

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ ЕДИНЫХ БРУЦЕЛЛЁЗНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ РА И РСК, ИЗГОТОВЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ШТАММОВ БРУЦЕЛЛ

А. Д. Улугмурадов

Научно-исследовательского института ветеринарии

М. А. Рузимурадов

Научный руководитель

Научный сотрудник научно-исследовательского института ветеринарии

nivi@vetgov.uz

АННОТАЦИЯ

В статье приведены результаты производственных испытаний единых бруцеллёзных антигенов для РА и РСК, изготовленных из штаммов бруцелл различной видовой и вирулентной принадлежности и изготовленных различными методами. Антигены из отечественных штаммов изготовленные по технологии применяемой в США не уступают по своей активности и специфичности контрольному антигену и антигенам изготовленным по Российской методике, а в некоторых случаях превосходят их по чувствительности в РСК. Доказана целесообразность использования антигена в разведении не 1:75 как указано в наставлении, а 1:150 при исследовании сывороток крови на бруцеллез в РСК. При этом активность и специфичность антигена не меняется, а расход готового препарата снижается в два раза.

Ключевые слова: Бруцеллёз, штамм, антиген, специфичность, экстракт, агглютинат, титр, микробная клетка, микросерия, комплемент, стандартизация, антиабортус, сыворотка.

ABSTRACT

The article presents the results of production tests of common brucellosis antigens for RA and CSC made from Brucella strains of various species and virulence and manufactured by various methods. Antigens from domestic strains produced using the technology used in the United States are not inferior in their activity and specificity to the control antigen and antigens prepared according to the Russian method, and in some cases surpass them in sensitivity in CSCs. The expediency of using the antigen in a dilution not 1:75 as indicated in the manual has been proven,

but 1: 150 in the study of blood sera for brucellosis in the CSC. In this case, the activity and specificity of the antigen does not change, and the consumption of the finished drug is halved.

Keywords: Brucellosis, strain, antigen, specificity, extract, agglutinate, titer, microbial cell, microseries, complement, standardization, antiabortus, serum.

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллёз – одно из самых распространенных антропозоонозных заболеваний, вызываемых бактериями, объединенными под общим названием *Brucella*, характеризующаяся поражением ретикулоэндотелиальной системы, вовлечением в патологический процесс нервной, сосудистой и других систем, а также опорно-двигательного аппарата и склонностью к хроническому течению. Основными характерными патологиями бруцеллёза у скота являются аборт (чаще во второй половине беременности), который сопровождается массовым и длительным выделением бруцелл с абортированным плодом, околоплодными водами, плацентой, выделениями из половых и родовых органов.

Бруцеллы являются внутриклеточным паразитом, но могут также находиться вне клетки и обладают высокой инвазивностью.

На территории Узбекистана циркулируют в основном *Br.melitensis* (1, 2 биотипы), *Br.abortus* (1, 3, 6 биотипы), *Br.ovis*. Биотиповая принадлежность других видов бруцелл в Узбекистане не изучалась. В последнее время в отдельных регионах страны регистрируются серопозитивные реакции у собак и диких грызунов.

Различные виды и биотипы бруцелл обладают различной вирулентностью. Наиболее вирулентными для человека являются *Br.melitensis*, которые могут вызывать эпидемические вспышки заболеваний, протекающих в тяжелой форме. *Br.abortus* и *Br.suis*, *Br.ovis*, *Br.neotomae* и *Br.canis*, вызывают, как правило, спорадические случаи хронически выраженных заболеваний.

По результатам собственных исследований в стране отмечаются спорадические выявления в основном в Бухарской, Джизакской, Самаркандской, Сурхандарьинской и Хорезмской областях. Наиболее благополучными в Республике считаются Ферганская, Наманганская, Андижанская области и Республика Каракалпакстан.

Заболевание бруцеллёзом среди скота может протекать в скрытой форме и обнаруживаться лишь при специальном серологическом обследовании.

Поэтому основная политика борьбы с бруцеллёзом животных в случае возникновения должна опираться на комплекс серологических исследований и проводиться на районном и межрайонном уровне согласно отдельного плана, для каждого неблагополучного хозяйства и населённого пункта.

В свою очередь проведение регулярных, плановых диагностических серологических исследований зависит от наличия достаточного количества диагностических средств, которые должны обеспечиваться отечественными производителями.

