



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 8761
(51) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2023/0962.2

(22) 28.09.2023

(45) 05.01.2024, бюл. №1

(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 Маилибоиевич; Мусаева Гульжан Каленовна; Махмутов Абзал Касенович; Ахметжанова Молдир Нурлановна; Крыкбаев Еркин Алийбекович; Турсынбаев Нұртас Сәбитжанұлы; Таев Арман Багдатович; Мухтарова Элеонора Шавкатқызы; Бектемиров Алихан; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Айдарбекова Арай Беркимбековна; Алимов Айтбай Айткенович; Ниязбекова Жаннур Нурдилдаевна

(73) Хусаинов Дамир Микдатович

(56) Способ определения активности антирабической сыворотки. Методы лабораторной диагностики бешенства. Межгосударственный стандарт ГОСТ 26075 – 2013. ФГУП «Стандартинформ»

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ, ПОЛУЧЕННОЙ ОТ ЛОШАДИ

(57) Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначена для определения активности антирабической сыворотки, полученной от лошади.

Способ определения активности антирабической сыворотки, включающий исследование сыворотки крови лошади-донора, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный рабическим 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 лошадей-продуцентов (испытуемые), а также заведомо позитивную и негативную (контрольные) в разведении 1:2 и 1:5, 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 сыворотке 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.

Способ определения активности антирабической сыворотки, полученной от лошади, имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость определения активности антирабической сыворотки, время на постановку реакции, повышается достоверность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 8761

Полезная модель относится к области ветеринарии и предназначена для определения активности антирабической сыворотки, полученной от лошади.

Известен, принятый за прототип, способ определения активности антирабической сыворотки, включающий исследование сыворотки крови иммунизированных животных путем постановки реакции диффузной преципитации (РДП). В основе реакции лежит способность образовывать преципитат комплекса антиген + антитело на линии соприкосновения. [Методы лабораторной диагностики бешенства. Межгосударственный стандарт ГОСТ 26075 – 2013. ФГУП «Стандартинформ»].

Недостатком этого способа, по сравнению с заявленным, является высокая трудоемкость и долговременность (процесс преципитации должен проводиться в течение 24 часов), низкая чувствительность и специфичность.

Цель полезной модели - разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа определения активности антирабической сыворотки.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке более эффективного способа определения активности антирабической сыворотки, полученной на лошади.

Это достигается тем, что определение активности антирабической сыворотки осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностический антигеном из вакцинного штамма вируса бешенства, например «CVS-11», в качестве контрольных сывороток позитивная и негативная сыворотки полученные от иммунной и неиммунной лошади, в качестве испытуемой - исследуемая сыворотка лошади-донора, в качестве индикаторной системы - антивидовую к сыворотке лошади меченную флуорохромом сыворотку.

Пример осуществления этого способа.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные рабическим антигеном; исследуемая сыворотка крови лошади-донора; отрицательная и положительная антирабическая контрольная сыворотка лошади; физиологический забуференный раствор, антивидовая к сыворотке лошади люминесцирующая сыворотка и люминесцентный микроскоп.

Для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных рабическим 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 (комплемента) 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 12 капли антивидовой к сыворотке 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 антирабическая сыворотка лошади.

Для изготовления сенсibilизированных эритроцитов барана используется дезинтегратор рабического вакцинного штамма (CVS-11).

Выращивание вируса бешенства референтного штамма CVS-11 проводят в культуре ВНК-21 с концентрацией 0.5-0.6 млн. кл/мл с одновременным внесением вируса в дозе 0.10.01 МЛД₅₀/кл в суспензионной среде, содержащей, среду Игла MEM (30%), среду 199 (30%), сыворотку крови крупного рогатого скота (10%), L- цистеин (0,1%), L-аланин (0,1%), L-глутамин (0,1%), гидролизат казеина (0,5%) и солевой раствор Эрла (остальное). Клетки адсорбированы на поверхности полиакриламидных микроносителей, находящиеся в ферментерах реакторного типа при температуре 37°C и постоянном перемешивании содержимого 20 об/мин, и автоматическим поддержанием рН среды в пределах 7.2-7.6. В течение первых трех суток за счет положительно заряженных полиакриламидных микроносителей клетки, находящиеся в питательной среде, заменяют уже зараженные клетки, за счет чего наблюдается повышение концентрации инфицированных клеток до 2.0 - 2.4 млн. клеток/см³, затем постепенная их гибель. Культивирование прекращают, когда жизнеспособных клеток во взвеси остается 18-20%. В суспензионной культуре при посеве в концентрации 500 тыс. клеток на мл. обеспечивает 3-4 кратный прирост популяции на 34 сутки роста. При коэффициенте пересева 1:3 монослой формируется в пристеночных культурах на 2-3 сутки после посева и переживает не более 3-х дней. Культивирование осуществляют при непрерывном перемешивании 20 об/мин. Сбор

вирусной суспензии осуществляется через 72-96 ч. Вирусную суспензию подвергают замораживанию при температуре минус 70°C в течение 20-24 ч. и ультразвуковой дезинтеграции при 15-20 кГц в течение 25-30 мин.

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 антирабической позитивной сыворотки.

Способ определения активности антирабической сыворотки имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость определения активности антирабических сывороток, повышается достоверность исследования.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ определения активности антирабической сыворотки, полученной от лошади, включающий исследование сыворотки крови этих животных

путем постановки серологической реакции *отличающийся* тем, что исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного диагностикума сенсibilизированного рабическим 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 лошадей-продуцентов испытуемые, а также заведомо позитивную и негативную - 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 сыворотке 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.