



ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0940.2

(22) 04.10.2021

(45) 25.02.2022, бюл. №8

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Исламов Есенбай Исраилович; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Ибажанова Асем Сериковна; Ахметова Гульнази Даулетхановна; Усмангалиева Сымбат Суттибаевна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Нұрғазы Бану Өміртайқызы; Амиргалиева Светлана Садуахасовна; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Орынханов Канат Аманжолович; Алиев Абай Канатович; Мухитдинова Гульнара Ергалиевна; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Майхин Кыдырбай Тажибаевич; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Жантелиева Лаура Оразақыновна; Перунов Никита Сергеевич; Кибирова Дильмира Дилмуратовна; Джанабекова Гульмира Кумискалиевна; Крыкбаев Еркин Алийбекович; Мыктыбаева Рая Жаксыгуловна

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

(56) Иванюшин, Б.И. К вопросу о методике приготовления антигена из пироплазм для РСК / Б.И. Иванюшин //Болезни с.-х. животных и птиц, их профилактика и лечение. – Л., 1973.- С 57-62

(54) **СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ПИРОПЛАЗМОЗА КОШЕК**

(57) Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначено для лабораторной серологической диагностики пироплазмоза кошек.

Способ диагностики пироплазмоза кошек, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный пироплазменным антигеном из *Babesia felis*, 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 кошек (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 кошек меченной 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 пироплазмоза кошек имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики пироплазмоза, повышается достоверность исследования.

Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначено для лабораторной серологической диагностики пироплазмоза кошек.

Известен способ диагностики пироплазмоза кошек, включающий микроскопических исследований мазков из периферической крови больных кошек (обнаружение пироплазм в виде грушевидных форм, увеличение полихроматофилов, телец Хауэлла-Джолли, эритроцитов с ядрами и анизоцитоз, эритрофагоцитоз лейкоцитами моноцитарного типа.). [Futter GJ, Belonje PC. Studies on feline babesiosis. 2. Clinical observations. J S Afr Vet Assoc. 1980 Sep; 51(3):143-6..].

Недостатком этого способа диагностики по сравнению с заявленным, является высокая трудоемкость, низкая чувствительность и специфичность.

Известен, принятый за прототип, способ диагностики пироплазмоза, включающий исследование сыворотки крови 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 определенной 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 [Иванюшин, Б.И. К вопросу о методике приготовления антигена из пироплазм для РСК / Б.И. Иванюшин //Болезни с.-х. животных и птиц, их профилактика и лечение. – Л., 1973.- С 57-62.].

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.

Цель изобретения - разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа диагностики пироплазмоза кошек.

Техническая сущность изобретения состоит в разработке более эффективного способа диагностики пироплазмоза кошек.

Это достигается тем, что диагностику осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный пироплазмозным антигеном из *Babesia felis*, а в качестве индикаторной системы антифлуорохромом сыворотку.

Пример осуществления этого способа.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные пироплазмозным антигеном из *Babesia felis*; исследуемые сыворотки

крови кошек; положительные и отрицательные контрольные сыворотки кошек; физиологический забуференный раствор, антивидовая к иммуноглобулину кошек люминесцирующая сыворотка и люминесцентный микроскоп.

Для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных пироплазмозным 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 кошек меченой 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 противопироплазмозная сыворотка кошек.

Для изготовления сенсibilизированных эритроцитов барана используется дезинтеграт пироплазм (*Babesia felis*). Отмытые пироплазмы 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 см³ 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.

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

Способ диагностики пироплазмоза кошек имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики пироплазмоза, повышается достоверность исследования.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ диагностики пироплазмоза кошек, включающий исследование сыворотки крови этих животных, *отличающийся* тем, что исследование

осуществляют постановкой реакции непрямо́й иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного диагностикума сенсibilизированного пироплазменным антигеном из *Babesia felis*, 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 кошек (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 кошек меченой 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.