

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202190262** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.12.31

(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

(71) Заявитель:  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ  
"СТАВРОПОЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ" (RU)**

(72) Изобретатель:

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

---

(57) Изобретение относится к ветеринарной иммунологии, которое может быть использовано в клинической практике для диагностики иммунологической толерантности у животных, в частности к способу оценки иммунологической ареактивности в биологической системе "мать-плод-новорожденный" и 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.

---

**A1**

**202190262**

**202190262**

**A1**

## **СПОСОБ ТЕСТИРОВАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У ЖИВОТНЫХ**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Изобретение относится к ветеринарной иммунологии, которое может быть использовано в клинической практике для диагностики иммунологической толерантности у животных, в частности к способу оценки иммунологической ареактивности в биологической системе «мать-плод-новорожденный» и 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 °С определяют иммунологическую реактивность в пределах нормы, при 36,6-36,9 °С определяют недостаточность иммунологической реактивности (См. Авт. св. СССР №1689857, М.Кл.<sup>2</sup> G01N33/53, 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. Авт. св. СССР №1686364, М.Кл.<sup>2</sup> G01N33/53, 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 о иммунологической реактивности организма (См. Патент РФ №2126154, М.Кл.<sup>2</sup> G01N33/53, 1999 г.).

Недостаток данного способа 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> G01N33/53, 1993 г.).

Однако недостатком данного способа является повышенная травматичность, т.к. 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, т.к. 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 упрощения способа, исследуют динамику количественных сдвигов циркулирующих в крови базофилов в течение семи суток после однократного внутрибрюшного 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 недостатками 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 развившейся иммунологической ареактивности к специфическому антигену. Наш 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 с 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 1, приведена схема иммунизации антигеном свиноматок опытной и контрольной групп.

### **Осуществление изобретения**

Примеры конкретного выполнения способа тестирования иммунологической толерантности у животных.

#### **Пример 1.**

По первому примеру приведены данные (см. таблицу 1), где указаны объемы семени, впрыскиваемые различным видам животных подкожно. Интервал между 1-й и 2-й инъекциями 5 дней, между 2-й 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–физиологический раствор. 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 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-й и 2-й инъекциями 5 дней, между 2-й 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–физиологический раствор.

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 производителя своему потомству. Положительная реакция проявляется в данном исполнении при агглютинации с разведением 1:150.

### **Пример 3.**

Согласно третьего варианта исполнения способа интервал между 1-й и 2-й инъекциями 5 дней, между 2-й 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 – физиологический раствор.

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 производителя своему потомству. Положительная реакция проявляется в данном исполнении при агглютинации с разведением 1:400.

Установлено минимальное разведение специфической сыворотки выявляющие 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, затем ставят реакцию агглютинации семени с 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.

## Способ тестирования иммунологической толерантности у животных

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

Таблица 1

**Авторы**

А.Ф. Дмитриев  
А.В. Агарков  
Н.В. Агарков  
А.Р. Онищенко



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:  
**202190262**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
**A61D 99/00** (2006.01)  
**G01N 33/531** (2006.01)  
**G01N 33/536** (2006.01)  
**G01N 33/96** (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**  
 Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
 A61D 99/00, G01N 33/531, 33/536, 33/96

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	АГАРКОВ А.В. и др. Механизм иммунобиологической толерантности во время беременности в функциональной системе «мать-плод-новорожденный». Вестник КрасГАУ. май 2020, № 5, страницы 119-124	1
A	RU 2014606 C1 (БЛАГОВЕЩЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ) 15.06.1994	1
A	SU 1773409 A1 (СТАВРОПОЛЬСКИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ и др.) 07.11.1992	1
A	WO 2015/153102 A1 (RUBIUS THERAPEUTICS, INC) 08.10.2015	1
A	AU 2006207891 A1 (GALEN BIO, INC) 03.08.2006	1
A	СУПРУН Е.Н. Иммунологическая толерантность: от истории к практике. Аллергология и иммунология в педиатрии, № 3(34), 2013, страницы 29-36	1
A	SCHWARTZ Ronald H. Historical overview of immunological tolerance. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2012, 4(4), a006908	1


последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:  
 «А» - документ, определяющий общий уровень техники  
 «D» - документ, приведенный в евразийской заявке  
 «E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее  
 «O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.  
 "P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения  
 «X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности  
 «Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории  
 «&» - документ, являющийся патентом-аналогом  
 «L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **04/10/2021**

Уполномоченное лицо:  
 Начальник Управления экспертизы



Документ подписан  
электронной подписью

Сертификат: 1623340346878  
 Владелец: С.Н. Рогожин Д.Ю.  
 Действителен: 10.06.2021-09.06.2026

Д.Ю. Рогожин