



## ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0943.2

(22) 04.10.2021

(45) 25.02.2022, бюл. №8

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Исламов Есенбай Исраилович; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Ибажанова Асем Сериковна; Ахметова Гульнази Даулетхановна; Усмангалиева Сымбат Суттибаевна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Нұрғазы Баңу Өміртайқызы; Амиргалиева Светлана Садуахасовна; Орынханов Канат Аманжолович; Алиев Абай Канатович; Махмутов Абзал Касенович; Жантелиева Лаура Оразақыновна; Бредихина Елена Константиновна; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Мухитдинова Гульнара Ергалиевна; Абдуалиева Асем Абдимуратовна; Илахунова Алина Низамдуновна; Ағыбай Дана Амантайқызы; Бабалиев Сеит Умерсенович; Крыкбаев Еркін Алийбекович; Джанабекова Гульмира Кумискалиевна

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

(56) KZ 3577 U, 25.01.2019

(54) СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА ЛОШАДЕЙ

(57) Полезная модель относится к области ветеринарии, в частности к серологической диагностике паразитарных заболеваний, и может быть использована для диагностики хламидиоза лошадей.

Способ диагностики хламидиоза у лошадей, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный хламидиозным 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 лошадей (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.

Способ диагностики хламидиоза лошадей имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики хламидиоза, повышается достоверность исследования.

Полезная модель относится к области ветеринарии, в частности к серологической диагностике паразитарных заболеваний, и может быть использована для диагностики хламидиоза лошадей.

Известен, способ диагностики хламидиоза лошадей, 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 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 [Методические указания по лабораторной диагностике хламидийных инфекций у животных // Утверждены Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России, 30.06.99. № 13-7-2/643.].

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 серологической диагностики хламидиоза лошадей, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямо́й иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный хламидиозным 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 лошадей (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 лошадей 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 иммерсией. [Патент на Полезную Модель РК № 3577. Способ диагностики хламидиоза лошадей. МПК G01N 31/00 (2006.01), A61B 10/00 (2006.01). Опубликовано № 4 - 25.01.2019].

Недостатком этого способа, по сравнению с заявленным, является высокая трудоемкость, так как

необходимо использовать антивидовую к иммуноглобулину лошадей меченую сыворотку.

Цель полезной модели - разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа серологической диагностики хламидиоза лошадей.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке более эффективного способа диагностики хламидиоза лошадей.

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

Пример осуществления способа серологической диагностики хламидиоза лошадей.

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

Для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных хламидиозным 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 (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 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 противохламидиозная сыворотка лошадей.

Для изготовления сенсibilизированных эритроцитов барана используется дезинтеграт хламидий. Производственный Штамм хламидий культивируют в желточном мешке 6-7-суточных развивающихся куриных эмбрионов до биологической активности не менее  $6,0 \lg \text{ЭЛД}_{50}/0,2 \text{см}^3$ , биоматериал суспендируют забуференным физиологическим раствором (ЗБФР) с рН 7,2, гомогенизируют в аппарате Уорринга при 5000 об/мин. в течение 35 мин., проводят ультразвуковую обработку хламидиесодержащей суспензии при частоте 22 КГц и мощности 70-90 Вт/см<sup>2</sup> в течение 5-7 минут. Затем ультразвуковой лизат центрифугируется при 8-10 тыс. оборотов 5-10 минут, надосадочная жидкость собирается, а осадок ресуспендируется в 200 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 противохламидиозной сыворотки.

Способ диагностики хламидиоза лошадей имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики хламидиоза, повышается достоверность исследования.

### **ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ**

Способ диагностики хламидиоза лошадей, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного диагностикума сенсibilизированного хламидиозным 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 лошадей (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.