До настоящего времени во всех странах мира основными диагностическими методами при бруцеллёзе остаются РБП, РА, РСК, РДСК, КР, РИД, ИФА и ПЦР. Использование данных тестов для борьбы с бруцеллёзом считается достаточным для оценки ситуации по бруцеллёзу и снижению уровня данного заболевания в любой стране.

В связи с возросшими требованиями предъявляемые практической ветеринарией, в том числе и к бруцеллёзным антигенам, которые завозятся в основном из-за рубежа (для РБП, РА, РСК и РДСК, КР, ИФА, ПЦР) появилась необходимость организации отечественного производства единого бруцеллёзного антигена для РА, РСК и РДСК.

Диагностическая эффективность применяемых в настоящее время серологических методов диагностики (РА, РСК (РДСК) находится в прямой зависимости от активности и специфичности используемых антигенов и штаммов, из которых они изготавливаются (Е.С.Орлов, Е.П. Сапегина, 1974, М.Е. К.В. Шумилов, А.И. Климанов, М.А.Рузимуродов, 1989 и др.).

Комитет экспертов ФАО/ВОЗ, также рекомендует для изготовления бруцеллёзных антигенов использовать стабильные полевые S-формы бруцелл.

Вопросу изучения антигенной структуры бруцелл посвящен ряд работ отечественных и зарубежных исследователей. Основным методом при изучении антигенной структуры была реакция агглютинации с цельными клетками и соответствующими моноспецифическими сыворотками. Применение данного метода позволяет изучать поверхностные антигены и давать оценку активности и специфичности как гладких S – форм, так и шероховатых R – форм бруцелл различной видовой принадлежности. Основной целью исследователей, посвятивших свои труды изучению этого вопроса, было найти в антигенном строении особенности, позволявшие проводить различия между видами бруцелл.

Антигены в микроорганизмах *Brucella* по мнению исследователей качественно подобны, но количественно различны. Авторы обозначили поверхностно-оболочечные антигены буквами А и М. В штаммах *Br.abortus* преобладают антигены А, а антиген М имеется в сравнительно небольшом количестве. В штаммах *Br.melitensis* антиген М является преобладающим, в то время как А – антиген содержится в меньшем количестве.

Штаммы *Br.suis* являются как бы промежуточными между штаммами *Br.abortus* и *Br.melitensis*, но содержит больше антигена А, чем М. В настоящее время установлено, что количественно соотношение антигенов А и М у *Br.abortus* составляет 20:1, у *Br.melitensis* 1:20.

Таким образом, РА, РСК (РДСК) являются наиболее распространенными серологическими методами и благодаря четкости проявления и простоте постановки получили широкое применение при диагностике бруцеллёза людей и животных. Указанные тесты достаточно специфичны и позволяют диагностировать бруцеллёз раньше других методов, но в силу отдельных недостатков для РА (выпадение реакции, наличие феномена «зоны») возможности её ограничены. Показания же в РСК компенсируют данные недостатки, поэтому, является более надежным и специфичным тестом, несмотря на её многокомпонентность. В связи с этим многие авторы (Bondhgevic, Forsek, и др. 1974,1986) рекомендуют использовать комплекс РА и РСК.

Данное обстоятельство ещё и связано с тем, что РА выявляет главным образом животных в первые 10-45 дней, а РСК 60-90 дней после заражения. Этот факт был подтверждён специальными исследованиями на крупном и мелком рогатом скоте К.П. Студенцовым, 1974, Ф.П. Локтевой, В.С. Рягузовой, 1978, Alton, 1981, Meyer M.E. 1986 и другими исследователями.

Существенную роль на активность и специфичность антигенов оказывают и методы, используемые для их изготовления. Все известные и применяемые в настоящее время антигены для серологической диагностики бруцеллеза можно подразделить на три группы: 1) корпускулярные антигены (из живых, ослабленных и убитых культур); 2) антигены-экстракты из бруцелл (смешанные антигены); 3) растворимые антигены (глюцидополисахаридный комплекс – антиген Буавена, полисахаридный и липоидный антиген для ИФА).

