

Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан»

на правах рукописи



ЯНИКОВА ЭЛЬМИРА АРСЛАНОВНА

**СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ АНТИГЕННЫХ И
АНТИТЕЛЬНЫХ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ДИАГНОСТИКУМОВ И
ОЦЕНКА ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ**

06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук, профессор
О.Ю. Черных

Краснодар – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Эпизоотическая обстановка в мире и России по бруцеллезу	10
1.2 Краткая характеристика бруцелл	13
1.3 Лабораторная диагностика бруцеллеза	16
1.4 Профилактические мероприятия и борьба с бруцеллезом	33
1.5 Заключение по обзору литературы	41
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
2.1.1 Материалы исследований	46
2.1.2 Методы исследований	46
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	47
2.2.1 Сравнительное изучение методов стабилизации эритроцитов и изыскание модифицированного метода	47
2.2.2 Изыскание способа получения бруцеллезного эритроцитарного антигена для РНГА	51
2.2.3 Изучение и испытание усовершенствованного АГ эритроцитарного диагностикума для РНГА	61
2.2.4 Выявление противобруцеллезных АГ в молоке и сыворотке экспресс методом	75
2.2.5 Изучение эффективности и испытание РНГА при исследованиях сыворотки крови и молока при поствакцинальной иммунизации крс против бруцеллеза и дифференциальной диагностики, при применении вакцины из штамма <i>B. abortus</i>	82
2.2.6 Разработка и испытание эритроцитарного бруцеллезного антительного диагностикума для РНГА	89
3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	96
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	97
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	98
ПРИЛОЖЕНИЯ	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Значимым показателем государственного развития является искоренение инфекционных особо опасных болезней общих для человека и животных. Мировой глобальной социально-экономической проблемой продолжает оставаться бруцеллез. Регистрируется бруцеллез во многих государствах Америки, Африки, Азии и Средиземноморья. В государствах СНГ и России в конце XX в. эпизоотическая обстановка обострилась. Актуальными при бруцеллезе продолжают оставаться вопросы диагностики и профилактики [97, 109, 111].

Неоценим вклад ученых [1, 7, 17, 19, 27, 33, 40, 48, 60, 64, 73, 92, 95, 104, 110, 113, 118, 123, 130, 134] и многих других, которые изучали эпизотологию, создавали средства и методы диагностики и профилактики особо опасного заболевания, каким является бруцеллез.

Затраты по бруцеллезу масштабны и обусловлены проведением противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий. Будучи зооантропонозом больные животные выступают резервуаром бруцелл и источником возникновения болезни у людей и следствие – нетрудоспособность и инвалидность. Неблагополучные по бруцеллезу хозяйства несут экономические потери из-за абортности, яловости, потери продуктивности и многих других причин. В хозяйствах нарушается племенная работа и система воспроизводства. Поэтому ликвидация бруцеллеза имеет важное государственное значение. Бруцеллез продолжает оставаться важной медицинской и ветеринарной проблемой [97, 126, 139].

Одновременно искоренение болезни требует больших экономических затрат, включая меры организационные, хозяйственные и ветеринарно-санитарные. При осуществлении специальных мер при бруцеллезе важным показателем является определение всех животных, которые больны, что должно быть проведено своевременно. Данные параметры напрямую

зависят от методов и средств диагностики: чувствительности и достоверности [19, 30, 55, 85, 111, 112, 128, 129].

До настоящего времени в мире основным методом прижизненной диагностики бруцеллеза животных остается серологический, направленный на обнаружение АТ специфических. Из существующих серологических методов диагностики бруцеллеза практическое значение и широту применения получили: РА, РБП, РСК, КР, РИД, РДСК, ИФА и ИХА [26, 89, 90].

Проведенные многократные исследования показали высокую чувствительность, специфичность реакций и возможность массового скрининга на бруцеллез поголовья скота. Однако, когда исследование проводится однократно невозможно выявить всех животных, которые инфицированы. Для оздоровления бруцеллезных хозяйств и ферм требуются комплексные исследования (серологические) многократные. Поэтому создание высокочувствительных средств диагностики, обладающих способностью оперативно и полностью выявлять животных, которые больны, научно-практическая задача [34, 79, 104, 111, 112, 127].

Из существующих реакций – перспективна РНГА. Многократные серологические диагностические исследования у животных разных видов показали ее более высокую чувствительность и специфичность. Но использование ее в повседневной практике было затянато в связи с отсутствием стандарта и стабильного эритроцитарного антигена, обеспечивающего получение воспроизводимых результатов РНГА и малой изученности самой реакции [141].

Таким образом, способы получения бруцеллезных антигенных и антительных ЭД и оценка их эффективности являются актуальными задачами.

Степень разработанности проблемы. Бруцеллез – мировая проблема. Многие отечественные и зарубежные ученые участвовали в оздоровлении хозяйств и ферм, где был установлен бруцеллез, используя

различные методы и средства диагностики [2, 8, 10, 24, 96, 101, 134] и другие. Из методов диагностики перспективной была показана РНГА [19, 55, 91, 125, 138].

Многочисленные серологические диагностические исследования у животных разных видов показали ее более высокую чувствительность и специфичность. Однако существующие способы индикация антигена и выявления специфических антител на основе РНГА требуют усовершенствования.

Цель и задачи исследований. Цель исследований – создание способов получения бруцеллезных антигенных и антительных эритроцитарных диагностикумов и оценка их эффективности.

1. Сравнительно изучить методы стабилизации эритроцитов и провести модификацию для улучшения качественных показателей;

2. Изыскать способ получения бруцеллезного эритроцитарного АГ для РНГА и испытать его эффективность;

3. Разработать способ выявления противобруцеллезных АГ в молоке экспресс-методом;

4. Изучить эффективность и испытать РНГА при исследованиях дифференциальной диагностики, после применения вакцины из штамма *B. abortus* 82;

5. Разработать и испытать эритроцитарный бруцеллезный антительный диагностикум для РНГА;

6. Разработать и испытать эритроцитарный антительный овисный диагностикум для РНГА.

Основные положения, выносимые на защиту:

- диагностика бруцеллеза эритроцитарным АГ диагностическим набором;

- диагностика бруцеллеза эритроцитарным АГ диагностическим набором;

- диагностика бруцеллеза в РНГА с молоком и обоснование диагностических титров;
- оценка эффективности бруцеллезных антигенных и антительных эритроцитарных диагностикумов;
- технология изготовления для РНГА активного и специфичного антительного ЭД и изучение значения для диагностики крс.

