



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 5630
(51) G01N 031/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2020/0573.2

(22) 12.06.2020

(45) 04.12.2020, бюл. №48

(72) Шабдарбаева Гульнара Сабыровна; Хусаинов Дамир Микдаатович; Ибажанова Асем Сериковна; Кенжебекова Жулдызай Жакабаевна; Ахметова Гульнази Даулетхановна; Балгимбаева Айжан Ильясовна; Усмангалиева Сымбат Суттибаевна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Тулемисова Жанара Кенесовна; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Алиев Абай Канатович; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Орынханов Канат Аманжолович; Шманов Габдолла Сагинтаевич; Абдулла Айгүл Абдуллақызы

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный аграрный университет»

(56) KZ 31323 A4, 30.06.2016

(54) **СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМОЗА У СОБАК**

(57) Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначена для лабораторной серологической диагностики токсоплазмоза у собак.

Способ серологической диагностики токсоплазмоза у собак, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве

антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностический сенсibilизированный токсоплазменным антигеном, для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных антигеном эритроцитов, мазки высушивают на воздухе и фиксируют охлажденным ацетоном (-5-8°C) в течении 10 секунд, каждый мазок делят восковым карандашом на 6-8 зон, в которые наносят по 1-2 капли в разные зоны из сывороток собак (испытываемые и контрольные) в разведении 1:2 и 1:5, а также по 1 капле комплемента в рабочем разведении, далее мазки с сыворотками инкубируют во влажной камере 30-40 минут при 37-38°C, затем промывают их забуференным физиологическим раствором, мазки высушивают на воздухе и наносят по 1-2 капли антикомплемментарной меченой флуорохромом сыворотки в рабочем разведении, затем помещают их в термостат для инкубирования, по истечении 30-40 минут мазки промывают забуференным физиологическим раствором, высушивают и просматривают под люминесцентным микроскопом под иммерсией.

Способ диагностики токсоплазмоза собак имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики токсоплазмоза, повышается достоверность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 5630

Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначена для лабораторной серологической диагностики токсоплазмоза у собак.

Известен способ диагностики токсоплазмоза у собак, включающий исследование сыворотки крови этих животных путем постановки реакции связывания комплемента (РСК). В основе реакции лежит способность комплемента специфически связываться с комплексами антиген + антитело. Для выявления этой связи в виде лизиса эритроцитов требуется внесение в определенную последовательности дополнительных компонентов (инактивированной гемолитической сыворотки и эритроцитов барана). В реакции участвуют: структурный белок микробной клетки в качестве антигена, сыворотка крови животного с возможными антителами, комплемент, эритроциты барана, гемолитическая сыворотка [Наставление по применению набора для диагностики токсоплазмоза в РСК. Утверждено Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия 04.12.97 (13-7-2/1107)].

Недостатком этой реакции по сравнению с заявленной является многокомпонентность, высокая трудоемкость и долговременность (процесс связывания комплемента должен проводится в течение 16-18 часов), низкая чувствительность и специфичность.

Известен, принятый за прототип, способ диагностики токсоплазмоза у собак, включающий исследование сыворотки крови этих животных путем постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ). Предлагаемая РНИФ выполняется при наличии корпускулярного антигена токсоплазм, нанесенных промышленным путем в лунки предметных стекол, сыворотки исследуемых собаке и антител к иммуноглобулину собаки, меченных флуорохромом. При этом обеспечивается снижение числа компонентов реакции, ее трудоемкости и упрощение выполнения исследований и уменьшение затрат времени на получение результата диагностических исследований [Патент РФ № 2287154. Способ диагностики токсоплазмоза у собак и кошек. Класс МПК⁷ G01N 031/00. (2006.11.10)].

Недостатком этой реакции по сравнению с заявленной является высокая стоимость и низкая чувствительность и специфичность.

Известен, принятый за прототип, способ диагностики токсоплазмоза у собак, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный токсоплазменным антигеном, для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных антигеном эритроцитов, мазки высушивают на воздухе и фиксируют охлажденным ацетоном (-5-8°C) в течении 10 секунд, каждый мазок делят восковым карандашом на 6-8 зон, в которые наносят по 1-2 капли в разные зоны из сывороток собак (испытуемые и контрольные) в разведении 1:2 и 1:5, далее, мазки с сыворотками инкубируют во влажной

камере 30-40 минут при 37-38°C, затем промывают их забуференным физиологическим раствором, мазки высушивают на воздухе и наносят по 1-2 капли антивидовой к иммуноглобулину собак меченной сыворотки в рабочем разведении, снова их помещают в термостат для инкубирования, по истечении 30-40 минут мазки промывают забуференным физиологическим раствором, высушивают и просматривают под люминисцентным микроскопом под иммерсией. [Патент на изобретение РК № 31323. Способ диагностики токсоплазмоза у собак. МПК G01N 33/53 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01). Опубликовано № 16 - 31.08.2017].

Недостатком этого способа, по сравнению с заявленным, является высокая трудоемкость, так как необходимо использовать антивидовую к иммуноглобулину собак меченную сыворотку.

Цель полезной модели - разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа диагностики токсоплазмоза собак.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке более эффективного способа диагностики токсоплазмоза собак.

