



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 10404
(51) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2025/0225.2

(22) 14.02.2025

(45) 11.04.2025, бюл. №15

(72) Тюрина Софья Александровна; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Орынханов Канат Аманжолович; Усмангалиева Сымбат Суттибаевна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Джанабекова Гульмира Кумискалиевна; Бредихина Елена Константиновна; Кенжебекова Жулдызай Жакабаевна; Ерназарова Сандугаш Туkenовна; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Хусаинов Дамир Микдатович; Мусоев Асилбек Маилибоевич; Омарбекова Гульжан Кабылжановна; Сабырбекова Шынар Касеновна

(73) Хусаинов Дамир Микдатович

(56) KZ 5875 U, 19.02.2021

(54) **СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ СОБАК**

(57) Полезная модель относится к ветеринарной медицине, в частности к иммунодиагностике инфекционных болезней собак, и может быть использована для серологической диагностики чумы собак.

Задачей полезной модели является разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа прижизненной диагностики чумы собак на основе метода непрямой иммунофлуоресценции, с использованием sensibilizированных эритроцитов барана и комплемента морской свинки.

Задача решается тем, что в способе постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции используют в качестве антигена стабилизированный эритроцитарный диагностикум, sensibilizированный антигеном вируса чумы плотоядных, в качестве контрольных - позитивную противочумную и негативную сыворотку собак, в качестве испытуемых - сыворотки исследуемых собак, в качестве индикаторной системы - комплемент морской свинки и антивидовую к комплементу морской свинки меченную флуорохромом сыворотку.

Способ серологической диагностики чумы собак имеет следующие преимущества: сокращается время на проведение реакции, значительно удешевляется исследование, повышается достоверность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 10404

Полезная модель относится к ветеринарной медицине, в частности к иммунодиагностике инфекционных болезней собак, и может быть использована для серологической диагностики чумы собак.

Известен способ серологической диагностики чумы собак постановкой реакции непрямо́й гемагглютинации [Галкина Т.С., Глобенко Л.А., Мороз Н.В. Динамика накопления вирусспецифических антител против чумы плотоядных и чумы при вакцинации собак. Ветеринарная патология.- № 4 (19). 2006.- С. 149-152.

Недостатком способа является недостаточная чувствительность способа из-за низкого качества визуальной оценки реакции непрямо́й гемагглютинации (РНГА).

Известен способ серологической диагностики чумы собак постановкой реакции непрямо́й иммунофлюоресценции (Патент РК 5875. Способ серологической диагностики чумы собак. МПК7 G01N 33/53, G01N 33/569. Опубликовано. 19.02.2021, бюл. №7).

Недостатком способа является недостаточная чувствительность способа из-за низкого качества визуальной оценки реакции непрямо́й гемагглютинации (РНГА).

Задачей полезной модели является разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа прижизненной диагностики чумы собак на основе метода непрямо́й иммунофлюоресценции, с использованием сенсibilизированных эритроцитов барана и комплемента морской свинки.

Задача решается тем, что в способе постановки реакции непрямо́й иммунофлюоресценции используют в качестве антигена стабилизированный эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный антигеном вируса чумы плотоядных, в качестве контрольных - положительную противочумную и негативную сыворотку собак, в качестве испытуемых - сыворотки исследуемых собак, в качестве индикаторной системы - комплемент морской свинки и антивидовую к комплементу морской свинки меченную флуорохромом сыворотку.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, выражается в разработке эффективного способа серологической диагностики чумы собак.

Пример осуществления этого способа.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные антигеном возбудителя чумы плотоядных, исследуемые сыворотки крови собак, положительная противочумная и отрицательная контрольные сыворотки собак, физиологический забуференный раствор, комплемент морской свинки (сыворотка морской свинки), антивидовая к комплементу морской свинки люминесцирующая сыворотка и люминесцентный микроскоп.

Получение антигена. Вирус чумы плотоядных выращивают в первично-трипсинизированной культуре клеток эмбрионов японских перепелов в ростовой среде, состоящей из 0,5%-ного ГЛА на растворе Хенкса, 25-30% среды 199 и 8-10% сыворотки крупного рогатого скота с добавлением антибиотиков. Вирус вносят в суспензию клеток и выращивают ролерным способом при 37°C. Через 4-6 сут ростовую среду сливают, а культивирование продолжают в поддерживающей среде, включающей 60-70% среды 199 и 30-40% 0,5%-ного ГЛА на растворе Эрла с добавлением антибиотиков. После полного развития ЦПД вирусосодержащую культуральную жидкость сливают, замораживают при температуре минус 10-20°C, оттаивают при комнатной температуре и объединяют с 1%-ным сливом (инфекционная активность полученного вируса чумы плотоядных для культуры клеток эмбрионов японских перепелов должна быть 103-104 ТЦД₅₀/0,5см³). используют среду, содержащую 30% 0,5%-ного ГЛАЭ и 70% среды 199.

После этого полученную вирусосодержащую культуральную суспензию сливают в одну емкость, добавляют 0,2% формалина для инактивации вируса. С целью усиления антигенных свойств вирус 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 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 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 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 (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 морской свинки 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 положительная против чумы плотоядных сыворотка собак.

Способ серологической диагностики чумы собак имеет следующие преимущества: сокращается время на проведение реакции, значительно удешевляется исследование, повышается достоверность исследования.

Были проведены производственные испытания различных диагностических методов. Для сравнения, наряду с предлагаемым, кровь собак исследовали методом РНГА. Исследования проводили на собаках в сравнительном аспекте. Всего было подвергнуто исследованию 37 собак. Полученные при этом данные приведены в табл. 1.

Таблица 1.

Сравнительные данные по эффективности метода РНГА и РНИФ при диагностике чумы собак

Метод исследования	Количество исследованных проб	Реагировали		
		Положительно	Сомнительно	Отрицательно
РНГА	37	6	3	28
РНИФ	37	11	-	26

Как видно из данных табл.1, в результате проведенных испытаний установлена высокая активность и специфичность исследования в РНИФ. Кроме того, РИНФ отличается быстрым получением результатов.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ серологической диагностики чумы собак, включающий взятие крови и её исследование, **отличающийся** тем, что исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного диагностикума сенсibilизированного антигеном, изготовленным из вируса чумы собак, 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 делают восковым карандашом на 6-8 зон, в которые наносят по 1-2 капли в разные зоны из сывороток собак-испытуемые и контрольные в разведении 1:2 и 1:5, а также по 1 капле комплемента морской свинки, 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 морской свинки меченной сыворотки кролика 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.