1

RU 2 4 1 5 4 1 6 C 1

Изобретение относится к ветеринарии и может быть использовано для диагностики саркоцистоза и выделения трофозоитов саркоцист из мышц крупного рогатого скота.

Саркоцистоз (саркоспоридиоз) - болезнь, вызываемая простейшими рода *Sarcocystis*. Дефинитивные (основные) хозяева (собаки, кошки, человек) выделяют с калом ооцисты или спороцисты паразита, которые затем проглатываются жвачными животными (промежуточные хозяева). В организме промежуточных хозяев развитие спороцист протекает в два этапа: 1) поражение эндотелия кровеносных сосудов внутренних органов (образование шизонтов); 2) поражение поперечно-полосатой мускулатуры (образование тканевых цист). Тканевые цисты могут быть разного размера: цисты, которые хорошо заметны невооруженным глазом (размером до 1 см), и микроцисты, которые визуальнo не диагностируются. Заражение окончательных хозяев происходит через необезвреженные мясoпродукты больных саркоцистозом животных. В кишечнике собак, кошек, человека паразиты разрушают эпителий и вызывают энтерит. В медицинской литературе описаны случаи обнаружения у человека цист паразита в мышцах, т.е. человек может являться промежуточным хозяином.

В связи с этим актуальным является разработать способы диагностики, позволяющие повысить эффективность обнаружения тканевых цист при малой степени инвазирования мышечной ткани, что необходимо в практической работе для диагностики саркоцистоза и научных исследований с целью определения видов саркоцист.

Известен способ искусственного переваривания мышц, который заключается в следующем: мышцы перед исследованием освобождают от крови, фасции и жира, измельчают их, пропуская через мясорубку или в ступке, предварительно измельчив ножницами. Затем готовят желудочный сок по следующей прописи: пепсина из расчета 3% соляной кислоты - 1%. В подогретой до +37-40°С водопроводной воде вначале растворяют пепсин, затем вносят кислоту. Жидкость тщательно перемешивают, заливают в колбы или стаканы, после чего в желудочный сок помещают измельченные мышцы. На единицу измельченных мышц берут 15-20 единиц искусственного желудочного сока. Затем колбы с содержимым инкубируют в течение 12-34 часов при температуре +37-39°С или 3,5-4,5 часов при температуре +42-47°С, периодически встряхивая. После окончания переваривания, что определяется визуальнo (от мясного фарша остается тонкий коричневый осадок), жидкость из колб выливают в аппарат Бермана или в специальные пробирки для получения осадка. Осадок трижды промывают водой и исследуют каплями на предметном стекле под микроскопом. (С.Н.Никольский, С.А.Позов, Саркоцистозовец, 1980).

Известен способ выделения простейших по методу Владимировой П.А. Измельченные мышцы она вносила в колбы и заливала 15-20-кратным (к весу фарша) количеством искусственного желудочного сока (1%-ным раствором соляной кислоты и 3%-ным пепсина). Инкубирование смеси желудочного сока и мясного фарша проводила при температуре 42-47°С, а осадок после переваривания исследовала в чашке Петри, результат исследования готов через 3,5-4,5 часа [Саркоцистоз сельскохозяйственных животных (Атлас); Академия Наук Молдавской ССР, Ин-т экологической генетики; Кишинев, 1986, с.76].

Наиболее близким к заявленному способу является способ выделения простейших по вышеописанному методу в модификации Рыбалтовского О.В., при котором навеску 2-3 г исследуемой мышцы тщательно измельчают, помещают в плоскодонную колбу и заливают 10-кратным объемом искусственного желудочного сока (в прописи

П. А.Владимировой - 1%-ным раствором соляной кислоты и 3%-ным пепсина). Колбу помещают в термостат при 38-40°C на 1 час. Затем содержимое колбы фильтруют через мелкое ситечко в центрифужные пробирки. Центрифугируют при 1500-2000 об/мин в течение 2-3 минут. Из осадка со дна пробирки пастеровской пипеткой берут 2-3 капли, наносят их на обезжиренные предметные стекла, делают мазки, высушивают и фиксируют спиртом. Красят по Романовскому-Гимза в течение 10 минут. Мазки исследуют под иммерсией. [Там же].

Для выделения подобными способами трофозоитов саркоцист требуется от 1 часа до 4,5 часов. Данный способ трудоемкий, необходимо постоянное участие человека. Приведенный способ не позволяет исследовать весь осадок, полученный в процессе переваривания, что снижает его эффективность.