Научная новизна:

- доказана эффективность применения бруцеллезного антигенного эритроцитарного диагностикума для РНГА при массовой экспресс-диагностике у крс бруцеллеза;
- разработан способ изготовления бруцеллезного эритроцитарного АГ для РНГА;
- доказана возможность применения экспресс-метода выявления противобруцеллезных антител в молоке;
- разработан способ получения антительного эритроцитарного диагностикума для индикации в РНГА бруцеллезного антигена в патматериале (Патент РФ № 2493871 от 27.09.2013 г.);
- разработан и испытан эритроцитарный антительный овисный диагностикум для РНГА при инфекционном эпидидимите баранов (Патент РФ № 2509306 от 10.03.2014 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы. На основе проведенных научных исследований, разработаны способы получения бруцеллезных антигенных и антительных эритроцитарных диагностикумов и проведена оценка их эффективности. Создан бруцеллезный АГ эритроцитарный диагностикум для исследования, с обоснованием диагностических титров, проведена оценка эффективности бруцеллезных антигенных и антительных эритроцитарных диагностикумов. Разработана инновационная технология изготовления для РНГА эритроцитарного антительного диагностикума.

Разработаны и внедрены в производство 5 нормативных документов, из которых 3 методических рекомендаций, утвержденных в установленном порядке, а новизна полученных данных подтверждена 2 Патентами РФ.

Полученные данные в результате исследований внедрены в курс повышения квалификации, проводимым Прикаспийским зональным НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦ РД».

В результате экспериментальных исследований разработаны НД:

1) Изготовление и испытания эритроцитарных бруцеллезных и антительных диагностикумов для РНГА с целью выявления специфических антител в сыворотке крови и индикации бруцелл в биоматериале, утв. ГНУ Прикаспийского зонального НИВИ от 19.09.2013 г. (2013).

2) Применение нового экспресс-метода для поствакцинальной дифференциальной диагностики бруцеллеза овец и коз, утв. Ученым советом ФГБНУ Прикаспийского зонального НИВИ 11.12.2017 г. (2017).

3) Применение РНГА с усовершенствованным АГ в «Наборе для серологической диагностики бруцеллеза...», утв. Управлением ветеринарии Ростовской области 08.04.2020 г. (2020).

Методология и методы исследования. В представленной работе были использованы серологические, бактериологические методы исследования, др.. Экспериментальные исследования проведены автором самостоятельно в условиях Прикаспийского зонального НИВИ.

Степень достоверности и апробация результатов.

В диссертационной работе экспериментальные исследования и обработка статистических данных проведены в трех проворностях, что подтверждает их достоверность. Полученные результаты исследований обсуждены на отчетных заседаниях Прикаспийского зонального НИВИ и материалы диссертации доложены на:

– МЮНПК «Успехи современной ветеринарной медицины...», посвященной 50-летию Прикаспийскому зональному НИВИ, Махачкала (2017);

– РНПК «Актуальные проблемы повышения продуктивности и охраны здоровья животных», Махачкала (2018).

Материалы диссертации отражены в научных трудах: 11 статьях, 9 из которых, в изданиях ВАК Минобрнауки РФ, 3-х методических рекомендациях. Новизна полученных данных подтверждена 2-мя Патентами РФ.

Структура диссертации.

Напечатана диссертационная работа на 134 стр. компьютерного текста. Данные литературы включают 180 источников. Работа иллюстрирована 38 таблицами.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпизоотическая обстановка в мире и России по бруцеллезу

Одной из глобальных мировых проблем, несмотря на успехи в ее изучении, остается бруцеллез. Ущерб социальный, высокие показатели инвалидности, и экономический обуславливают особую опасность данной болезни [17, 39, 104, 110, 174, 175].

Болезнь имеет распространение на территории разных государств Южной и Центральной Америки, Азии, Средиземноморья, Европы, и Африки. В последнее десятилетие XX века эпизоотическая обстановка в нашей стране и государствах СНГ обострилась. Остаются актуальными вопросы, связанные с диагностикой и профилактикой бруцеллеза [97, 110].

Во ВОЗ объединенный комитет экспертов показал, что в последние десятилетия XX века животные болели бруцеллезом в 155 странах земного шара [39, 149, 159, 161, 180].

В некоторых государствах Европы удалось достичь успехов в искоренении бруцеллеза. Показателен пример Японии, где полностью ликвидирована болезнь у животных, и соответственно людей. Эффективная борьба с болезнью вводится в странах бывшей Югославии и Болгарии, где отмечаются единичные случаи бруцеллеза [48].

Разные виды, биовары бруцелл занимают определенную нишу, которая напрямую связана географическим регионом. Вид *B. abortus* всемирно распространен в регионах с развитым скотоводством, за исключением Канады, Японии и ряда стран Европы, а также Израиля, Новой Зеландии и Австралии, где бруцеллез полностью искоренен. У крупного рогатого скота в США бруцеллез практически искоренен, но в естественной среде обитания он регистрируется в Северной Америке, в Йолустонском национальном парке у бизонов. Вид *B. melitensis* имеет распространение главным образом в государствах Ближнего Востока, Центральной Азии, Средиземноморья, прилегающих к Персидскому

заливу и в ряде стран Центральной Америки. Также имеются сообщения из Индии и Африки об обнаружении *B.melitensis* у больных людей и животных. Третий биовар встречается в большей степени в государствах Ближнего Востока и Средиземноморья, а первый биовар превалирует на территории Центральной Америки. Занос *B. melitensis* в США отмечали в большинстве случаев при импорте коз, и крайне редко при завозе скота. Вид *B. ovis* взаимосвязан со странами, где овцеводство широко распространено (Южная Африка, Новая Зеландия, Австралия, Америка, и во многих Европейских странах). Вид *B.suis* раньше регистрировали во всех регионах мира, где занимались свиноводством, а ныне данный вид можно встретить у кобанов – диких свиней, в определенных зонах Европы, Австралии, в штате Квинсленд и США. Спорадические случаи бруцеллеза, вызываемого *B. suis* продолжают регистрировать у людей и домашних свиней ряде стран Центральной и Южной Америки и Азии. Первый и третий биовар *B. suis* широко распространены в мире, а другие биовары – географическое распространение ограничено. Вторым биовар *B. suis* выделяют в большинстве Европейских регионов от диких кабанов. Четвертый биовар имеет ограниченный ареал распространения, районы арктики РФ и Северной Америки, включая Аляску, Канаду и Сибирь. Пятый биовар выделяли на территории СССР. Вид *B. canis* имеет распространение во многих государствах мира [49].

Вид *B. melitensis* особо опасен в плане эпидемиологии, население болеет, где распространено овцеводство. Вид *B. abortus* имеет широкое распространение, и угроза инфицирования людей возрастает [39].

В третьем тысячелетии новые технологии позволили развить прогресс в изучении и понимании рода *Brucella*, и результатом этого стало расширение рода, *B. neotomae*, *B. inopinata*, *B. ceti*, *B. microti* [48].

