

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042483**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.17**

**(21)** Номер заявки  
**202190262**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2021.02.12**

**(51)** Int. Cl. **A61D 99/00** (2006.01)  
**G01N 33/531** (2006.01)  
**G01N 33/536** (2006.01)  
**G01N 33/96** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ТЕСТИРОВАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У ЖИВОТНЫХ**

---

**(31)** 2020119229

**(32)** 2020.06.03

**(33)** RU

**(43)** 2021.12.31

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ  
"СТАВРОПОЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ" (ФГБОУ ВО  
СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГАУ) (RU)**

**(56)** АГАРКОВ А.В. и др. Механизм иммунобиологической толерантности во время беременности в функциональной системе "мать-плод-новорожденный". Вестник КрасГАУ. май 2020, № 5, с. 119-124

RU-C1-2014606

SU-A1-1773409

WO-A1-2015153102

AU-A1-2006207891

СУПРУН Е.Н. Иммунологическая толерантность: от истории к практике. Аллергология и иммунология в педиатрии, № 3(34), 2013, с. 29-36

SCHWARTZ Ronald H. Historical overview of immunological tolerance. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012, 4(4), a006908

**(72)** Изобретатель:  
**Дмитриев Анатолий Федорович,  
Агарков Александр Викторович,  
Агарков Николай Викторович,  
Онищенко Артем Романович (RU)**

**(57)** Изобретение относится к ветеринарной иммунологии и может быть использовано в клинической практике для диагностики иммунологической толерантности у животных, в частности изобретение относится к способу оценки иммунологической ареактивности в биологической системе "мать-плод-новорожденный" и может использовать иммунологические методы диагностики для выявления различных заболеваний у сельскохозяйственных животных на крупных и мелких животноводческих фермах. Сущность способа тестирования иммунологической толерантности у животных заключается в следующем: производят иммунизацию производителей их же семенем, а затем ставят реакцию агглютинации семени с сывороткой крови потомства в разведении 1:50-1:100, а по степени схожести белков соматических клеток крови и семени устанавливают степень толерантного состояния иммунной системы. Проводят забор от проверяемого производителя семя и накапливают его путем глубокого замораживания в жидком азоте. Для иммунизации семя центрифугируют, осадок сперматозоидов трехкратно промывают физиологическим раствором и снова центрифугируют. Осадок разводят физиологическим раствором в соотношении 1:1 и вводят производителю подкожно, после чего осуществляют оценку выполненной реакции и устанавливают прогноз иммунологической толерантности новорожденного организма.

**B1**

**042483**

**042483**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к ветеринарной иммунологии и может быть использовано в клинической практике для диагностики иммунологической толерантности у животных, в частности изобретение относится к способу оценки иммунологической ареактивности в биологической системе "мать-плод-новорожденный" и может использовать иммунологические методы диагностики для выявления различных заболеваний у сельскохозяйственных животных на крупных и мелких животноводческих фермах.

### Уровень техники

При изучении патентной и научно-технической информации выявлено несколько способов тестирования иммунологической толерантности у животных путем оценки иммунологической реактивности организма.

Известно множество способов оценки иммунологической реактивности, направленных на изучение различных звеньев иммунной системы, осуществляемых как *in vitro*, так и *in vivo* и основанных на выявлении и определении функциональной активности клеток, участвующих в формировании клеточного и гуморального иммунитета, определении иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов, антителозависимой клеточной цитотоксичности, оценке реакций гиперчувствительности замедленного типа, немедленного типа, в частности реакции дегрануляции тучных клеток и базофилов крови.

Однако известные и широко используемые способы оценки иммунологической реактивности макроорганизма не дают полной гарантии и точной оценки индуцированного состояния иммунологической ареактивности к специфическому антигену.

Известен способ определения иммунологической реактивности организма путем воздействия на организм лекарственным веществом (вводят пирогенал в дозе 0,15-0,18 мкг на 1 кг веса) и при повышении температуры до 37,0-37,5°C определяют иммунологическую реактивность в пределах нормы, при 36,6-36,9°C определяют недостаточность иммунологической реактивности (см. а.с. СССР № 1689857, М.Кл.<sup>2</sup> G01N 33/53, 1989 г.). Данный способ имеет ряд недостатков, снижающих его информативность. Так, определяемый показатель температуры тела претерпевает существенные изменения, обусловленные не только физиологическими процессами (испарение влаги с поверхности кожи, вентиляция легких и т.д.), но и неконтролируемыми технологическими параметрами (температура и влажность внешнего воздуха, теплопроводность поверхностей). Высокая вариабельность полученных результатов, также снижает информативность таких параметров для суждения о недостаточности иммунологической реактивности.