Задачей изобретения является разработать более эффективный и экономичный метод, сократить время выделения саркоцист и трофозоитов из мяса животных, минимизировать участие человека (в процессе культивирования), повысить эффективность метода за счет исследования большего объема осадка, полученного в результате переваривания.

Поставленная задача решается предлагаемым способом выделения трофозоитов саркоцист, включающем отбор проб мышечной ткани, измельчение, раскладку в колбы, внесение искусственного желудочного сока, инкубирование, центрифугирование, исследование осадка, в котором согласно изобретению искусственный желудочный сок составляют по прописи вода дистиллированная температуры 41-42°C - 1000,0 мл, кислота соляная концентрированная удельной массой 1,2-12,0-15,0 мл, пепсин пищевой свиной 20-30 г, а инкубирование проводят в аппарате «Гастрос» при температуре 41-42°C, после чего осадок подвергают центрифугированию, после этого из пробирки аспирируют 8,0 мл верхнего слоя жидкости, из нижнего слоя берут каплю и делают мазок на предметном стекле, а оставшуюся часть наносят пипеткой на предметные стекла и высушивают, далее приготовленные препараты окрашивают по Романовскому-Гимза в течение 10 минут и исследуют под микроскопом при увеличении $\times 400$ и $\times 1250$ с иммерсией.

Технический результат - более быстрое выделение трофозоитов из микросаркоцист, которые не выявляются визуально и точная диагностика субклинических форм саркоцистоза крупного рогатого скота.

Технический результат поставленной задачи достигается тем, что для выделения инвазионных фрагментов простейших (размер 8-14 мкм длины, 2-4 мкм ширины), паразитирующих в организме крупного рогатого скота, используется аппарат для выделения гельминтов - трихинелл (размер спиралевидных личинок 100 мкм), паразитирующих в организме свиней.

Аппарат «Гастрос» предназначен разработчиком для выделения личинок червей (трихинелл), которые легко локализуются в поперечно-полосатой мускулатуре свиньи. Нами разработан способ с использованием аппарата «Гастрос» для выделения микроструктур простейших, которые локализуются внутри мышечного волокна крупного рогатого скота.

Для выделения трофозоитов изменена пропись искусственного желудочного сока: увеличена концентрация соляной кислоты до 15 мл на 1000 мл воды, увеличены концентрация пепсина пищевого, свиного до 30 г на 1000 мл воды.

В предлагаемом способе процессы переваривания ускоряются, клетки поперечно-полосатой мускулатуры разрушаются, что позволяет трофозоитам выйти из тканевой цисты и оказаться в жидкости перева. Трофозоиты визуализируются после окраски

мазка из перевара по Романовскому-Гимза под микроскопом при увеличении в иммерсионной системе.

Трофозоиты саркоцист при микроскопии имеют банановидную, эллипсоидную или ланцетовидную формы. Один конец трофозоида, где расположено ядро, закруглен, а противоположный несколько сужен и заострен. Длина трофозоитов варьирует от 10 до 16 мкм, а ширина от 2 до 6 мкм. Ядро крупное - занимает 1/3 клетки.

При окраске препаратов по Романовскому-Гимза трофозоиты саркоцист имеют эозинофильную, центральную и базофильную зоны. Обнаружение подобных трофозоитов является основанием для положительного диагноза на саркоцистоз.

Предложенный метод позволяет быстрее, эффективнее и с наименьшей занятостью человека (по сравнению с прототипом) обнаруживать возбудителя (мышечной формы) саркоцистоза в продуктах убоя животных, что позволит не допустить зараженные продукты для питания человека и животных и эффективнее проводить противозооотические мероприятия, направленные на борьбу с саркоцистозом.

Способ осуществляют следующим образом.

Отбирают пробы мышечной ткани, из них готовят групповую пробу массой 50 г и измельчают на мясорубке с диаметром решетки 3-4 мм. Полученный фарш помещают в стакан с сетчатым дном.

Приготавливают искусственный желудочный сок (ИЖС) по прописи:

1. Вода дистиллированная температуры 41-42°C - 1000,0 мл.
2. Кислота соляная концентрированная (удельная масса 1,2) 12,0-15,0 мл.
3. Пепсин пищевой свиной 20-30 г.

Искусственный желудочный сок годен для применения в течение 8 часов с момента приготовления. Культивирование проводят в аппарате «Гастрос» НПО «Петролайзер» (Санкт-Петербург).