В конце истекшего столетия эпидемическая и эпизоотическая обстановка в РФ и странах СНГ резко ухудшилась, в связи с преобразованиями в социальной сфере и сфере экономики, приватизацией

в АПК. Благоприятствовали ухудшению эпизоотической обстановки экономические трудности. Возросшая миграция населения, слабый санитарный и ветеринарный контроль за перемещением продукции животного происхождения, перемещением сельскохозяйственных животных усугубили эпидемиологическую и эпизоотическую ситуацию. Самая сложная обстановка по бруцеллезу была в период с 1997 по 2006 гг. на территории Южного и Сибирского Федеральных округов. Их доля по впервые установленным заболеваниям людей составила свыше – 72%, неблагополучным пунктам крс свыше – 96%, и мрс свыше – 98% [39].

Наибольшее число заболевших животных в Южном федеральном округе, как крупного, так и мелкого рогатого скота, регистрируется в Республике Дагестан. На конец 2019 г. осталось неблагополучных 62 пункта по крс, и 18 - мрс. Увеличилась заболеваемость людей с 118 случаев в 2017 г. до 122 – в 2019 г. В целях профилактики проводится массовая иммунизация крс и мрс. Так за 2018 г. штаммом 82 иммунизировано 704,9 тыс. гол. крс, Rev-1 – 3288,0 тыс. гол. мрс и за 2019 г. соответственно 524,4 тыс. и 2299,9 тыс. голов. Диагностическим исследованиям подвергнуто в 2019 г. 677,8 тыс. голов крупного и 352,1 тыс. мелкого рогатого скота. В результате проведенной работы к 2019 г. достигнуто некоторое снижение заболеваемости крс с 1737 в 2017 г. до 1416 голов в 2019 г., мрс – с 385 до 265 голов. Несмотря на некоторое снижение заболеваемости животных, не удастся полностью оздоровить и достичь устойчивого эпизоотического благополучия в субъекте РФ. Несмотря на оздоровление одних хозяйств, ежегодно, заболевание регистрируется в новых пунктах. Молоко из неблагополучных пунктов по бруцеллезу и получаемые из него молочные продукты, неправильная технология термической обработки сырья являются причиной заболевания населения этой особо опасной инфекцией [49].

Таким образом, достигнутые успехи в изучении бруцеллеза не позволили ликвидировать это заболевание в мире, странах СНГ и

Российской Федерации. Государства Америки, Азии, Средиземноморья, Европы, и Африки ежегодно сталкиваются с проблемами, которые создает бруцеллез. Несмотря на принимаемые меры в нашей стране эпизоотическая, и соответственно эпидемическая обстановка остается напряженной. Вид *B. melitensis* особо опасен в плане эпидемиологии, а вид *B. abortus* имеет широкое распространение, что представляет угрозу инфицирования людей. Территория Южного и Сибирского Федеральных округов была наиболее неблагополучной по бруцеллезу, доля по впервые установленным заболеваниям людей составила свыше – 72%, неблагополучным пунктам крс свыше – 96%, и мрс свыше – 98%. Молоко из неблагополучных пунктов по бруцеллезу и получаемые из него молочные продукты, неправильная технология термической обработки сырья являются причиной заболевания населения. В этой связи лабораторная диагностика и новые подходы для выявления носителей бруцелл в поголовьях крс и мрс важны для купирования очагов инфекции.

1.2 Краткая характеристика бруцелл

Бруцеллы (лат. *Brucella*) – род бактерий из семейства *Brucellaceae*. Назван возбудитель в честь шотландского военного врача Дэвида Брюса, который первым выделил и описал микроорганизмы на Мальте в 1887 году. В 1986 году дана классификация ФАО/ВОЗ роду *Brucella*. Шесть видов вошли в Род, а вид имеет биовары по некоторым биологическим свойствам. Семью биоварами представлен вид *B. abortus*, где крупный рогатый скот является основным носителем. Тремя биоварами представлен вид *B. melitensis*, где овцы, козы и верблюды носители. Пятью биоварами представлен вид *B. suis*, где свиньи основной носитель. Носителем второго биовара выступают в том числе зайцы, четвертого – олени, мышевидные грызуны у пятого биовара. У пустынной крысы, в штате Юта, в США в 1957 году было установлено носительство *B. neotomae* [174].

У овец установлено носительство *B. ovis*, который у баранов вызывает инфекционный эпидидимит, у собак *B. canis* [105]. В 2008 году ФАО/ВОЗ дополнила род *Brucella* тремя видами. Носительство бруцелл было установлено у китов – *B. ceti*, тюленей – *B. pinnipedialis*, и у мышей-полевков – *B. microti* [110].

В России установлено заболевание у многих животных: овцы, крупный рогатый скот, козы, северные олени, свиньи, маралы, верблюды, лошади, яки, собаки, зебу, буйволы. Важное экономическое и эпизоотологическое значение имеет бруцеллез, который регистрируют у крупного рогатого скота.

Несмотря на наличие у бруцелл общих черт, имеются отличительные признаки по видам и биоварам. В 1972 году Комитетом экспертов ФАО/ВОЗ для дифференциации и идентификации видов и биоваров рода *Brucella* установлены определенные тесты: повышенное содержание – CO₂, лизирование фагом – Тб, выделение H₂S, характер роста на питательных средах с красками анилиновыми – тионин (1:25000-1:100000), и (1:50000-1:100000) фуксин, далее агглютинация сыворотками моноспецифическими «А» и «М» и антисыворотками – S- и R-, кроме этого рост на питательных средах с субстратами, где включены отдельные углеводы, мочевины и аминокислоты.

Биологические свойства и признаки у микроорганизмов изменчивы, когда у них меняются условия существования, выражены очень значительно и встречаются чаще, по сравнению с другими живыми существами. Простота организации микробов, очень быстрая смена поколений и очень интенсивный метаболизм обуславливают этот факт. Многие исследователи установили, что разнообразные индуцирующие факторы при воздействии в лабораторных условиях приводят к диссоциации бруцелл, происходит трансформирование S-формы в R-форму. Диссоциацию бруцелл можно вызвать путем их культивирования и использования истощенных сред, добавляя желчь, иммунную сыворотку

разных убитых микроорганизмов или их экстрактов [17, 69, 75, 76, 77, 115].

Некоторые ученые сообщали об изменении некоторых биологических свойств бруцелл, в частности, в организме черепах [81], рыб [72], змей [13], лягушек [9], клещей [116]. Самый высокий процент культур бруцелл, которые изменились, был установлен у нетиповых носителей при искусственном заражении, так и в естественных условиях, а также в организме животных, которые были иммунными [66, 69].

Полученные атипичные биологические свойства бруцелл обладают высокой устойчивостью, и исследованиями было доказано, что штаммы, которые мутировали, передавали приобретенные свойства следующим поколениям [154].