Известен способ оценки иммунологической реактивности организма, включающий взятие крови, разделение ее на плазму и форменные элементы (см. а.с. СССР № 1686364, М.Кл.<sup>2</sup> G01N 33/53, 1991 г.). Однако для реализации способа требуется дорогостоящее оборудование и биопрепараты. Кроме того, способ недостаточно информативен, а также сложен.

Известен способ оценки иммунологической реактивности организма, включающий взятие крови, разделение ее на плазму и форменные элементы и определение концентрации иммуноглобулинов и специфических антител в плазме, отличающийся тем, что дополнительно определяют концентрацию иммуноглобулинов А, G, М и специфических сывороточных антител, сорбированных на форменных элементах крови и по соотношению концентраций иммуноглобулинов и специфических сывороточных антител в плазме и сорбированных на форменных элементах крови судят об иммунологической реактивности организма (см. патент РФ № 2126154, М.Кл.<sup>2</sup> G01N 33/53, 1999 г.).

Недостаток данного способа заключается в том, что он применим только в специальных лабораторных условиях с применением методов иммунохимии, что сужает диапазон его полезного использования в полевых условиях. Кроме того, определение концентраций иммуноглобулинов и специфических сывороточных антител в плазме и сорбированных на форменных элементах крови достаточно сложно технически и требует значительных временных затрат, специального оборудования и реактивов.

Известен способ оценки иммунологической реактивности организма, включающий взятие крови, разделение ее на плазму и форменные элементы и определение иммунологических показателей клеток крови, по которым судят о состоянии организма (см. патент РФ № 1813213, М.Кл.<sup>2</sup> G01N 33/53, 1993 г.).

Однако недостатком данного способа является повышенная травматичность, так как отбор крови производится из локтевой вены, что особенно сложно для тяжелобольных и в педиатрической практике. Из-за невозможности проведения анализа после длительного хранения проб исключается проведение скрининговых исследований. Способ недостаточно информативен, так как позволяет определить предрасположенность к небольшому количеству заболеваний, характеризуется низкой пропускной способностью из-за длительности процесса.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому положительному результату, принятый авторами за прототип является способ тестирования иммунологической толерантности у животных, включающий искусственное индуцирование ареактивности к антигену, последующее введение в организм разрешающей дозы антигена и исследование базофилов крови, отличающийся тем, что с целью улучшения способа, исследуют динамику количественных сдвигов циркулирующих в крови базофилов в течение семи суток после однократного внутривенного введения специфического антигена в разведении 1:50-1:100 в количестве 5 мл на 1 кг массы тела и при содержании количественных параметров на уровне до введения антигена тестируют иммунологическую толерантность.

Несмотря на положительные результаты прототипа, его недостатком является диагностика иммунологической толерантности без выявления и определения значений титра антител и не позволяет достоверно установить наличие и степень тяжести толерантного эффекта в функциональной системе "мать-плод-новорожденный". А по одному виду пула клеток-базофилов не представляется возможным оценить степень резвившейся иммунологической ареактивности к специфическому антигену. Предлагаемый способ будет выявлять уже доступные изменения иммунологической реактивности с первых часов жизни у полученного потомства.

### Раскрытие изобретения

Задачей предлагаемого изобретения является разработка способа тестирования иммунологической толерантности у животных, направленного на более релевантную оценку ареактивности особей в раннем возрасте до получения от них потомства.

Техническим результатом изобретения является повышение достоверности лабораторного исследования (неинвазивного пренатального скрининга изоиммунизационных эффектов у потомства) за счет выявления состояния реакции агглютинации между полученной иммунной сывороткой крови потомства и семенем биологического самца производителя. Предлагаемый способ позволяет сформировать группу животных с высоким риском развития иммунологической толерантности.

Технический результат достигается при помощи способа тестирования иммунологической толерантности у животных, при котором с целью оценки иммунологической ареактивности в раннем возрасте производят иммунизацию производителей их же семенем, затем ставят реакцию агглютинации семени со специфической сывороткой крови потомства в разведении 1:50-1:100, а по степени схожести белков соматических клеток крови и семени тестируют степень толерантного состояния иммунной системы

От проверяемого производителя берут семя и накапливают его путем глубокого замораживания в жидком азоте. Для иммунизации семя центрифугируют, осадок сперматозоидов трехкратно промывают физиологическим раствором и снова центрифугируют. Осадок разводят физиологическим раствором в соотношении 1:1 и вводят производителю подкожно.

### Краткое описание чертежей и иных материалов

В таблице приведена схема иммунизации антигеном свиноматок опытной и контрольной групп.