При включении аппарата задают температуру 41-42°C, время культивирования 30 минут и отстоя перевара 10 минут.

Искусственный желудочный сок заливают в реактор и аппарат включают в режим прогрева для доведения ИЖС до температуры 41-42°C.

После прогрева в реактор помещают стакан с фаршем и аппарат устанавливают в режим работы, при этом осуществляется постоянное автоматическое перемешивание пробы и поддержание выбранной температуры. По истечении 30 минут аппарат отключает культивирование и переходит в режим отстоя перевара.

После отстаивания из реактора сливают осадок (светло-бурого цвета) в объеме 10,0-12,0 мл в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин. После этого из пробирки аспирируют 8,0 мл верхнего слоя жидкости, из остатка берут каплю и делают мазок на предметном стекле, а оставшуюся часть центрифугата наносят на предметное стекло и высушивают.

Приготовленные препараты окрашивают по Романовскому-Гимза в течение 10 минут и исследуют под микроскопом при увеличении $\times 400$ и $\times 1250$ (с иммерсией).

Способ выделения саркоцист иллюстрируется следующими примерами.

Пример.

Отбирают пробы мышечной ткани из пищевода и ножек диафрагмы крупного рогатого скота, из которых готовят групповую пробу массой 50 г и измельчают на мясорубке с диаметром решетки 3-4 мм. Полученный фарш помещают в стакан с сетчатым дном.

Затем готовят ИЖС. Для приготовления ИЖС в 1000,0 мл дистиллированной воды, подогретой до 42°C, растворяют 20 г пепсина свиного и добавляют 12,0 мл

концентрированной соляной кислоты. Полученную таким образом смесь тщательно перемешивают и заливают в аппарат для переваривания.

После этого в аппарат помещают стакан с мясным фаршем. Задают параметры культивирования: температура 41°C, время культивирования 30 минут, время отстоя перева 10 минут. Крышку закрывают и аппарат включают в режим культивирования. После окончания заданного времени аппарат автоматически переводится в режим отстоя и фильтрации.

10,0 мл осадка сливают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 2000 об/мин 10 минут, после этого из пробирки аспирируют 8,0 мл верхнего слоя жидкости, из центрифугата берут каплю и делают мазок на предметном стекле, а оставшуюся часть наносят пипеткой на предметные стекла и высушивают. Затем мазки окрашивают по Романовскому-Гимза в течение 10 минут и исследуют под микроскопом при увеличении $\times 400$ и $\times 1250$ с иммерсией.

Выводы

1. Установлено, что разработанный метод выделения трофозоитов саркоцист из мышц крупного рогатого скота является высокоэффективным и имеет ряд преимуществ по сравнению с прототипом.

2. Показано, что время выделения саркоцист в аппарате «Гастрос» 30 минут.

3. Доказано, что метод может быть использован для группового исследования туш крупного рогатого скота на саркоцистоз, что делает метод более экономичным.

4. Метод позволяет исследовать больший объем осадка по сравнению с прототипом, что повышает эффективность метода.

5. Показано, что процесс диагностики саркоцистоза КРС легко автоматизируется, что минимизирует риск ошибок, связанных с человеческим фактором.

6. Трудоемкие процессы проходят в аппарате «Гастрос» в автоматическом режиме и без участия человека. Участие специалиста необходимо на конечной стадии исследования.

Формула изобретения

Способ обнаружения трофозоитов саркоцист, включающий отбор проб мышечной ткани, измельчение, раскладку в колбы, внесение искусственного желудочного сока, инкубирование, центрифугирование, исследование осадка, отличающийся тем, что искусственный желудочный сок составляют по прописи: вода дистиллированная температуры 41-42°C 1000,0 мл, кислота соляная концентрированная удельной массой 1,2 12,0-15,0 мл, пепсин пищевой свиной 20-30 г, а инкубирование проводят в аппарате «Гастрос» при температуре 41-42°C, перевар отстаивают, после чего осадок подвергают центрифугированию, после этого из пробирки аспирируют 8,0 мл верхнего слоя жидкости, из нижнего слоя берут каплю и делают мазок на предметном стекле, а оставшуюся часть наносят пипеткой на предметные стекла и высушивают, далее приготовленные препараты окрашивают по Романовскому-Гимза в течение 10 мин и исследуют под микроскопом при увеличении $\times 400$ и $\times 1250$ с иммерсией.