Физические факторы могут приводить у бруцелл к изменениям некоторых свойств. Воздействие УФ-лучей на бруцеллы способствовало спаду вирулентности. В результате воздействия УФ-лучей были получены новые штаммы для вакцин *B. abortus* 21 и *B. melitensis* 56 [6, 9, 61, 93].

Антибиотики являются значимым фактором, который способствует изменению свойств бруцелл [41, 52, 120, 179]. Научно обосновав, что под воздействием антибиотиков вирулентность снижается, был получен и досконально изучен штамм для изготовления вакцин *B. melitensis* Рев-1 [73, 118, 131].

Бактериофаг – лизирующий агент, очень важен у бруцелл, приводя их к изменчивости. Наличие фага у бруцелл впервые наблюдал канадский исследователь [163]. Когда фаг воздействует на бруцеллу, меняются сразу морфологические свойства и антигенность, происходит резкий спад вирулентности и бруцеллы начинают быть инагглютиногенными [78]. Лизис бруцелл «спонтанный» и последующее изменение их свойств установили многие исследователи [69, 83, 115]. У некоторых бруцелл свойства, которые были изменены под воздействием фага, закреплялись [37, 64, 78].

Исследователи, изучая изменчивость, определили две ее формы: первая модификация временная и не связана с генами бруцелл, которая исчезает в следующих поколениях под воздействием внешних условий, и вторая – мутация, сюда относится диссоциация, когда изменения затрагивают геном возбудителя, которые сохраняются в последующих поколениях, передаются по наследству. Теорию микробной диссоциации, различные варианты роста микроорганизмов на питательных средах (твердых) выдвинул в 1929 году микробиолог из Англии. Для бруцелл такая терминология была применена П.Ф. Здродовским в 1936 году [64].

В процессе диссоциации установлены большие функциональные, биохимические и морфологические изменения в клетке, которые в конечном итоге приводят к изменению у бруцелл биологических свойств. Бактерии меняют биологические свойства не только на питательных средах (искусственных), но и находясь в организме животного или человека [17].

У сельскохозяйственных животных при нахождении бруцелл в организме также установлена изменчивость [82].

У бруцелл в R-форме при электронной микроскопии наблюдают слизистые капсулоподобные полиморфные образования [21, 38]. Химический анализ указанных образований позволил установить состав, который показал преобладание полисахаридов и наличие белка. За счет химического состава слизистых образований у бруцелл в R-форме, R-колонии окрашиваются кристаллическим фиолетовым в фиолетовый или синий цвет при дифференциации по методу Уайта-Вилсона. Морфологические изменения у бруцелл, которые видны при диссоциации, сопряжены с изменением метаболизма, что приводит к изменению антигенной структуры [38].

Белка у бруцелл больше находится в составе АГ поверхностного у R-клеток, а у RS-формы – общих сахаров [154].

Существуют также бруцеллы в L-форме при применении химических препаратов и антибиотиков. Основой L-трансформации является сбой синтеза слоя мукопептидной клеточной стенки, а также угнетение деления. Клетка разрывается и высвобождается цитоплазма со всем содержимым. L-формы по химическому составу отличаются одной разницей – нет компонентов, которые входят в клеточную стенку [79, 80].

1.3 Лабораторная диагностика бруцеллеза

В нашей стране экономические потери от бруцеллеза значительны. Экономический ущерб от бруцеллеза, наносимый хозяйствам, довольно велик. Убытки складываются из потерь приплода, снижения продуктивности скота, яловости коров, выбраковки животных, больших затрат на ветеринарные, медицинские и другие мероприятия. Бруцеллез у животных проявляется характерными особенностями, в ряде случаев отсутствуют клинические признаки болезни при латентном носительстве, течение болезни длительное, хроническое. Поэтому при проведении комплексных противобруцеллезных мер важнейшим звеном выступает точная диагностика [29, 33].

По мнению крупных ученых страны и других специалистов, работающих по этой проблеме, бруцеллез относится к числу инфекционных болезней, при которых все профилактические и оздоровительные мероприятия основываются исключительно на диагностике. Учитывая важное ее значение во всем мире, начиная еще со времени открытия возбудителя болезни, проводятся исследования по усовершенствованию диагностики бруцеллеза.

В настоящее время применяются различные методы диагностики бруцеллеза, такие исследования как серологические, бактериологические, аллергические, а также молекулярно-генетические [30].

Метод исследования бактериологический. Очень достоверным методом диагностики бруцеллеза является бактериологический, поскольку

выделение культуры бруцелл от больного животного или абортированного плода, вне всякого сомнения, свидетельствует о наличии бруцеллеза у животных. Данный метод используют при аборте или клинических признаках, указывающих на болезнь [25].

На исследование посылают абортированный плод или его перевязанный желудок с содержимым, сердце, селезенку, кусочки печени. От абортировавших коров, овцематок, свиноматок в лабораторию направляют плодовые оболочки, околоплодную жидкость, истечения из матки и влагалища, молоко и мочу, а от лошадей – содержимое гнойников. Эффективность данного метода исследования взаимосвязана с качеством питательных сред, обсемененности материала бруцеллами, степени контаминации его посторонней микрофлорой и некоторых других причин. Однако, отрицательный результат бактериологического исследования еще не является доказательством отсутствия бруцеллеза. Кроме того, этим методом трудно провести или практически невозможно осуществить массовую проверку скота на бруцеллез [25].

Биологический метод. Метод достоверен. Он позволяет при малом количестве возбудителя в патологическом материале, а также при контаминации установить бруцеллез [34].

Ставят при бруцеллезе положительный диагноз, когда выделяется культура после заражения морских свинок. Также, когда к бруцеллезному антигену обнаруживаются агглютинирующие антитела. Их концентрация в сыворотке крови достигает уровня 1:10 и более. Спустя 30-тьдней после заражения морских свинок подвергают тотальному обескровливанию. Для удешевления в качестве лабораторных животных можно пользоваться белыми мышами. Этот метод не приемлем в диагностических исследованиях, когда антигенные свойства у возбудителя изменены. В последние годы для лабораторного подтверждения диагноза с целью идентификации и дифференциации бруцелл используют ПЦР. За короткий срок можно установить ДНК бруцелл в патологическом материале [30].

Молекулярно-генетические методы диагностики. ПЦР относится к молекулярно-генетическим методам диагностики и основана на специфической репликации определенных фрагментов ДНК вирусов и бактерий и в этой связи более чувствительна и специфична [30].

ПЦР является одним из перспективных подходов для выявления и ускоренной идентификации бруцелл. С точки зрения некоторых авторов, ПЦР применяют не только для выявления больных бруцеллезом животных в неблагополучном хозяйстве, но также в благополучных регионах, где не регистрируется инфекция, а возникают ложноположительные реакции [59].

