



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 8731
(51) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2023/0984.2

(22) 04.10.2023

(45) 22.12.2023, бюл. №51

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Ибрагимов Примкул Шолпанкулович; Кенжебекова Жулдызай Жакабаевна; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Абдуалиева Асем Абдимуратовна; Ахметсадыкова Шынар Нурлановна; Омарбекова Гульжан Кабылжановна; Сабырбекова Шынар Касеновна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Утебаева Гульмира Нурлановна; Крыкбаев Еркин Алийбекович; Мыктыбаева Рая Жаксыгуловна; Базарбаев Рыскелди Кантореевич; Нурмухамбетова Анара Баубекновна; Ибажанова Асем Сериковна; Мухпулова Гузалай Алимжановна; Иманбекова Толганай Абдикеримовна; Кулманбетов Куат Датембаевич; Сапаров Аян Анаркулович; Бабаалиев Сеит Умерсенович; Ниязбекова Жаннур Нурдилдаевна; Имангалиев Аскар Кибатович; Шанбаев Бакдаулет Унербекович; Мендыбаева Анара Муратовна; Махашов Едиль; Баймурзаева Маржан Саруаркызы; Мурзатаева Алия Есовна; Тюрина Софья Александровна; Даулетбаева Асель Бухарбайкызы; Кудайбергенова Жадра Нурсапаевна

(73) Хусаинов Дамир Микдатович

(56) Глазунова А.А., Кустикова О.В., Лунина Д.А., Ильясов П.В. Гиподерматоз крупного рогатого скота, диагностика, лечение и профилактика (обзор)//Лечение и профилактика (Том 13, Выпуск 4, 2019).

(54) СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГИПОДЕРМАТОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

(57) Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначена для серологической диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота.

Способ серологической диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный гиподерматозным 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 крупного рогатого скота (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 крупного рогатого скота 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.

Способ серологической диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота имеет следующие преимущества: повышается достоверность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 8731

Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначена для серологической диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота.

Известен способ диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота, путем прижизненной диагностики путем визуального осмотра животных на наличие кожных поражений и желваков методом пальпации [Степанова Е.А. Новый метод диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота // Ветеринарная патология. 2005. № 2. С. 96.].

Недостатком способа является недостаточная чувствительность способа из-за низкого качества визуальной оценки гиподерматоза крупного рогатого скота.

Известен, принятый за прототип, способ диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота путем постановки РПГА). [Глазунова А.А., Кустикова О.В., Лунина Д.А., Ильясов П.В. Гиподерматоз крупного рогатого скота, диагностика, лечение и профилактика (обзор)// Лечение и профилактика (Том 13, Выпуск 4'2019). <https://doi.org/10.31016/19988435-2019-13-4-83-90>].

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

Цель полезной модели - разработка и внедрение в ветеринарную практику эффективного способа прижизненной диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота на основе метода непрямой иммунофлуоресценции, с использованием сенсibilизированных эритроцитов барана.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке эффективного экспресс-метода диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота.

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

Пример осуществления этого способа.

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

Получение антигена. Для изготовления антигена используют личиночную стадию возбудителя гиподерматоза. С этой целью паразитов извлекают от пораженных гиподерматозом крупного рогатого скота путем выдавливания из желваков. Полученную массу паразитов отмывают трехкратно стерильным физиологическим раствором

хлористого натрия путем центрифугирования при 500 об/мин в течение 7-10 мин. Личинки возбудителя гиподерматоза крупного рогатого скота гомогенизируют в небольшом объеме фосфатно-солевого буфера с последующей дезинтеграцией. С целью усиления антигенных свойств личинки возбудителя гиподерматоза крупного рогатого скота подвергаются 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 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 танализированных эритроцитов антигеном. Равные объемы 2,5% взвеси танализированных 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 1500об/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 крупного рогатого скота 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 противогиподерматозная сыворотка крупного рогатого скота.

Способ диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота имеет следующие преимущества: повышается достоверность исследования.

Были проведены производственные испытания различных диагностических методов. Для сравнения, наряду с предлагаемым, сыворотку крови крупного рогатого скота исследовали в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Исследования проводили на крупном рогатом скоте неблагополучных по гиподерматозу хозяйств, а также в благополучных хозяйствах. Всего было подвергнуто исследованию 74 голов крупного рогатого скота. Полученные при этом данные приведены в таблице 1.

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

Таблица 1.

Сравнительные данные по диагностической эффективности РНГА и РНИФ

Вид животных	Благополучие хозяйств по гиподерматозу	Количество исследованных проб	Результаты исследования по	
			РНИФ	РНГА
Крупный рогатый скот	Неблагополучное	36	12	10
Крупный рогатый скот	Благополучное	38	-	-

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ серологической диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота, включающий взятие крови и её исследование, **отличающийся** тем, что из крови исследуемых крупного рогатого скота отделяют сыворотку и осуществляют постановку реакции непрямой иммунофлуоресценции, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный гиподерматозным антигеном, в качестве индикаторной системы антивидовые к иммуноглобулину крупного рогатого скота 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 течение 10 секунд, каждый мазок делят восковым карандашом на 6-8 зон, в которые наносят по 1-2 капли в разные зоны из сывороток крупного рогатого скота (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 крупного рогатого скота 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.