



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 8694  
(51) G01N 33/50 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/569 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2023/0976.2

(22) 02.10.2023

(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 Сырымкызы; Кенжебекова Жулдызай Жакабаевна; Джанабекова Гульмира Кумискалиевна; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Амиргалиева Светлана Садуахасовна; Абдуалиева Асем Абдимуратовна; Омарбекова Гульжан Кабылжановна; Сабырбекова Шынар Касеновна; Еспанов Жанарбек Узакович; Савина Алина Сергеевна; Егорова Роза Алексеевна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Утебаева Гульмира Нурлановна; Орынханов Канат Аманжолович; Алиев Абай Канатович; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Мусоев Асилбек Маилибоиевич; Майхин Кыдырбай Тажибаевич; Жылкышыбаева Меруерт Мэликовна; Ахметжанова Молдир Нурлановна; Крыкбаев Еркин Алийбекович; Турсынбаев Нұртас Сэбитжанұлы; Ерназарова Сандугаш Туkenовна; Базарбаев Рыскелди Кантореевич; Мухпулова Гузалай Алимжановна; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Ибажанова Асем Сериковна; Ташиева Алия Абдыманасбеккызы; Ниязбекова Жаннур Нурдилдаевна

(73) Хусаинов Дамир Микдатович

(56) Ятусевич, В.М. Жавненко, С.И. Стасюкевич.  
Разработка метода серологической диагностики

гастрофилеза лошадей// Ученые записки ВГАВМ. - Витебск, 1998. - Т. 34. С. 189-190

(54) **СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГАСТРОФИЛЕЗА ЛОШАДЕЙ**

(57) Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначена для серологической диагностики гастрофилеза лошадей.

Задачей полезной модели является разработка и внедрение в ветеринарную практику эффективного способа прижизненной диагностики гастрофилеза лошадей на основе метода непрямой иммунофлуоресценции, с использованием сенсibilизированных эритроцитов барана.

Техническим результатом полезной модели является повышение специфичности и активности диагностики гастрофилеза лошадей.

Способ серологической диагностики гастрофилеза лошадей, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный гастрофилезным антигеном эритроцитарный диагностикум, а в качестве индикаторной системы антивидовую к иммуноглобулину лошадей меченную флуорохромом сыворотку.

Способ диагностики гастрофилеза лошадей имеет следующие преимущества:

повышается активность и специфичность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 8694

Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначена для серологической диагностики гастрофилеза лошадей.

Известен способ диагностики гастрофилеза лошадей, путем патологоанатомического обследования [Шыныбек С., Шабдарбаева Г.С. Диагностика гастрофилеза лошадей// Международная Студенческая Научная Конференция/Междисциплинарный научный форум, 2018. <https://studconf.com/download/571/>].

Недостатком способа является высокая трудоемкость и недостаточная чувствительность способа из-за низкого качества визуальной оценки гастрофилеза лошадей.

Известен, принятый за прототип, способ серологической диагностики гастрофилеза лошадей, включающий исследование сыворотки крови этих в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). [Ятусевич В.М. Жавненко С.И. Стасюкевич. Разработка метода серологической диагностики гастрофилеза лошадей// Ученые записки ВГАВМ. - Витебск, 1998. - Т. 34. С. 189-190. <https://repo.vsavm.by/handle/123456789/10872>].

Недостатком этого способа, по сравнению с заявленным, является недостаточная чувствительность способа из-за низкого качества визуальной оценки РНГА.

Задачей полезной модели является разработка и внедрение в ветеринарную практику эффективного способа прижизненной диагностики гастрофилеза лошадей на основе метода непрямой иммунофлуоресценции, с использованием сенсibilизированных эритроцитов барана.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке эффективного экспресс-метода диагностики гастрофилеза лошадей.

Техническим результатом полезной модели является повышение специфичности и активности диагностики гастрофилеза лошадей.

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

Пример осуществления этого способа.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные гастрофилезным антигеном, исследуемые сыворотки крови лошадей, положительные и отрицательные контрольные сыворотки лошадей, физиологический забуференный раствор, антивидовая к иммуноглобулину лошадей люминисцирующая сыворотка и люминисцентный микроскоп.

Получение антигена. Для изготовления антигена используют личиночную стадию различных видов гастрофилл. С этой целью паразитов извлекают из пораженного гастрофилезом желудка от убойных лошадей. Извлечение гастрофилл из

инвазированного желудка осуществляют путем отсоединения их от стенки желудка и смывания их в кювету физиологическим раствором хлористого натрия. Полученную массу паразитов отмывают трехкратно стерильным физиологическим раствором хлористого натрия путем центрифугирования при 500 об/мин в течение 7-10 мин. Личинки гастрофилл гомогенизируют в небольшом объеме фосфатно-солевого буфера с последующей дезинтеграцией. С целью усиления антигенных свойств гастрофиллы 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 pH 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 сенсibilизированных эритроцитов в конечной концентрации 1% за один час до окончания сенсibilизации. Диагностикум отмывают центрифугированием. Осадок ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере и трехкратно центрифугируют при частоте вращения 1500 об/мин 10 мин, тщательно перемешивая осадок (сенсibilизированные 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 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 (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 лошадей 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 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 выраженная периферическая люминесценция эритроцитов желтого цвета;

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

«-» - отсутствие специфической люминесценции.

Контролем служит заведомо отрицательная и положительная противогастрофилезная сыворотка лошадей.

Способ диагностики гастрофилеза лошадей имеет следующие преимущества: повышается активность и специфичность исследования.

Были проведены производственные испытания различных диагностических методов. Для сравнения, наряду с предлагаемым, сыворотку крови лошадей исследовали в серологических реакциях: реакции связывания комплемента (РСК) и реакции непрямо́й агглютинации (РНГА). Исследования проводили на лошадях неблагополучных по гастрофилезу хозяйств, а также в благополучных хозяйствах. Всего было подвергнуто исследованию 168 голов лошадей. 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 РСК, РНГА и РНИФ

Вид животных	Благополучие хозяйств по гастрофилезу	Количество исследованных проб	Результаты исследования по		
			РНИФ	РНГА	РСК
Лошади	Неблагополучное	76	32	29	27
Лошади	Благополучное	92	-	-	-

### ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ серологической диагностики гастрофилеза лошадей, включающий взятие крови и её исследование, *отличающийся* тем, что из крови исследуемых лошадей отделяют сыворотку и осуществляют постановку реакции непрямо́й иммунофлуоресценции, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностический сенсibilизированный гастрофильным антигеном, в качестве индикаторной системы антивидовые к иммуноглобулину лошадей меченные флуорохромом сыворотки, для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных антигеном эритроцитов, мазки высушивают на воздухе и фиксируют

охлажденным ацетоном  $-5-8^{\circ}\text{C}$  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  $37-38^{\circ}\text{C}$ , затем промывают их забуференным физиологическим раствором, мазки высушивают на воздухе и наносят по 1 -2 капли антивидовой к иммуноглобулину лошади 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.