Серологическая диагностика. Серологическая диагностика бруцеллеза основывается на принципе взаимодействия антител со специфическим антигеном. Диагностика бруцеллеза у крс и мрс с использованием серологических методов нашла применение широкое на практике. Из указанного метода практики используют РА, РСК, РДСК, РИД с О-ПС АГ, РНГА и РБП [26, 90, 126, 142].

Реакция агглютинации. Метод предложили впервые в 1897 г. Райт и Симпл для диагностики бруцеллеза. При использовании РА можно было установить наличие бруцеллеза у человека или мальтийской лихорадки, как ее называли в то время. В последующем изучению РА уделялось большое внимание со стороны советских и иностранных исследователей. Реакция агглютинации основана на способности иммуноглобулинов (агглютининов) сыворотки крови бруцеллезных больных агглютинировать возбудителя, с последующим выпадением в осадок комплекса Jg+антиген. Агглютинины появляются в сыворотке крови в начальный период после заражения животного. Сроки их появления и интенсивность РА зависят от дозы и вирулентности бруцелл и реактивности организма животного. Наиболее высокие показатели титров агглютининов наблюдаются в период генерализованной инфекции. По мере затухания инфекционного процесса титры РА постепенно снижаются. Тем не менее, эта реакция сохраняется еще некоторое время после исчезновения клинического проявления

бруцеллеза и даже тогда, когда заболевание переходит в хроническую форму. Агглютинины временно на 1-2 месяца и более могут выпадать, наблюдается колебание их титра. Отечественные и зарубежные ученые опубликовали много научных работ изучая РА. Исследователи определили большую специфичность и диагностическую значимость реакции. От активности антигена, который используется в реакции, в первую очередь зависит и чувствительность. Установлено, что для получения антигена с высокой активностью существенное значение отведено подбору штамма и технике его изготовления. Лишь S-форма штамма и хорошие агглютинабельные свойства пригодны для этой цели. В начальный период (первичная латенция) реакция агглютинация не может выявить всех зараженных животных. При генерализованной инфекции у животных в РА результаты всегда положительные. При хроническом течении бруцеллеза у животных большинство сывороток крови в РА не реагируют, но у некоторых животных, которые переболели, реакция может быть. При естественном заболевании крс бруцеллезом агглютинины в сыворотке могут варьировать в широких диапазонах. По данным многих авторов РА при бруцеллезе бывает положительной в пределах 15-45 дней после заражения, а в ряде случаев – 3 месяца, соответственно. Ряд исследователей высказывает мнение, что на появление по срокам в сыворотке крови агглютининов влияют доза возбудителя и индивидуальные особенности организма животных. Рядом работ показано наличие положительных результатов в РА только через 7-17 дней у овец, которые абортировали. У 25% исследованных сывороток крови, полученной в первые дни после аборта, нет в РА положительной реакции. Титр агглютининов растет только спустя 4-7 дней. Титры в реакции агглютинации сомнительные в течении 4 дней после аборта [126].

Исследователи показали взаимосвязь наличия в молоке бруцелл у зараженных животных и титрами АТ в сыворотке крови. Установлено, что, когда титры АТ в РА высоки, идет генерализация процесса с высокой

опасностью для других животных и окружающей среды по причине выделения бруцелл [12].

Одновременно разными исследователями отмечены случаи отрицательных результатов РА в период выделения животными культур бруцелл. Ряд ученых полагают, что отрицательные результаты РА не является показателем не выделения [126].

Был проведен высев от абортированных плодов и молока, предварительно проведя анализ результатов серологических реакций у овец (141 сыворотка крови). В результате исследований было показано, что РА периодически до 6-7 месяцев была стабильно положительной – 1:50 и более (22,6% животных). У 22% реакция была неизменно отрицательной. 55,3% имели вариацию титра агглютинации в РА, вначале отмечалось колебание агглютинационного титра, т.е. в начале отрицательная, сомнительная, положительная и наоборот. И было установлено, что бруцеллы долгое время выделялись из молока при отрицательных результатах в РА [73, 74].

Одной из модификаций РА является пластинчатая РА с использованием окрашенного АГ бенгальским розовым. Суспензирование было осуществлено в буферном физиологическом растворе с рН 3,65 [126].

Пластинчатая агглютинация разработана в США, где использовали кислый окрашенный забуференный АГ, который взаимодействовал с плазмой крови. Английскими исследователями предложена модификация, где используется сыворотка крови и данная реакция получила название – роз бенгал проба (РБП) или роз бенгал пластинчатый тест. Многие отечественные и зарубежные авторы считают РБП специфичной и чувствительной при бруцеллезе, а преимущество в ранней способности обнаруживать животных, которые заражены [57, 58].

При контроле времени для разных категорий ветеринарных специалистов при постановке РА, РСК и РБП, внедрение в лабораторную

практику РБП значительно сократило затраты и позволило снизить годовые экономические затраты [132].

При исследовании на бруцеллез крс из неблагополучных хозяйств, в количестве 6175 голов, установил, что положительно реагировали – 215 гол. в РСК, - 580 в РА и – 813 в РБП. Полученные реакции совпали между собой, - 376 в РА и РБП, - 156 в РСК и РБП, - 128 в РСК и РА, - 112 в РСК, РА и РБП. Автор показал, что у РБП выше чувствительность, над другими реакциями при серологических исследованиях крс [57, 58].

Проведенными исследованиями сывороток овец в РБП наряду с РА, РСК и РДСК было установлено превосходство первой реакции. Из 245 проб сывороток РБП выявила 8 проб положительных, а остальные три – только 6. [139, 140].

У северных оленей рекомендуют использовать для диагностики пластинчатую РА [15].

Сравнительные испытания РА, РБП и РДСК позволили показать для ранней диагностики высокую чувствительность РБП, показатели которой превосходили РДСК и РА, взятые вместе. По результатам РБП можно выявить специфические антитела, но невозможно судить о них количественно. РБП в стране внедрена в повседневную лабораторную практику и используется для исследования животных первично. В РСК и РА проводятся исследования сывороток, которые дали положительный результат РБП [60].

Реакция ссыывания комплиментa. При бруцеллезе животных РСК была испытана Гольтом (Holt) еще в 1909 году. В последующем эту реакцию изучали отечественные и зарубежные ученые. Было определено, что РСК специфична и чувствительна для диагностики бруцеллеза. Большинство авторов отметили превосходство РСК над РА, в связи с большим числом выявляемых животных, которые заражены бруцеллезом. При сравнительном испытании РСК и РА установили превосходство РСК по чувствительности, но заменить РА невозможно. Исследователи

показывают, что чувствительность и специфичность в РСК зависят главным образом от качества АГ [57, 58].