Целью собственных исследований являлось сравнительное изучение активности и специфичности отечественных микросерий единых бруцеллёзных

антигенов в РА и РСК изготовленных по методу США из разных штаммов бруцелл.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ АНАЛИЗ И МЕТОДОЛОГИЯ

С 22 февраля по 5 марта текущего года по согласованию с ГКВРЖ РУз (№04-67 от 12.02.2021 г.) нами совместно со специалистами Государственного центра диагностики болезней животных и безопасности продовольствия Самаркандской области проведены комиссионные испытания активности и специфичности опытных образцов антигенов в РА и РСК с сыворотками крови различных эпизоотических групп доставленных из различных хозяйств Самаркандской области.

Образцы испытуемых антигенов из штаммов бруцелл с различной видовой и вирулентной принадлежностью, готовили в лаборатории бруцеллеза НИИВ по методу применяемого в США и в отдельных Европейских странах (Англия, Польша, Чехия и др.).

Данный метод применяемый в США заключается в инактивации бруцелл в 0,85% физрастворе, при температуре 70⁰С в течении 60 минут и добавления 5% карбонизированного физиологического раствора до получения конечной концентрации 0,5%.

В качестве контрольного антигена в РА и РСК был использован Единый бруцеллезный антиген из вирулентного штамма Br.abortus 99 (Вейбридж) для РА, РСК (РДСК), изготовленного аналогичным методом на НПП «Антиген» Республики Казахстан, серии 7, изготовленного 10.2020 г., со сроком годности 24 мес. Также при постановке РСК использовали гемолизин серии 6, изготовленный 10. 2020 г., со сроком годности 3 года и комплемент серии 3, изготовленный 07.2020 г. со сроком годности 2 года на этом же предприятии.

Антигены испытывали на специфичность и активность в их рабочих титрах 1:10 в РА и 1:75 и 1:150 в РСК. Серологические реакции РА и РСК ставили и учитывали классическими методами согласно Научно обоснованной системе по “Диагностике бруцеллёза животных” (Утв. Госкомветеринарии РУз от 12.12.2018г.).

Испытание изучаемых антигенов на активность и специфичность проводили с использованием 893 проб сывороток крови, в том числе 405 проб полученных от крупного рогатого скота и 488 проб от мелкого рогатого скота.

Из 405 проб сывороток крови полученных от крупного рогатого скота 287 были получены от не иммунизированного скота, 77 - от иммунизированных

против сибирской язвы и 41 проба – от иммунизированных против эмфизематозного корбункла животных.

Из 488 проб сывороток крови, полученных от мелкого рогатого скота 62 пробы были от не иммунизированных овец, 81 проба от вакцинированных ГОА формол вакциной против колибактериоза, сальмонеллёза и пастереллёза и 345 проб от животных, иммунизированных против бруцеллёза живой вакциной из штамма Rev-1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения специфичности антигенов представлены в таблице 1. Данные таблицы показывают, что все антигены изготовленные из штаммов Br.abortus 104M UZ и 1/2017 UZ, Br.melitensis Rev-1 UZ, 9 UZ в сравнении с контрольным Единым бруцеллёзным антигеном для РА, РСК (РДСК) обладали высокой специфичностью.

Таблица 1

Результаты изучения специфичности бруцеллёзных антигенов в РА и РСК с сыворотками крови животных различных эпизоотических групп

Вид животного	Эпизоотические группы животных	Кол-во исслед. проб	Антигены из штаммов				
			104MUZ	1/2017 UZ	Rev-1 UZ	9 UZ	99 (Вейбридж) контроль
Крупный рогатый скот	Неиммунизированный	287	0	0	0	0	0
	Вакцинированный против сибирской язвы	77	0	0	0	0	0
	Вакцинированный против Эмкара	41	0	0	0	0	0
	Итого	405	0	0	0	0	0
Мелкий рогатый скот	Неиммунизированный	62	0	0	0	0	0
	Вакцинированных ГОА формол вакциной против колибактериоза, сальмонеллёза и пастереллёза (НИИВ)	81	0	0	0	2	0
	Итого	953	0	0	0	2	0

При сравнительном испытании в РА, отечественных антигенов из штаммов Br.abortus 104M UZ, 1/2017 UZ и Br.melitensis Rev-1 UZ, 9 UZ с сыворотками крови от крупного рогатого скота не установлено ложно-положительных и неспецифических реакций как при использовании сывороток крови здоровых животных, так и с пробами полученными от

иммунизированных животных, против сибирской язвы, Эмкара (Российского производства), а также ГОА формол вакцины против колибактериоза, сальмонеллёза и пастереллёза (НИИВ).

