



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 5870
(51) G01N 33/569 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2020/1093.2

(22) 08.12.2020

(45) 19.02.2021, бюл. №7

(72) Хусаинов Дамир Микдаатович; Ибажанова Асем Сериковна; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Ахметова Гульнази Даулетхановна; Усмангалиева Сымбат Суттибаевна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Орынханов Канат Аманжолович; Хасанова Гузель Абдулсатаровна; Алиев Абай Канатович; Байдилдаева Инкар Кайратовна; Жантелиева Лаура Оразакыновна; Бельгибаева Аида Бактыбеккызы; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Жаныбекова Үмітжан Бауыржанкызы; Темченко Анастасия Сергеевна; Тұрған Жансая Мақсатқызы; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Мухитдинова Гульнара Ергалиевна; Мыржиева Асем Бекболатовна; Майхин Кыдырбай Тажибаевич; Баймирзаев Бекзат Қайратұлы; Крыкбаев Еркін Алийбекович; Нұрғазы Бану Өміртайқызы

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

(56) KZ 4455, 15.11.2019.

(54) **СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭХИНОКОККОЗА МАРАЛОВ**

(57) Полезная модель относится к области ветеринарии, и предназначена для диагностики ларвального эхинококкоза маралов.

Способ серологической диагностики эхинококкоза маралов, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом

исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностический сенсibilизированный эхинококковым 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 маралов (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 прижизненной диагностики эхинококкоза маралов имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики эхинококкоза, повышается достоверность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 5870

Полезная модель относится к области ветеринарии, и предназначена для диагностики ларвального эхинококкоза маралов.

Известен способ диагностики эхинококкоза, включающий взятие крови и её исследование, при этом для его осуществления берут 0,02 мл эхинококковой жидкости и добавляют 0,08 мл исследуемой крови, инкубируют 2 ч при 37°C и вносят 0,9 мл изотонического раствора хлористого натрия. Далее центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин и в надосадочной жидкости определяют содержание калия, и при превышении содержания калия на 45% и более по сравнению с контролем, не содержащего антигена, диагностируют эхинококкоз. На данный способ получения антигена имеется патент Российской Федерации № 2024874 [Адамбеков Д.А., Морозов В.Л., Акматов Б.А., Бошкоев Ж.Б., Рыскулов Э.Р., Кенжаев М.Г., Мухамеджанов А. Способ диагностики эхинококкоза, Патент РФ № 2024874, Кл. G01N 33/53, 15.12.1994 г.].

Недостатком способа можно считать необходимость постоянного поиска достаточного количества нативного инвазионного материала, получаемого из эхинококковых цист, локализованных на внутренних органах, спонтанно зараженных *Echinococcus granulosus* сельскохозяйственных животных. Получаемый антиген сложно стандартизировать, так как материал для его выделения поступает неоднородный.

Известен способ диагностики эхинококкоза, включающий взятие крови и её исследование путем выявления антител к антигенам эхинококка, основанную на применении фракционированного антигена молекулярной массой 43 кДа, получаемого из цистной жидкости и протосколексов *Echinococcus granulosus*, причем источником паразитарного материала служат спонтанно инвазированные эхинококкозом сельскохозяйственные животные (овцы, крупный рогатый скот). На данный способ получения антигена имеется авторское свидетельство №1363564 1989 года [Клименко В.В., Белозеров С.Н., Шеховцов Н.В. Способ получения эхинококкового диагностического антигена для иммуноферментного анализа, АС № 1363564, 1989 г.].

Недостатком способа также можно считать необходимость постоянного поиска достаточного количества нативного инвазионного материала, получаемого на мясокомбинатах их эхинококкозных цист, локализованных на внутренних органах, спонтанно зараженных *Echinococcus granulosus* сельскохозяйственных животных. Получаемый антиген сложно стандартизировать, так как материал для его выделения поступает неоднородный.

Известен, принятый за прототип, способ диагностики эхинококкоза маралов, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный эхинококкозным 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 маралов (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 маралов 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 люминесцентным микроскопом под иммерсией. [Патент на полезную модель РК № 4455. Способ диагностики эхинококкоза маралов. МПК G01N 33/569 (2006.01). Опубликовано бюл. №46 - 15.11.2019].

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

Цель полезной модели - разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа диагностики эхинококкоза маралов.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке более эффективного способа диагностики эхинококкоза маралов.

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 эхинококкозным антигеном, а в качестве индикаторной системы - антикомплемментарная меченая флуорохромом сыворотка.

Пример осуществления способа серологической диагностики эхинококкоза маралов.