Многие исследователи, изучая РА и РСК с сывороткой, полученной от больных бруцеллезом животных и разной давностью инфекции, выявили, что комплементсвязывающие антитела сохраняются дольше, но обнаруживаются позднее агглютининов. Другие авторы, указывают, что первично появляются комплементсвязывающие АТ, при этом агглютининов вообще нет, или одновременно появляются оба типа АТ. В исследовании животных, находящихся в старых изоляторах, РСК выявила два раза больше животных, чем РА. РСК ценный диагностический тест при бруцеллезе животных и может быть использован при хронической или острой форме течения. Одновременно эта реакция не может выявить всех животных, которые инфицированы. Иногда в РСК бывает и отрицательный результат, а в РА положительный. В этой связи РСК не заменяет РА [126].

Показана вероятность повысить чувствительность РСК, когда температура течения реакции 4°C. Постановка РДСК являлась сложной, и нельзя было исключить вероятность адсорбции неспецифической комплемента. Высокие расходы комплемента, громоздкость при постановке РДСК ограничивали использование РДСК в лабораторной практике [46, 47].

Была предложена менее сложная РДСК, которая изменялась и уточнялась другими исследователями. Были также предложены модификации РСК. Показано, что РДСК превосходит РСК, а количество сомнительных результатов меньше, но при этом в РДСК не все сыворотки животных, которые больны бруцеллезом, взаимодействуют в данной реакции [29].

Кольцевая реакция с молоком. Реакцию для диагностики бруцеллеза у дойных коров предложил Fleischhauer O. Принцип реакции основан на взаимодействии специфических антител, находящихся в молоке, с окрашенным АГ, идет агглютинация. Комплекс АГ-АТ, который

образовался, подвергается адсорбции молочным жиром (шариками). Шарики всплывают вверх к слою сливок. В результате чего образуется кольцо синего цвета, при этом происходит обесцвечивание остальной части молока [126].

При сравнительном исследовании между КР и РА с РСК, с отбором проб от большого количества животных, было установлено приблизительно одинаковое количество положительных проб [29].

Для диагностики бруцеллеза КР с молоком очень специфична. В КР с молоком, по сравнению с РСК, показатель положительных результатов у коров выше на 34,8%. При сравнении с РА, КР с молоком позволяет выявить животных – 52%. Нет положительных результатов у 24%, когда положительные результаты получены в РСК и РА. У лактирующих коров КР с молоком очень доступный экспресс-метод для диагностики бруцеллеза. Наличие субклинических маститов не влияют на результаты КР с молоком [22].

Но КР с молоком имеет ряд недостатков. По мнению Silva, Junior F.F., у здоровых особей возможны неспецифические реакции, обусловленные субклинической и клинической формами маститов. Другим недостатком КР с молоком можно включить нестабильные показания, связанные с нахождением специфических антител в вымени, в разных долях [33, 86, 88].

С 1996 года КР с молоком официально вошла в систему борьбы с бруцеллезом в РФ, ВП «Бруцеллез» и ГОСТ по лабораторной диагностике бруцеллеза (серологические методы) [26, 90].

Иммуноферментный анализ. За рубежом и в нашей стране широко используется ИФА для диагностики у человека и животных бруцеллеза, на основе твердофазного метода, когда АТ или АГ вступают во взаимодействие с сенсibilизированными на полистероловый планшет АГ (или АТ). После этого образовавшийся АГ-АТ комплекс реагирует с антивидовой сывороткой, которая помечена ферментами, и затем

выявляют весь комплекс, добавляя субстрат фермента. Широко используют получаемую из хрена пероксидазу, которую используют для изготовления конъюгата.

ИФА достаточно изучен и имеет высокую ценность для диагностики. Помимо РСК, РА, РБП, КР с молоком, РНГА, ИФА позволяет обнаруживать большее число животных больных бруцеллезом [111].

Ряд авторов отмечают у ИФА низкую чувствительность. Так, Byrd T. et al., Ruppaner R. высказывают мнение, что ИФА имеет низкую чувствительность перед РА, но превосходит РСК. Hinchliffe P. и Butler T.E. et al. показали чувствительность ниже у ИФА, в сравнении с методом Кумбса [126].

Многие отечественные ученые изучали ИФА. Была показана ценность диагностики этим методом, высокая чувствительность и специфичность. Данные показатели были установлены в экспериментах на животных лабораторных, а также исследовании людей при стадии заболевания, хронической и острой. В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи разработана тест-система ИФА для выявления бруцеллезных АТ и АГ, которая применяется в настоящее время в практической медицине. Подтверждено превосходство ИФА над различными классическими серологическими реакциями. Можно использовать провокацию АТ (иммунологическая память) для выявления животных, которые латентно больны. Черта, которая характеризует иммунологическую память, это усиление биосинтеза IgG-антител, в том числе соотношение количественное IgG и IgM, которое зависит от различных факторов: возраста реципиента, вида, свойств биологических и физико-химических, дозы антигена [51].

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). По единодушному признанию отечественных и зарубежных исследователей диагностика бруцеллеза этой реакцией наиболее перспективна, как и для многих других бактериальных и вирусных заболеваний у людей и животных [85].

Реакция основана на агглютинации гомологичного антигена и антител с адсорбированными на эритроцитах антител (антигена), которые имеют разный химический состав (разные белки, липополисахариды, полисахариды и др.) [26].

Из работ выдающихся физиологов известна адсорбционная способность эритроцитов, которые на своей поверхности способны переносить питательные вещества тканям и клеткам. Биохимики в своих работах показали перенос эритроцитами антител, бактериальных токсинов, продуктов распада бактерий. Другие исследователи показали адсорбцию на эритроцитах адреналина, аминокислот, полипептидов, гистамина, разных ферментов и др. Полученные результаты послужили основой для создания диагностических эритроцитарных наборов на основе РНГА. Указанная реакция в последние годы вошла в диагностическую практику лабораторий при разных инфекционных болезнях [126].

Для диагностических целей с бактериальными антигенами РНГА была использована А. Т. Кравченко и М. И. Соколовым. В щелочной среде из бактериальных клеток извлекали полисахаридный антиген, адсорбировали на эритроцитах человека группы 0 и тотчас соединяли с диагностической сывороткой. Метод не требует выделения чистых культур бактерий, т. к. адсорбцию антигена можно проводить непосредственно из патологического материала. С помощью этой методики удавалось обнаружить такое количество антигена в 1 мл солевого р-ра, которое соответствует 50-100 млн. микробных тел, определяемых по оптическому стандарту. Методику РНГА на стекле для обнаружения разных видов микроорганизмов разработали Соколов М.М. и Кравченко А.Т. После опубликования их работ, через два года предложен пробирочный метод РНГА и РТНГА австрийскими учеными Keogh с соавт. [11, 126].