Вид животных	Объем семени (1:1), мл		
	1 инъекция	2 инъекция	3 инъекция
Бараны	4-6	6-8	8-10
Быки	10-12	12-14	14-18
Хряки	5-7	7-9	9-11

### Осуществление изобретения

Примеры конкретного выполнения способа тестирования иммунологической толерантности у животных.

#### Пример 1.

По первому примеру приведены данные (см. таблицу), где указаны объемы семени, впрыскиваемые различным видам животных подкожно. Интервал между 1- и 2-й инъекциями составляет 5 дней, между 2- и 3-й - 7 дней. Через 10 дней после последней инъекции у производителя берут кровь, из которой готовят иммунную специфическую сыворотку. Для постановки реакции агглютинации между активными сперматозоидами и сывороткой крови потомства в 10 пробах делают разбавления сыворотки физиологическим раствором в кратных соотношениях от 1:50 до 1:100, в одиннадцатой - контрольной - физиологическим раствором. Затем сыворотку семенной жидкости центрифугируют с последующей трехкратной промывкой ее физиологическим раствором. Каплю отмытого семени разбавляют 1,5 мл физиологического раствора для получения рабочей смеси. В каждую из 10 проб к сыворотке добавляют одну каплю рабочей смеси и помещают в термостат при 37°C на 30 мин, после чего производят читку реакции. По выраженности реакции устанавливают степень схожести между белками соматических клеток крови и семени, а следовательно, и степень передачи свойств производителя своему потомству. Положительная реакция проявляется в данном исполнении при агглютинации в разведении 1:50.

#### Пример 2.

По второму варианту исполнения способа интервал между 1- и 2-й инъекциями составляет 5 дней, между 2- и 3-й - 7 дней. Через 10 дней после последней инъекции у производителя берут кровь, из которой готовят иммунную сыворотку. Для постановки реакции агглютинации между активными сперматозоидами и сывороткой крови потомства в 10 пробах делают разбавления сыворотки физиологическим раствором в кратных соотношениях от 1:100 до 1:200, в одиннадцатой - контрольной - физиологическим раствором.

Затем сыворотку семенной жидкости центрифугируют с последующей трехкратной промывкой его физиологическим раствором. Каплю отмытого семени разбавляют 1,5 мл физиологического раствора для получения рабочей смеси. В каждую из 10 проб к сыворотке добавляют одну каплю рабочей смеси и помещают в термостат при 37°C на 30 мин, после чего производят читку реакции. По выраженности реак-

ции устанавливают степень схожести между белками соматических клеток крови и семени, а следовательно, и степень передачи свойств производителю своему потомству. Положительная реакция проявляется в данном исполнении при агглютинации с разведением 1:150.

Пример 3.

Согласно третьему варианту исполнения способа интервал между 1- и 2-й инъекциями составляет 5 дней, между 2- и 3-й - 7 дней. Через 10 дней после последней инъекции у производителя берут кровь, из которой готовят иммунную сыворотку. Для постановки реакции агглютинации между активными сперматозоидами и сывороткой крови потомства в 10 пробах делают разбавления сыворотки физиологическим раствором в кратных соотношениях от 1:300 до 1:500, в одиннадцатой - контрольной - физиологическим раствором.

Затем сыворотку семенной жидкости центрифугируют с последующей трехкратной промывкой его физиологическим раствором. Каплю отмытого семени разбавляют 1,5 мл физиологического раствора для получения рабочей смеси. В каждую из 10 проб к сыворотке добавляют одну каплю рабочей смеси и помещают в термостат при 37°C на 30 мин, после чего производят читку реакции. По выраженности реакции устанавливают степень схожести между белками соматических клеток крови и семени, а следовательно, и степень передачи свойств производителю своему потомству. Положительная реакция проявляется в данном исполнении при агглютинации с разведением 1:400.

Установлено минимальное разведение специфической сыворотки, выявляющее динамику количественных сдвигов реагентов реакции агглютинации по первому примеру исполнения на уровне 1:50. Использование предлагаемого способа оценки производителей сельскохозяйственных животных до появления потомства в данном исполнении дает возможность упрощенно и достоверно определить их степень толерантного состояния иммунной системы.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ тестирования иммунологической толерантности у животных, отличающийся тем, что с целью оценки иммунологической ареактивности в раннем возрасте производят иммунизацию производителей их же семенем, интервал между 1- и 2-й инъекциями составляет 5 дней, между 2- и 3-й - 7 дней, через 10 дней после последней инъекции у производителя берут кровь, из которой готовят иммунную специфическую сыворотку, затем ставят реакцию агглютинации семени со специфической иммунной сывороткой в трех разведениях 1:50-1:100, 1:100-1:200, 1:300-1:500 и по степени схожести белков соматических клеток крови и семени тестируют степень толерантного состояния иммунной системы.