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

Для изготовления сенсibilизированных эритроцитов барана зрелые членики цестоды *Echinococcus granulosus*, наполненные яйцами и содержащие онкосферы, получают от экспериментально зараженных собак. Членики разрушают механическим путем и отмывают яйца путем центрифугирования в физиологическом

растворе поваренной соли при 1000 об/мин в течение 5 минут, дважды. Отмытые яйца *Echinococcus granulosus* последовательно подвергают обработке искусственным желудочным соком (0,35% соляной кислоты, 0,15% пепсина), а затем искусственным кишечным соком (5% едкого натрия, 0,1% панкреатина). При этом на каждые 100 тыс. яиц *Echinococcus granulosus* расходуют по 5 мл, обработку искусственным желудочным соком осуществляют в течение 1,5-2 ч, а кишечным соком 15-20 минут при температуре 37-38°C. После обработки желудочным соком яйца *Echinococcus granulosus* отмывают путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 минут в физиологическом растворе натрия хлорида, а после обработки кишечным соком, освобожденные онкосферы – средой культивирования.

Отмытые онкосферы помещают в среду культивирования, из расчета на 100 тыс. онкосфер 40-50 см³, в которой происходит культивирование в течение 48-50 часов при температуре 37-38°C. Среду культивирования готовят из следующих ингредиентов, мл: нативная сыворотка 2-3-месячных телят, 50 см³ (10%); бензилпенициллина калиевая соль 0,15 см³ (0,5 г сухого вещества разводят в 10 см³ среды 199) – 0,03%; стрептомицина сульфат 0,1 см³ (0,5 г сухого вещества разводят в 10 см³ среды 199) – 0,02 и среда 199 – остальное до 500 см³.

По истечении срока культивирования онкосферы превращаются в протосколексы, количество которых доводят до 2000±100 экземпляров в 1 см³ среды. С целью усиления антигенных свойств протосколексов подвергают обработке ультразвуком при 20-24 кГц в течение 10-15 минут. Устанавливают рН 8,0-9,0 и подвергают ультразвуковой лизат автоклавированию при 1 атмосфере (120°C) в течение 20-30 мин., затем остужают до температуры 18-25°C и подвергают центрифугированию при 8-10 тыс. оборотов в минуту. 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 сенситина, которая определяется путем титрации его с использованием стандартного образца противоэхинококковой сыворотки.

Специфичность и активность готового эритроцитарного антигена проверяются путем исследования в РНГА отрицательной сыворотки и стандартного образца противоэхинококковой сыворотки.

Пример определения оптимальных условий обработки формализированных эритроцитов додецилсульфатом натрия и сенсibilизации их сенситином (липополисахаридобелковый комплекс).

Определение оптимальной концентрации додецилсульфата натрия, требуемой для повышения адсорбционных свойств эритроцитов и получения специфичного и активного эритроцитарного антигена для РНГА, проводится путем обработки 10% взвеси формализированных эритроцитов разными концентрациями (1,0%; 1,5%) додецилсульфата натрия и проверки активности и специфичности в РНГА антигена, полученного путем сенсibilизации эритроцитов, обработанных разными концентрациями указанного детергента.

Оптимальную сенсibilизирующую дозу сенситина, необходимую для получения стандартного антигена для РНГА с оптимальной активностью, определяют путем сенсibilизации формализированных эритроцитов (предварительно обработанных додецилсульфатом натрия) возрастающими дозами сенситина и проверки серологической активности сенсibilизированных эритроцитов (антигена) в РНГА с использованием стандартного образца противоэхинококковой сыворотки. Для сенсibilизации эритроцитов к 1 см³ 5%-ной их взвеси добавляют по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 см³ сенситина.

Антиген, изготовленный путем сенсibilизации эритроцитов, не обработанных додецилсульфатом натрия, обладает низкой активностью. Обработка эритроцитов додецилсульфатом натрия повышает активность эритроцитарного антигена. Наиболее оптимальной для обработки эритроцитов является 1%-ная концентрация додецилсульфата натрия, позволяющая получить эритроцитарный антиген, обладающий достаточно высокой активностью и не дающий неспецифические реакции с негативной сывороткой и физраствором. Наименьшей дозой сенситина, позволяющей получить антиген с достаточно высокой активностью, является 1,0-1,5 см³ его на 1 см³ 5%-ной взвеси формализированных эритроцитов, предварительно обработанных детергентом.

Следовательно, обработка эритроцитов 1,0%-ной концентрацией додецилсульфата натрия и сенсibilизация их, из расчета 1-1,5 см³ сенситина на 1 мл 5%-ной взвеси эритроцитов, позволяет получить специфичный и активный эхинококковый эритроцитарный антиген для непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ).

Для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных эхинококковым 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 компонента 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 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 противоэхинококковая сыворотка маралов.

Способ прижизненной диагностики эхинококкоза маралов имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики эхинококкоза, повышается достоверность исследования.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ серологической диагностики эхинококкоза маралов, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного диагностикума сенсibilизированного эхинококковым 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 маралов (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.