С.В. Бойден предложил для непрямой (пассивной) РНГА использовать эритроциты с адсорбированным на них АГ. Результаты его исследований показали, что на нативные эритроциты можно посадить АГ

липополисахаридные или полисахаридные, а белковые АГ нет. Он разработал для непрямой (пассивной) РНГА для посадки белковых АГ обработку нативных эритроцитов, используя слабый раствор таниновой кислоты. Эритроциты являются носителями АГ и выступают в реакции индикатором [11].

Т. Русај в 1956 г. усовершенствовал методику Бойдена. Он предложил сенсibilизацию эритроцитов АГ для выявления разных АГ. Предложено использование сывороток, которые содержат специфические иммуноглобулины на эритроцитах, путем адсорбции. РНГА по Т. Русај можно использовать для обнаружения АГ, а также для титрации сывороток, в РТНГА (феномен гашения) [11].

Токсины ботулинистические, столбнячные и гангренозные были обнаружены Конниковой Р.Е. Отечественные ученые разработали разные варианты РНГА. Но существовала проблема, происходил быстрый лизис сенсibilизированных нативных эритроцитов, поэтому широта применения была ограничена. Существовала проблема сохранения сенсibilизированных нативных эритроцитов, их консервация. Из всех испытанных способов наиболее эффективным показал себя метод формализации. Данный метод позволил сохранять эритроциты, которые были сенсibilизированы АГ, с длительным сроком хранения и стойкие [126].

Механизм прохождения РНГА еще недостаточно изучен. S. Boyden показал в этой реакции две фазы: а) меняются поверхностные свойства эритроцитов в результате адсорбции антигенов; б) последующая адсорбция на сенсibilизированных эритроцитах антител и образование конгломератов [11].

Одним из важных элементов для оптимальной сенсibilизации эритроцитов стало наличие электролита. У АГ очень хорошо происходит адсорбция на эритроцитах, когда присутствуют раствор хлористого калия или другие (уксуснокислый натрий, хлористый натрий (изотонический)).

Адсорбция на нативных эритроцитах АГ полисахаридных подчинена изотерме адсорбции Фрейндлиха. Сенсibilизация эритроцитов является процессом физиологической адсорбции не обычной, выступает как одна из ее разновидностей, так как процесс активно происходит при температуре 37⁰С, а при 5⁰С процесс приостанавливается. Процесс сенсibilизации эритроцитов носит и биологический характер. Степень сенсibilизации эритроцитов также зависит от температуры. Механизмы химической и физической адсорбции участвуют в процессе сенсibilизации. Воздействие на эритроцит этиологических агентов бактериальной и вирусной природы и процесс агглютинации получило название непрямая реакция гемагглютинации. Реакция имеет неспецифическую природу. Принцип основан на способности АГ бактерий и вирусов адсорбироваться на эритроцитах с агглютинацией последних [126].

Исследователи определили липидную природу рецепторов эритроцитов, где АГ присоединяется. Это предположение экспериментально подтверждено, когда делались попытки сенсibilизировать эритроциты АГ полисахаридной природы в присутствии холестерина и лецитина, процесса не происходило. Исследователями, отмечена высокая адсорбционная способность у холестерина в связи с бактериальными полисахаридами. Определено, что АГ бактериальные вступают во взаимодействие с липидами, которые являются рецепторами и находятся на поверхности эритроцитов [126].

Показана способность сенсibilизации эритроцитов несколькими АГ. Создание поливалентных диагностических наборов имеет прикладное значение [175, 176, 177, 178].

В настоящее время РНГА нашла широкое применение в целях диагностики различных заболеваний инфекционной природы. Возможность применения РНГА установили при туберкулезе [70].

Возможность использования РНГА при паратуберкулезе показана рядом исследователей [3].

Есть данные о высокой чувствительности РНГА при диагностике дизентерии [126].

Шмутер А.М. создал устойчивый эритроцитарный дизентерийный диагностический набор. У больных дизентерией в РНГА в 93,3% случаях были получены положительные результаты, а 29,5% – бактериологическим методом. Исследователи показывали возможность использования экстракта, полученного из кокковой группы микроорганизмов для сенсibilизации эритроцитов, а именно адсорбция АГ из стафилококков и агглютинация эритроцитов. Возможность применения РНГА для определения АГ и АТ в патологическом материале подчеркивают зарубежные и отечественные ученые при инфекционных заболеваниях: брюшном тифе, листериозе, лептоспирозе, холере, дифтерии, кокковых инфекциях и др. РНГА использовали при чуме, коклюше, туляремии и других вирусных болезнях, используя сыворотку крови людей. Некоторые ученые для определения возможности диагностики риккетсиозов, столбняка и токсоплазмоза также применяли РНГА [126].

РНГА при бруцеллезе была впервые апробирована Carrera L., Roux J.. В сенсibilизации эритроцитов АГ *B. suis* была использована надосадочная жидкость, которую использовали для постановки РА, и экстракт водных бруцелл. Ряд исследователей в качестве АГ использовали *B. abortus*, полисахаридную фракцию. Brodhage и Feу использовали бруцеллезную взвесь, убитую фенолом, с прогреванием при 37 °С. С использованием РНГА обнаружены АТ у иммунизированных и больных людей в сыворотке крови, при отсутствии таковых в других серологических реакциях.

Все более очевидной становится принципиальная возможность замены различных реакций методом непрямой гемагглютинации на основе использования эритроцитарных диагностикумов. В эксперименте при введении большой дозы вакцины против бруцеллеза морским свинкам гемагглютинины и агглютинины обнаруживались после иммунизации у

животных спустя 5 суток. Через 15 суток АТ обнаруживались в РА и РНГА в высоких титрах у животных, которые были подвергнуты вакцинации. Спустя 45 суток после вакцинации и позднее постепенно титры снижались в обеих реакциях, при этом гемагглютинины в более высоких титрах сохранялись во всех случаях. У отдельных животных при исследовании сыворотки крови через три месяца после вакцинации РНГА была отрицательной, но к 4-5 месяцам появлялась вновь [53, 54].

Исследование сывороток от больных животных бруцеллезом показало высокую чувствительность в трудах С.Г. Хаирова, Е.С. Слепцова, Е.И. Скаршевой, Chappel R.J. [58].

На крс и морских свинках была показана высокая чувствительность РНГА при бруцеллезе. У морских свинок на 3-й день после иммунизации штаммом 19 удалось выявить АТ специфические в титрах 1:640-1:1280. В РА агглютинины выявлены позже на 5-7 день исследования, в разведении 1:20-1:80. У крс гемагглютинины выявлялись в высоких титрах на 3-й день после иммунизации при титре агглютининов 1:25-1:50. Анализ исследований показал превосходство по чувствительности РНГА над РДСК, РСК и РА [55, 56].

