



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 6875  
(51) G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/569 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0944.2

(22) 05.10.2021

(45) 18.02.2022, бюл. №7

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Исламов Есенбай Ибраилович; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Ибажанова Асем Сериковна; Абдуалиева Асем Абдимуратовна; Омарбекова Гульжан Кабылжановна; Буркетбаева Алгуль Нуржаубаевна; Казтаева Ботагоз Кожакановна; Хасанова Гузель Абдулсатаровна; Толымбекова Айжамал Бериковна; Мухпулова Гузалай Алимжановна; Шалхарова Дариха Жаксыбаевна; Онгаркулова Айгуль Ердилдаевна; Махмутов Абзал Касенович; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Бредихина Елена Константиновна; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Турдахунова Айниса Махсатовна; Сигабатов Ельжан Ержанович; Дабыл Болатбек Алмасбекұлы; Мухтарова Элеонора Шавкатқызы; Крыкбаев Еркин Алийбекович

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

(56) KZ 5949 U, 26.03.2021

(54) СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК

(57) Полезная модель относится к ветеринарной медицине, в частности к иммунодиагностике инфекционных болезней собак, и может быть использована для серологической диагностики парвовирусного энтерита собак.

Способ серологической диагностики парвовирусного энтерита собак, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный антиген возбудителя парвовирусного энтерита собак, для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из стабилизированных 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 животных (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 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.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке эффективного экспресс-метода серологической диагностики парвовирусного энтерита собак.

(19) KZ (13) U (11) 6875

Полезная модель относится к ветеринарной медицине, в частности к иммунодиагностике инфекционных болезней собак, и может быть использована для серологической диагностики парвовирусного энтерита собак.

Известен способ серологической диагностики парвовирусного энтерита собак постановкой реакции непрямой гемагглютинации [Галкина Т.С., Глобенко Л.А., Мороз Н.В. Динамика накопления вирусспецифических антител против чумы плотоядных и парвовирусного энтерита при вакцинации собак. Ветеринарная патология. - № 4 (19). 2006.- С. 149-152.

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

Известен, принятый за прототип, способ серологической диагностики парвовирусного энтерита собак, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный антигеном, приготовленным из вируса парвовирусного энтерита собак, 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 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 полезную модель РК № 5949. Способ диагностики парвовирусного энтерита собак. МПК G01N 31/00 (2006.01). Опубликовано - 26.03.2021].

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 серологической диагностики парвовирусного энтерита собак.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке эффективного экспресс-метода серологической диагностики парвовирусного энтерита собак.

Это достигается тем, что в способе постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции используют в качестве антигена стабилизированный

эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный парвовирусным антигеном, а в качестве индикаторной системы – антикомплементарную меченую флуорохромом сыворотку.

Пример осуществления этого способа.

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

Получение антигена. Для выращивания культуры клеток используют первично-трипсинизированную культуру клеток почек собак 1,3-месячного возраста. В качестве ростовой среды применяют среду, содержащую 35-40% 0,5%-ного гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса, по 0,25% среды 199 и "Игла", 10% сыворотки крови крупного рогатого скота и антибиотики (пенициллин 100 ЕД/см<sup>3</sup> и стрептомицин 10 мг на 1 см<sup>3</sup> среды). В качестве поддерживающей используют среду, содержащую 30% 0,5%-ного ГЛАЭ и 70% среды 199.

При получении вируса культуру клеток в матрасах со сформировавшимся монослоем заражают штаммом возбудителя парвовируса собак в дозе 1,0-0,001 ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, затем осуществляют его адсорбцию в течение 1 ч при температуре 37°C. После добавления поддерживающей среды вирус инкубируют в термостате при 37°C до накопления титра инфекционной активности 10<sup>4,5</sup>-10<sup>5</sup> ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. После трехкратного замораживания при -20-40°C и оттаивания при 37°C полученную вируссодержащую культуральную суспензию сливают в одну емкость, добавляют 0,2% формалина для инактивации вируса. С целью усиления антигенных свойств вирус 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 рН 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 sensibilizированных эритроцитов в конечной концентрации 1% за один час до окончания sensibilизации. Диагностикум отмывают центрифугированием. Осадок ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере и трехкратно центрифугируют при частоте вращения 1500об/мин 10 мин, тщательно перемешивая осадок (sensibilizированные 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 sensibilizированных антигеном возбудителя парвовирусного энтерита собак 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, 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 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 сыворотка против парвовирусного энтерита собак.

Способ серологической диагностики парвовирусного энтерита собак имеет следующие преимущества: сокращается время на проведение реакции, значительно удешевляется исследование, повышается достоверность исследования.

### **ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ**

Способ серологической диагностики парвовирусного энтерита собак, включающий исследование сыворотки крови животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного диагностикума sensibilizированного антигеном возбудителя парвовирусного энтерита собак, для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из sensibilizированных 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 животных (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 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 испытываемых и контрольных сывороток дополнительно вносят по 1 капле комплемента в рабочем разведении, а в качестве индикаторной системы используют антикомплемментарную меченую флуорохромом сыворотку.