



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 8693  
(51) G01N 31/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2023/0965.2

(22) 28.09.2023

(45) 08.12.2023, бюл. №49

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Ибрагимов Примкул Шолпанкулович; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Нусупова Салтанат Тлектесовна; Сырым Назым Сырымқызы; Кенжебекова Жулдызай Жакабаевна; Джанабекова Гульмира Кумискалиевна; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Амиргалиева Светлана Садуахасовна; Абдуалиева Асем Абдимуратовна; Омарбекова Гульжан Кабылжановна; Сабырбекова Шынар Касеновна; Нұрғазы Бану Өміртайқызы; Акимжан Назым Алтынбекқызы; Бредихина Елена Константиновна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Утебаева Гульмира Нурлановна; Орынханов Канат Аманжолович; Алиев Абай Канатович; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Мусоев Асилбек Маилибоевич; Махмутов Абзал Касенович; Ахметжанова Молдир Нурлановна; Крыкбаев Еркин Алийбекович; Турсынбаев Нұртас Сэбитжанұлы; Таев Арман Багдатович; Кыстаубаева Айгерим Еркиновна; Шылымова Рысхан Бердіқызы; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Айдарбекова Арай Беркимбековна; Алимов Айтбай Айткенович; Ниязбекова Жаннур Нурдилдаевна

(73) Хусаинов Дамир Микдатович

(56) Улугмуратов А.Д. Единый бруцеллезный антиген для РА, РСК и РДСК и способ его получения // Central asian journal of medical and natural sciences / Volume: 02 Issue: 05 | Sep-Oct 2021 ISSN: 2660-4159

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА ОВЕЦ

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

Способ диагностики бруцеллеза овец, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный бруцеллезным 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 овец (испытуемые и контрольные) в разведении 1:2 и 1:5, а также по 1 капле комплемента лошади (сыворотки) 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 антивидовой к комплементу лошади 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 бруцеллеза овец имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики бруцеллеза овец, повышается достоверность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 8693

Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначено для лабораторной серологической диагностики бруцеллеза овец.

Известен, принятый за прототип, способ диагностики бруцеллеза овец, 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 [Улугмуратов А.Д. Единый бруцеллезный антиген для РА, РСК и РДСК и способ его получения // Central asian journal of medical and natural sciences / Volume: 02 Issue: 05 | Sep-Oct 2021 ISSN: 2660-4159.

<https://www.cajmns.centralasianstudies.org/index.php/CAJMNS/article/download/312/293>].

Недостатком этого способа, по сравнению с заявленным, является многокомпонентность, высокая трудоемкость и долговременность (процесс связывания комплемента должен проводиться в течение 16-18 часов), низкая чувствительность и специфичность.

Задача полезной модели - разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа диагностики бруцеллеза овец.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке более эффективного способа диагностики бруцеллеза овец.

Техническим результатом полезной модели является повышение специфичности и активности диагностики бруцеллеза овец.

Это достигается тем, что диагностику осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностиком, сенсibilизированный антигеном из бруцеллез вида мелитензис, в качестве контрольных - позитивную бруцеллезную и негативную сыворотку овец, в качестве испытуемых - сыворотки исследуемых овец, в качестве индикаторной системы - комплемент лошади и антивидовую к комплементу лошади меченную флуорохромом сыворотку.

Пример осуществления этого способа.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные бруцеллезным антигеном; исследуемые сыворотки крови овец; отрицательная и положительная бруцеллезная контрольная сыворотка овец; физиологический забуференный раствор, комплемент лошади (сыворотка лошади), антивидовая к комплементу

лошади люминесцирующая сыворотка и люминесцентный микроскоп.

Для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных бруцеллезным 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 сыворотки лошади (комплемент) 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 антивидовой к комплементу лошади меченной 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 позитивная бруцеллезная сыворотка овец.

Для изготовления сенсibilизированных эритроцитов барана используется дезинтеграт бруцелл (*Brucella melitensis* Rev-1). Бруцеллы в количестве 10 см<sup>3</sup> с концентрацией 40-50 млрд микробных клеток, убивают в автоклаве при 120°C в течение 30 минут. Далее бруцеллы ресуспендируются в 200 см<sup>3</sup> 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 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 бруцеллезной позитивной сыворотки.

Способ диагностики бруцеллеза овец имеет следующие преимущества: сокращается

трудоемкость диагностики бруцеллеза овец, повышается достоверность исследования.

Были проведены производственные испытания различных диагностических методов. Для сравнения, наряду с предлагаемым, сыворотку крови овец исследовали в серологических реакциях: реакции агглютинации (РА) и реакции связывания комплемента (РСК). Исследования проводили на животных неблагополучных по бруцеллезу хозяйств, а также в благополучных хозяйствах. Всего было подвергнуто исследованию 351 голов овец.

Полученные при этом данные приведены в табл.1.

Как видно из данных табл.1, в результате проведенных испытаний установлена более высокая активность и специфичность исследования в РНИФ.

Таблица 1.

Сравнительные данные по диагностической эффективности РБП, РСК и РНИФ

Вид животных	Благополучие хозяйств по бруцеллезу	Количество исследованных проб	Результаты исследования по		
			РНИФ	РА	РСК
Овцы	Неблагополучное	187	14	12	11
Овцы	Благополучное	164	-	-	-

#### **ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ**

Способ диагностики бруцеллеза овец, включающий исследование сыворотки крови этих животных, *отличающийся* тем, что исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного диагностикума сенсibilизированного бруцеллезным антигеном, для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных антигеном эритроцитов, мазки высушивают на воздухе и фиксируют охлажденным ацетоном при -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 баранов-испытуемые и контрольные в разведении 1:2 и 1:5, а также по 1 капле комплемента лошади-сыворотки, 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 комплементу лошади 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.