



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 6898
(51) G01N 33/569 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0935.2

(22) 04.10.2021

(45) 25.02.2022, бюл. №8.

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Исламов Есенбай Исраилович; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Ибажанова Асем Сериковна; Ахметова Гульнази Даулетхановна; Усмангалиева Сымбат Суттибаевна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Нұрғазы Бану Өміртайқызы; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Амиргалиева Светлана Садуахасовна; Орынханов Канат Аманжолович; Алиев Абай Канатович; Махмутов Абзал Касенович; Жантелиева Лаура Оразақыновна; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Бредихина Елена Константиновна; Алсиеуова Диана Ердилдақызы; Джанабекова Гульмира Кумискалиевна; Крыкбаев Еркин Алийбекович; Мыктыбаева Рая Жаксыгуловна

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

(56) SU 1363564 A1, 30.07.1989

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ
ЭХИНОКОККОЗА КОЗ

(57) Полезная модель относится к ветеринарной медицине, в частности к иммунодиагностике антропозоонозов, и может быть использована для диагностики ларвального эхинококкоза коз.

Способ диагностики эхинококкоза коз, включающий взятие крови у исследуемых коз, отделение сыворотки, постановку реакции непрямой иммунофлуоресценции, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный эхинококковым антигеном, в качестве индикаторной системы антивидовая к иммуноглобулину коз меченная флуорохромом сыворотка.

Способ диагностики эхинококкоза коз имеет следующие преимущества: сокращается время на проведение реакции, значительно удешевляется исследование, повышается достоверность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 6898

Полезная модель относится к ветеринарной медицине, в частности к иммунодиагностике антропозоонозов, и может быть использована для диагностики ларвального эхинококкоза коз.

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 диагностически 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* овец и крупного рогатого скота. Получаемый антиген сложно стандартизировать, так как материал для его выделения поступает неоднородный.

Наиболее близким прототипом служит 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 прототипа также можно считать необходимость постоянного поиска достаточного количества нативного инвазионного материала, получаемого на мясокомбинатах их эхинококковых цист, локализованных на внутренних органах, спонтанно зараженных *Echinococcus granulosus* овец и крупного рогатого скота. Получаемый антиген сложно стандартизировать, так как материал для его выделения поступает неоднородный.

Цель полезной модели - разработка и внедрение в ветеринарную практику эффективного способа прижизненной диагностики эхинококкоза коз на основе метода непрямой иммунофлуоресценции, с

использованием сенсibilизированных эритроцитов барана.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке эффективного экспресс-метода диагностики эхинококкоза коз.

Это достигается тем, что в способе постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции используют в качестве антигена стабилизированный эритроцитарный диагностический, сенсibilизированный эхинококковым антигеном, а в качестве индикаторной системы антивидовую к иммуноглобулину коз меченную флуорохромом сыворотку.

Пример осуществления этого способа.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные эхинококковым антигеном, исследуемые сыворотки крови коз, положительные и отрицательные контрольные сыворотки коз, физиологический забуференный раствор, антивидовая к иммуноглобулину коз люминисцирующая сыворотка и люминисцентный 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 осуществляли 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 pH 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 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. 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 коз 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 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 люминесценция эритроцитов;

«3+» - отчетливо выраженная достаточно яркая желто-зеленая периферическая люминесценция эритроцитов;

«2+» - неярко периферическая люминесценция эритроцитов желтого цвета;

«1+» - слабая периферическая люминесценция эритроцитов желто-серого цвета;

«-» - отсутствие специфической люминесценции.

Контролем служит заведомо отрицательная и положительная противоэхинококковая сыворотка коз.

Способ прижизненной диагностики эхинококкоза коз имеет следующие преимущества: сокращается время на проведение реакции, значительно удешевляется исследование, повышается достоверность исследования.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ диагностики эхинококкоза коз, включающий взятие крови и её исследование, **отличающийся** тем, что из крови исследуемых коз отделяют сыворотку и осуществляют постановку реакции непрямой иммунофлуоресценции, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный эхинококковым антигеном, в качестве индикаторной системы антивидовые к иммуноглобулину коз 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 течении 10

секунд, каждый мазок делят восковым карандашом на 6-8 зон, в которые наносят по 1-2 капли в разные зоны из сывороток коз (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 коз 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.