



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 8695
(51) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2023/0979.2

(22) 03.10.2023

(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; Несипбаева Айгуль Кадировна; Крэкбаев Еркин Алийбекович; Мыктыбаева Рая Жаксыгуловна; Ерназарова Сандугаш Тукеновна; Базарбаев Рыскелди Кантореевич; Нурмухамбетова Анара Баубековна; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Ибажанова Асем Сериковна; Куангалиев Арсений Кайраптович; Ниязбекова Жаннур Нурдилдаевна

(73) Хусаинов Дамир Микдатович

(56) Сивкова Е.Н. Становление и основные достижения ветеринарной динтерологии в Сибири и

на Дальнем востоке// Дис. Кандидат биологических наук. Тюмень, 2010-284 с

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

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

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

Способ диагностики ринэстроза лошадей имеет следующие преимущества:

повышается активность и специфичность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 8695

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

Известен способ диагностики ринэстроза лошадей, путем патологоанатомического обследования и прижизненной диагностики путем осмотра слизистой оболочки носовой полости с помощью рефлектора [Паразитология и инвазионные болезни животных: учеб. для вузов / М.Ш. Акбаев, Ф.И. Василевич, Р.М. Акбаев и др. – М. : Колос С, 2008. – 776 с.].

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

Известен, принятый за прототип, способ аллергической диагностики ринэстроза лошадей, включающий использование водного экстракта из личинок, основанный на ведении 2-3 капель аллергена (0,5%-ный фенолизированный экстракт из личинок оводов) в конъюнктиву глаза.). [Сивкова Е.Н. Становление и основные достижения ветеринарной динтерологии в Сибири и на Дальнем востоке// Дис. Кандидат биологических наук. Тюмень, 2010-284 с.].

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

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

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

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

Это достигается тем, что в способе постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции используют в качестве антигена стабилизированный эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный ринэстрозным 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 ринэстрозным 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 ринэстрозов. С этой целью паразитов извлекают от пораженных

ринэстрозом лошадей тампоном, или смывают 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 ринэстрозов гомогенизируют в небольшом объеме фосфатно-солевого буфера с последующей дезинтеграцией. С целью усиления антигенных свойств ринэстрозы 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 тансibilизированных эритроцитов. Раствора танина: 5 мг танина растворяют в 100 мл фосфатно-солевого буфера на физиологическом растворе рН 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 тансibilизированных эритроцитов антигеном. Равные объемы 2,5% взвеси тансibilизированных эритроцитов и раствора антигена 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+» - неяркая периферическая люминесценция эритроцитов желтого цвета;

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

«-» - отсутствие специфической люминесценции.

Контролем служит заведомо отрицательная и положительная противоринэстрозная сыворотка лошадей.

Способ диагностики ринэстроза 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 непрямой агглютинации (РНГА). Исследования проводили на лошадях неблагополучных хозяйств, а также в благополучных хозяйствах. Всего было подвергнуто исследованию 127 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 ринэстрозу	Количество исследованных проб	Результаты исследования по		
			РНИФ	РНГА	РСК
Лошади	Неблагополучное	63	17	15	14
Лошади	Благополучное	64	-	-	-

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ серологической диагностики ринэстроза 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 ринэстрозным 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.