



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 10406  
(51) G01N 31/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2025/0238.2

(22) 17.02.2025

(45) 11.04.2025, бюл. №15

(72) Ташиева Алия Абдыманасбеккызы (KZ); Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович (KZ); Батанова Жанат Мухаметкалиевна (KZ); Есимбетов Адилбай Тлепович (UZ); Мыктыбаева Рая Жаксыгуловна (KZ); Омарбекова Уржан Жакатаевна (KZ); Орынханов Канат Аманжолович (KZ); Кенжебекова Жулдызай Жакабаевна (KZ); Турганбаева Гульнар Елдесбаевна (KZ); Джанабекова Гульмира Кумискалиевна (KZ); Ерназарова Сандугаш Туkenовна (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ); Мусоев Асилбек Маилибоевич (KZ); Базарбаев Рыскелди Канторевич (KZ); Хусаинов Дамир Микдатович (KZ); Алиев Абай Канатович (KZ); Кулатаев Бейбит Турганбекович (KZ)

(73) Хусаинов Дамир Микдатович (KZ)

(56) KZ 4457 U, 15.11.2019

(54) **СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

Способ серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой

реакции непрямой иммунофлуоресценции, в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностический сенсibilизированный бруцеллезным 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, а также по 1 капле 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 антикомплемментарной меченой флуорохромом 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 серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики бруцеллеза, повышается достоверность исследования.

(19) KZ (13) U (11) 10406

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

Известен способ диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный бруцеллезным 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 крупного рогатого скота (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 меченой 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 люминисцентным микроскопом под иммерсией. [Патент на полезную модель РК № 4457. Способ диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. МПК G01N 31/00 (2006.01). Опубликовано бюл. № 46 - 15.11.2019].

Недостатком этого способа, по сравнению с заявленным, является высокая трудоемкость, так как необходимо использовать антивидовую к иммуноглобулину крупного рогатого скота меченую сыворотку.

Известен, принятый за способ диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум сенсibilизированный бруцеллезным 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 крупного рогатого скота (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 меченой 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

люминисцентным микроскопом под иммерсией. [Патент на полезную модель РК № 4457. Способ диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. МПК G01N 31/00 (2006.01). Опубликовано бюл. № 46 - 15.11.2019].

Недостатком этого способа, по сравнению с заявленным, является высокая трудоемкость, так как необходимо использовать антивидовую к иммуноглобулину крупного рогатого скота меченую сыворотку.

Задачей полезной модели - разработка и внедрение в ветеринарную практику более эффективного способа диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота.

Техническая сущность полезной модели состоит в разработке более эффективного способа диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота.

Технический результат, обеспечиваемый полезной моделью, достигается тем, что диагностику осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), при этом в качестве антигена используют стабилизированный эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный бруцеллезным антигеном, а в качестве индикаторной системы - антикомплемментарная меченая флуорохромом сыворотка.

Пример осуществления способа серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота.

Реакцию ставят на обезжиренном предметном стекле. Для реакции необходимы следующие компоненты: формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные бруцеллезным антигеном, исследуемые сыворотки крови крупного рогатого скота, положительные и отрицательные контрольные сыворотки крупного рогатого скота, физиологический забуференный раствор, комплемент (сыворотка морской свинки), антикомплемментарная меченая флуорохромом сыворотка и люминисцентный микроскоп.

Для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных бруцеллезным 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 (испытываемые и контрольные) в разведении 1:2 и 1:5, а также по 1 капле 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 1-2 капли антикомплемментарной меченой флуорохромом 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 противобруцеллезная сыворотка крупного рогатого скота.

Для изготовления сенсibilизированных эритроцитов барана используется дезинтеграт бруцелл (*Brucella abortus* 19). Бруцеллы в количестве 10 см<sup>3</sup> с концентрацией 40-50 млрд микробных клеток, убивают в автоклаве при 12°C в течение 30 минут. Далее бруцеллы ресуспендируются в 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и подвергаются обработке ультразвуком при 15-20 КГц в течение 25-30 минут. Затем ультразвуковой лизат центрифугируется при 8-10 тыс. оборотов 5-10 минут, надосадочная жидкость собирается, а осадок ресуспендируется в 200 см<sup>3</sup>

дистиллированной воды, и повторно подвергается обработке ультразвуком до получения гомогенной суспензии (при 15-20 КГц в течение 25-30 минут). Далее ультразвуковой лизат центрифугируется при 8-10 тыс. оборотов 5-10 минут, надосадочная жидкость собирается, а осадок суспендируется в 200 мл дистиллированной воды, и третий раз подвергается обработке ультразвуком до получения гомогенной суспензии (при 15-20 КГц в течение 25-30 минут), с последующим сбором надосадочной жидкости. Такая процедура повторяется четвертый и пятый раз. Собранную надосадочную жидкость объединяют.

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 противобруцеллезной сыворотки.

Данные исследования по 52 головам подозрительного по заболеванию крупного рогатого скота бруцеллезом, приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Сравнительные данные по эффективности метода РСК и РНИФ при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота.

Метод исследования	Количество исследованных проб	Реагировали	
		Положительно	Отрицательно
РСК	26	1	25
РНИФ	26	3	23

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

Способ серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота имеет следующие преимущества: сокращается трудоемкость диагностики бруцеллеза, повышается достоверность исследования.

#### **ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ**

Способ серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, включающий исследование сыворотки крови этих животных, при этом исследование осуществляют постановкой реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве антигена стабилизированного эритроцитарного

диагностикума сенсibilизированного бруцеллезным антигеном, для постановки реакции на предметном стекле готовят тонкие мазки из сенсibilизированных антигеном эритроцитов, мазки высушивают на воздухе и фиксируют охлажденным ацетоном при -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 индикаторной системы, 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, *отличающийся* тем, что при нанесении испытуемых и контрольных сывороток дополнительно вносят по 1 капле комплемента в рабочем разведении, а в качестве индикаторной системы используют антикомплементарную меченую флуорохромом сыворотку.