



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 5874
(51) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2020/1100.2

(22) 08.12.2020

(45) 19.02.2021, бюл. №7

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Ибажанова Асем Сериковна; Ахметова Гульнази Даулетхановна; Усмангалиева Сымбат Суттибаевна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Бредихина Елена Константиновна; Бельгибаева Аида Бактыбеккызы; Мейрханова Акмарал Жанибековна; Орынханов Канат Аманжолович; Хасанова Гузель Абдулсатаровна; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Крыкбаев Еркин Алийбекович; Шалхарова Дариха Жаксыбаевна; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Бабалиев Сеит Умерсенович; Алиев Абай Канатович; Жантелиева Лаура Оразақыновна; Джакупова Динара Нурлановна; Ким Станислав Андреевич; Шамеева Улдана Газыевна; Бердикулов Максат Аманбекович; Мухитдинова Гульнара Ергалиевна

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

(56) Золоткова Т.С. Разработка иммунореагентов для реакции непрямой гемагглютинации, их применение в диагностике и изучении эпизоотологии фасциоза крупного рогатого скота: диссертация: 03.00.19.- Кострома, 2002, с.123.

(54) **СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ФАСЦИОЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

(57) Полезная модель относится к ветеринарной медицине, в частности к иммунодиагностике гельминтозов, и может быть использована для серологической диагностики фасциоза крупного рогатого скота.

Способ диагностики фасциоза крупного рогатого скота, включающий взятие крови и её исследование, при этом из крови исследуемого крупного рогатого скота отделяют сыворотку и осуществляют постановку реакции непрямой иммунофлуоресценции, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный фасциозным антигеном, в качестве индикаторной системы антивидовые к иммуноглобулину крупного рогатого скота меченные флуорохромом сыворотки, 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 крупного рогатого скота (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 крупного рогатого скота меченой 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 люминесцентным микроскопом под иммерсией.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке эффективного экспресс- метода диагностики фасциоза крупного рогатого скота.

(19) KZ (13) U (11) 5874

Полезная модель относится к ветеринарной медицине, в частности к иммунодиагностике гельминтозов, и может быть использована для серологической диагностики фасциоза крупного рогатого скота.

Известен способ диагностики фасциоза, постановкой реакции непрямо́й гемагглютинации [Золоткова Татьяна Сергеевна. Разработка иммунореагентов для реакции непрямо́й гемагглютинации, их применение в диагностике и изучении эпизоотологии фасциоза крупного рогатого скота: диссертация ... кандидата ветеринарных наук: 03.00.19.- Кострома, 2002.- 123 с.: ил. РГБ ОД, 61 02-16/116-5.].

Недостатком способа является недостаточная чувствительность способа из-за низкого качества визуальной оценки реакции непрямо́й гемагглютинации (РНГА).

Цель полезной модели – разработка и внедрение в ветеринарную практику эффективного способа прижизненной диагностики фасциоза крупного рогатого скота на основе метода непрямо́й иммунофлуоресценции, с использованием сенсibilизированных эритроцитов барана.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке эффективного экспресс- метода диагностики фасциоза крупного рогатого скота.

Это достигается тем, что в способе постановки реакции непрямо́й иммунофлуоресценции используют в качестве антигена стабилизированный эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный фасциозным антигеном, а в качестве индикаторной системы антивидовую к иммуноглобулину крупного рогатого скота меченную флуорохромом сыворотку.

Пример осуществления этого способа.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные фасциозным антигеном, исследуемые сыворотки крови крупного рогатого скота, положительные и отрицательные контрольные сыворотки крупного рогатого скота, физиологический забуференный раствор, антивидовая к иммуноглобулину крупного рогатого скота люминисцирующая сыворотка и люминисцентный микроскоп.

Получение антигена. Для изготовления антигена используют имагинальную стадию различных видов фасциол. С этой целью паразитов извлекают из пораженной фасциозом печени от вынужденно убитых овец неблагополучного стада после лабораторных исследований фекалий овец и обнаружения яиц паразита по общепринятой методике. Извлечение фасциол из инвазированной печени осуществляют путем рассечения желчных ходов и смывания их в кювету физиологическим раствором хлористого натрия. Полученную массу паразитов отмывают трехкратно стерильным физиологическим раствором хлористого натрия путем центрифугирования при 500 об/мин в течение 7-10 мин. Тегументы половозрелых фасциол гомогенизируют в небольшом объеме фосфатно-

солевого буфера с последующей дезинтеграцией. С целью усиления антигенных свойств фасциолы подвергают обработке ультразвуком при 20-24 кГц в течение 10-15 минут. Полученный лизат (сенситан) после центрифугирования в течение 15 минут при 3000 об/мин используют для сенсibilизации эритроцитов.

Получение танализированных эритроцитов. Раствора танина: 5 мг танина растворяют в 100 мл фосфатно-солевого буфера на физиологическом растворе pH 7,2. Для обработки 2,5% взвеси эритроцитов раствором танина соединяют равные количества взвеси эритроцитов и раствора танина, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Эритроциты отмывают в фосфатно-солевом буфере двукратным центрифугированием при частоте вращения 1500 об/мин в течение 10 мин.

Сенсibilизация танализированных эритроцитов антигеном. Равные объемы 2,5% взвеси танализированных эритроцитов и растворов антигенов соединяют и оставляют в термостате при температуре 37°C на 18 ч. Добавление формалина к суспензии сенсibilизированных эритроцитов в конечной концентрации 1% за один час до окончания сенсibilизации. Диагностикум отмывают центрифугированием. Осадок ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере и трехкратно центрифугируют при частоте вращения 1500об/мин 10 мин, тщательно перемешивая осадок (сенсibilизированные антигенами эритроциты) с раствором ФСБ после каждого центрифугирования. В заключение объем диагностикума доводят до первоначального.

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 (испытываемые 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 крупного рогатого скота меченной 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 люминисцентным 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 люминисценция 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 противфасциозная сыворотка крупного рогатого скота.

Способ диагностики фасциоза крупного рогатого скота имеет следующие преимущества: сокращается время на проведение реакции, значительно удешевляется исследование, повышается достоверность исследования.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ серологической диагностики фасциоза крупного рогатого скота, включающий взятие крови и её исследование, *отличающийся* тем, что из крови исследуемого крупного рогатого скота отделяют сыворотку и осуществляют постановку реакции непрямой иммунофлуоресценции, при этом в качестве антигена используют стабилизированный

эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный фасциозным антигеном, в качестве индикаторной системы антивидовые к иммуноглобулину крупного рогатого скота меченные флуорохромом сыворотки, 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 крупного рогатого скота (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 крупного рогатого скота меченой 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 люминесцентным микроскопом под иммерсией.