Технический результат, обеспечиваемый полезной моделью, достигается тем, что диагностику осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный токсоплазменным антигеном, а в качестве индикаторной системы - антикомплемментарная меченая флуорохромом сыворотка.

Пример осуществления способа серологической диагностики токсоплазмоза собак.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные токсоплазменным антигеном, исследуемые сыворотки крови собак, положительные и отрицательные контрольные сыворотки собак, физиологический забуференный раствор, комплемент (сыворотка морской свинки), антикомплемментарная меченая флуорохромом сыворотка и люминисцентный микроскоп.

Для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных токсоплазменным антигеном эритроцитов. Мазки высушивают на воздухе и фиксируют охлажденным ацетоном (-5-8°C) в течении 10 секунд. Каждый мазок делят восковым карандашом на 6-8 зон, в которые наносят по 1-2 капли в разные зоны из сывороток (испытуемые и контрольные) в разведении 1:2 и 1:5, а также по 1 капле комплемента в рабочем разведении. Далее, мазки с сыворотками инкубируют во влажной камере 30-40 минут при 37-38°C, затем промывают их забуференным физиологическим раствором. Мазки высушивают на воздухе и наносят по 1-2 капли антикомплемментарной меченной флуорохромом сыворотки в рабочем разведении и снова их помещают в термостат для инкубирования. По

истечении 30-40 минут мазки снова промывают забуференным физиологическим раствором, высушивают и просматривают под люминесцентным микроскопом под иммерсией.

Обычно наблюдают следующую картину: при отрицательном результате эритроциты светятся тусклым сероватым цветом, или светящихся эритроцитов нет. В препаратах, с положительной реакцией, наблюдается желто-зеленое периферическое свечение эритроцитов. Интенсивность свечения оценивают в крестах:

«4+» - яркая, светящаяся желто-зеленая периферическая люминесценция эритроцитов;

«3+» - отчетливо выраженная достаточно яркая желто-зеленая периферическая люминесценция эритроцитов;

«2+» - неяркая периферическая люминесценция эритроцитов желтого цвета;

«1+» - слабая периферическая люминесценция эритроцитов желто-серого цвета;

«-» - отсутствие специфической люминесценции.

Контролем служит заведомо отрицательная и положительная противотоксоплазменная сыворотка собак.

Для изготовления сенсibilизированных эритроцитов барана используется дезинтеграт токсоплазм. Отмытые токсоплазмы в количестве 10 см³ ресуспендируются в 200 см³ дистиллированной воды и подвергаются обработке ультразвуком при 15-20 КГц в течение 25-30 минут. Затем ультразвуковой лизат центрифугируется при 8-10 тыс. оборотов 5-10 минут, надосадочная жидкость собирается, а осадок ресуспендируется в 200 мл дистиллированной воды, и повторно подвергается обработке ультразвуком до получения гомогенной суспензии (при 15-20 КГц в течение 25-30 минут). Далее ультразвуковой лизат центрифугируется при 8-10 тыс. оборотов 5-10 минут, надосадочная жидкость собирается, а осадок суспендируется в 200 мл дистиллированной воды, и третий раз подвергается обработке ультразвуком до получения гомогенной суспензии (при 15-20 КГц в течение 25-30 минут), с последующим сбором надосадочной жидкости. Такая процедура повторяется четвертый и пятый раз. Собранную надосадочную жидкость объединяют.

Полученный лизат (сенситан) используют для сенсibilизации формализированных эритроцитов. Предварительно до сенсibilизации формализированные эритроциты обрабатываются детергентом - додецилсульфатом натрия в 1%-ной концентрации при температуре 50-60°C в течение 30 мин.

Сенсibilизация формализированных эритроцитов после обработки додецилсульфатом натрия проводится оптимальной дозой сенситана, которая определяется путем титрации его с использованием стандартного образца противотоксоплазменной сыворотки.

Специфичность и активность готового эритроцитарного антигена проверяются путем исследования в РНИФ с отрицательной сывороткой и стандартного образца противотоксоплазменной сыворотки.

Способ диагностики токсоплазмоза собак имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики токсоплазмоза, повышается достоверность исследования.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ серологической диагностики токсоплазмоза у собак, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного диагностикума сенсibilизированного токсоплазменным антигеном, для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных антигеном эритроцитов, мазки высушивают на воздухе и фиксируют охлажденным ацетоном (-5-8°C) в течение 10 секунд, каждый мазок делят восковым карандашом на 6-8 зон, в которые наносят по 1-2 капли в разные зоны из сывороток собак (испытуемые и контрольные) в разведении 1:2 и 1:5, далее мазки с сыворотками инкубируют во влажной камере 30-40 минут при 37-38°C, затем промывают их забуференным физиологическим раствором, мазки высушивают на воздухе и наносят по 1-2 капли индикаторной системы, затем помещают их в термостат для инкубирования, по истечении 30-40 минут мазки промывают забуференным физиологическим раствором, высушивают и просматривают под люминесцентным микроскопом под иммерсией, *отличающийся* тем, что при нанесении испытуемых и контрольных сывороток дополнительно вносят по 1 капле комплемента в рабочем разведении, а в качестве индикаторной системы используют антикомплемментарную меченую флуорохромом сыворотку.