При исследовании сывороток крови от овец полученных от иммунизированных ГОА формол вакциной против колибактериоза, сальмонеллёза и пастереллёза (НИИВ) в двух случаях отмечены неспецифические реакции в РСК с антигеном изготовленным из штамма Br.melitensis 9 UZ. Во всех остальных случаях с сыворотками крови животных различных эпизоотических групп неспецифических реакций установлено небыло.

Результаты изучения чувствительности и активности антигенов в РА и РСК представлены в таблице 2. Из представленных в таблице данных видно, что при исследовании в РА 345 сыворотки крови мелкого рогатого скота иммунизированных против бруцеллеза вакциной из штамма Rev-1 в мае 2020 года антиген из штамма 104M UZ был несколько чувствительнее по сравнению с другими антигенами. Так, если с антигеном из штамма Br.abortus 104M UZ было выявлено 7,5 % реагирующих животных, то с антигеном из штаммов 1/2017 UZ - 6, 9%, с антигенами из мелитензисных штаммов Rev-1 UZ, 9 UZ соответственно 7,2% и 6,0%. У контрольного антигена из штамма Br.abortus 99 Казахского производства показатель чувствительности также был высоким и составлял 7,5%.

Таблица 2
 Результаты сравнительного изучения активности бруцеллёзных антигенов в РА и РСК с сыворотками крови животных различных эпизоотических групп

Вид животного от которых получены сыворотки	Кол-во исслед. проб	Из них реагировало	Антигены из штаммов									
			104MUZ		1/2017 UZ		Rev-1 UZ		9 UZ		99 (Вейбридж) контроль	
			РА	РСК	РА	РСК	РА	РСК	РА	РСК	РА	РСК
Мелкий рогатый скот иммунизированный вакциной из штамма Rev-1 в мае 2020 г.	345	голов	26	4	24	2	25	2	21	1	26	3
		%	7,5	1,2	6,9	0,5	7,2	0,5	6,0	0,2	7,5	0,8
Мелкий рогатый скот неиммунизированный вакциной из штамма Rev-1	62	голов	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таким образом, показатели чувствительности отечественного антигена из штамма Br.abortus 104M UZ и контрольного в РА не отличались и были одинаковыми.

Следует отметить, что при использовании отечественного антигена из штамма 104M UZ формировался более крупнозернистый агглютинат по сравнению с антигенами изготовленных из штаммов вида Br.melitensis Rev-1 UZ, 9 UZ и контрольного из штамма Br.abortus 99. Данное обстоятельство является важным, поскольку при визуальной реакции облегчается учёт и повышается объективность полученных результатов.

При сравнении титров антигенов полученных при использовании антигенов из вакцинных (104M UZ, Rev-1 UZ) и вирулентных (1/2017 UZ, 9 UZ) штаммов бруцелл также существенной разницы не установлено. Это в свою очередь свидетельствует о том что вид и вирулентность не оказывают существенного влияния на активность антигенов для РА если стандартизация их проводится по стандартной национальной сыворотке антибруцелла абортус.

В РСК при исследовании этих же сывороток крови чувствительность антигенов из штаммов Br.abortus 1/2017 UZ и Br.melitensis Rev-1 UZ, была одинаковой и позволяла выявлять максимальное (0,5%) количество реагирующих животных. Антиген из штамма Br.melitensis 9 UZ выявлял на 1% реагирующих животных меньше, по сравнению с антигеном из штамма Br.abortus 104M UZ и контрольным антигеном из штамма Br.abortus 99.

Чувствительность отечественных антигенов, изготовленных из штаммов Br.abortus составляла в среднем 0,85% и была на порядок выше чем чувствительность антигенов из штаммов Br.melitensis при использовании которых этот же показатель составлял 0,35%.

При исследовании 62 проб сывороток крови в РСК от мелкого рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллеза, все антигены также были высокоспецифичными (таблица 2).

Результаты сравнительной проверки чувствительности Единых бруцеллезных антигенов в разведениях 1:75 и 1:150 в РСК представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Результаты сравнительного изучения активности антигенов из отечественного штамма Br.abortus 104M UZ и контрольного антигена из штамма Br.abortus 99 (Вейбридж)

Вид животных	Кол-во исследованных проб	Реагировало с антигенов в разведении			
		Br.abortus 104M UZ		99 (Вейбридж)	
		1:75 (гол / %)	1:150 (гол / %)	1:75 (гол / %)	1:150 (гол / %)
Мелкий рогатый скот	345	4	4	3	3
		1,2	1,2	0,8	0,8

Из данных таблицы 3 видно, что при сравнительном исследовании 345 проб сывороток крови от мелкого рогатого скота активность коммерческого контрольного антигена из штамма 99 (Вейбридж) и отечественного диагностикума из штамма Br.abortus 104M UZ, в РСК в двух разведениях независимо от рабочего титра, была одинаковой.

Таким образом, антиген в разведении 1:150 также можно использовать при постановке РСК с сыворотками разных животных, что сокращает расход препарата в два раза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Результаты проведенных исследований в РА и РСК в производственных условиях показали высокую специфичность, активность и чувствительность изучаемых антигенов, изготовленных по методике США из разных штаммов бруцелл с неодинаковой вирулентностью.

2. Установлено, что отечественные вакцинные штаммы Br.abortus 104M UZ и Br.melitensis Rev-1 UZ является наиболее перспективными для производства единого бруцеллезного антигена для РА, РСК, РДСК по сравнению с эпизоотическими штаммами Br.abortus 1/2017 UZ и Br.melitensis 9 UZ.

3. Установлено, что при использовании отечественного антигена из штамма Br.abortus 104M UZ формируется более крупнозернистый агглютинат по сравнению с антигенами изготовленных из штаммов вида Br.melitensis Rev-1 UZ, 9 UZ, что облегчало или затрудняло учёт результатов реакции.

4. Вид и вирулентность не оказывают существенного влияния на активность антигенов для РА и РСК, если стандартизация их активности проводится по стандартной национальной агглютинирующей сыворотке антибруцелла абортус. Так, при сравнении титров антигенов в РА и РСК полученных при использовании диагностикумов из вакцинных штаммов 104М UZ и Rev-1 UZ и вирулентных штаммов 1/2017 UZ, 9 UZ достоверной разницы, в их активности не установлено.

5. Антигены, из отечественных штаммов изготовленные по технологии применяемой в США не уступают по своей активности и специфичности коммерческим контрольным антигенам и антигенам, изготовленным по Российской методике, а в некоторых случаях превосходят их по чувствительности в РСК.

6. Доказана целесообразность использования антигена в разведении не 1:75 как указано в наставлении, а 1:150 при исследовании сывороток крови на бруцеллез в РСК. При этом активность и специфичность антигена не меняется, а расход готового препарата снижается в два раза.

REFERENCES

1. Шумилов К.В., Климанов А.И., Рузимуродов М.А. и др. Совершенствование средств серологической диагностики бруцелллёза сельскохозяйственных животных. //Актуальные вопросы профилактики бруцелллёза и организация медицинской помощи больным. Тез.докладов Всесоюзной Конференции, Новосибирск., М.1989. с. 133.
2. Студенцов К.П., Бруцеллез с/х животных: Алма-Ата.-1974.-194с.
3. Alton, G.G. Standartization of agglutinating antigens for the diagnosis of brucellosis // Res.Vet.Sci/-1981, Vol.12, № 4, p.330-337.
4. Meyer M.E. Use of automated complement fixation screening test for serodiagnosis of bovine brucellosis // In.Proc.83 rd Meeting U.S.Anim.H1th.Ass.-1986, p.81-91.
5. Bandnjevie B., Forseck Z. Kriticki osvrt na otkrivanje bruceloze seroloskim testovima na govedarskim gazdinstvima u Bosni I Hercegovini//Veterinaria /SFRJ/ -1986, Vol.20, N 2, p.193-198.
6. Хайвонлар бруцелллёз касаллигининг диагностикаси бўйича илмий асосланган ТИЗИМ. //Утверждена Государственным ветеринарным комитетом Р.Уз. 2018 г Материалы и методики ФАО/ВОЗ, 2018г