Леви М.И. для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных АТ предложил РНГА. Реакция ставилась параллельно в РСК, РА и РБП. Для сенсibilизации эритроцитов барана был использован АГ, приготовленный по методике Тульчинской В.П., с использованием диэтилового эфира. В исследованиях автора на крс, иммунизированного в разные сроки вакцинации 1,5-4,0 и более лет, результаты в РНГА были отрицательными, а в РБП, РСК и РА положительные. Исследование сывороток крови в РНГА коров больных и с клиническим проявлением бруцеллеза позволило выявить больше положительных результатов, по сравнению с другими реакциями. А именно, в РНГА у животных реагировало 89,6%, РСК – 56,1% и РА – 16,4%. Исследователь рекомендует применять РНГА для

дифференцировки животных, вакцинированных и больных бруцеллезом в разные после иммунизации сроки. Большой объем исследований бруцеллеза был проведен в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Там были испытаны различные способы для РНГА изготовления АГ бруцеллезного и усовершенствованы методики проведения реакции. Авторы утверждают, что лучшими антигенами для сенсibilизации эритроцитов применяемых для постановки РНГА являются белково-полисахаридный комплекс и полисахариды, полученные из S-формы бруцелл [19, 57, 58].

Был разработан метод приготовления АГ бруцеллезного для РНГА. Автор для создания диагностического набора рекомендует осуществлять сенсibilизацию эритроцитов, формализованных и танизированных, экстрактом, полученным из 3-х видов бруцелл, и использовать следующие референтные штаммы (*B. abortus* 544, *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16M), применяя детергент - дезоксихолат натрия [19, 84,94].

Проведены сравнительные испытания РНГА, с другими реакциями, РА. Для исследований были отобраны сыворотки крови людей больных и вакцинированных против бруцеллеза. Автором была установлена чувствительность выше РНГА, над РА. В экспериментах при подкожном заражении морских свинок с использованием культуры вирулентной *B.melitensis* была установлена ранняя выявляемость животных положительно реагирующих в РНГА, по сравнению с РА. В РА после заражения, 10 и 15 день, у 10 морских свинок, участвующих в эксперименте, результаты были отрицательны, а в РНГА реакция была у 2 гол. спустя 10 дней и 6 гол. реагировало спустя 15 дней. В РНГА спустя 30 дней РНГА была положительна у всех морских свинок, а в РА все результаты были отрицательны [91, 92].

Исследования на зараженных северных оленей бруцеллезом и исследования сывороток больных позволило получить аналогичные результаты. Установлено, что диагностика с использованием РНГА имеет

более высокую чувствительность при хроническом и остром течении бруцеллеза крс. Согласно ее данным, ей удалось дополнительно обнаружить РНГА до 30% животных, которые были больны [94, 107, 108].

По данным зарубежных авторов РНГА обладает специфичностью, чувствительностью и может быть применена для диагностики бруцеллеза, в том числе которой вызван штаммами бруцелл – атипичными. Наряду с этим, она выявляет гемагглютинины у телят, полученных от коров больных бруцеллезом, не реагирующих в РА. С использованием РНГА были установлены гемагглютинины, их появление в сыворотке крови, после внесения на конъюнктиву *B.abortus*. Реакция в РНГА была положительной после заражения у большинства на 2 день, а у всех оставшихся – на 7 день. В РНГА повышенные титры – 1:1600 были отмечены у животных, зараженных бруцеллезом в сроки выделения с влагалищной слизью бруцелл. Исследователи характеризуют РНГА эффективным инструментом диагностики при бруцеллезе. Ценность заключается в выявлении больных бруцеллезом животных и профилактике у крс [126].

Для диагностики у телят бруцеллеза перед вакцинацией рекомендуется применять РНГА с АГ, полученным путем сенсibilизации эритроцитов танализованных *B. abortus*¹⁹. Для сенсibilизации использован экстракт бруцелл, подвергнутых разрушению ультразвуком. Ценность диагностического эритроцитарного диагностикума для РНГА исследователь изучил на телках в количестве 1158 гол.. У животных в хозяйствах с разным состоянием эпизоотической обстановки по бруцеллезу процент реагирующих животных в РНГА был выше, чем в РДСК и РА [44, 45].

Большой объем работ по разработке методов приготовления АГ бруцеллезного для РНАт и РНГА провел Садыков С.Ж.. Исследователь рекомендовал получать активный АГ путем экстракции бруцелл на буфере ацетатном при температуре 110-115⁰С со временем экспозиции 30 минут. Чувствительность и специфичность РНГА на лабораторных животных,

сельскохозяйственных и людях, которые были проведены другими исследователями, показывают большое превосходство РНГА над другими серологическими реакциями: РСК, РА, реакция Хедельсона и другие [57, 58, 94].

Для диагностики бруцеллеза отдельными исследователями предложены и другие модификации РНГА, в частности РНГем, РТНГА и РНАт. В 1950 г. Middlebrook, Keogh, Fischer для обнаружения АТ или АГ применяли РНГем эритроцитов. Суть реакции включает добавление в систему эритроцит-АГ-АТ компонента. Когда происходит специфическое взаимодействие и соединение АГ, адсорбированного на эритроцитах, с АТ, при добавлении компонента происходит гемолиз эритроцитов. Но на практике РНГем эритроцитов значимости не получила ввиду того, что для этой реакции необходимы нативные эритроциты. РТНГА применяется при проверке РНГА специфичности и выявления гомологичных АТ и АГ. Принцип реакции основан на нейтрализации АГ или АТ, гомологичных АТ или АГ, в процессе которого идет задержание гемагглютинации или снижение в РНГА титра [126].

РНАт используется для ускорения индикации многих возбудителей инфекционных заболеваний. Сущность реакции заключается во взаимодействии сыворотки положительной с АГ, после сыворотка утрачивает свойство эритроцитов агглютинировать, сенсibilизированные АГ гомологичным. Значение для диагностики РНАт при разных инфекционных заболеваниях многими исследователями было высоко оценено [48, 49, 50, 51, 57, 58].

1.4 Профилактические мероприятия и борьба с бруцеллезом

Значительная роль при бруцеллезе животных в настоящее время отведена специфической профилактике. Для науки ветеринарной, так и для медицинской, а также для практики проблема существовала и существует по сей день. Необходима вакцина, которая обладает высокой

иммуногенностью и в практическом аспекте удобная в применении. Разработанные и применяемые вакцины имеют свои недостатки и преимущества. Первые исследователи придерживаются мнения о применении только живых вакцин, которые обладают высокими аглютинногенными свойствами [118], вторые – сторонники использования для производства вакцин неаглютиногенных штаммов и их применение [61, 67, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 106, 133] и другие, третьи сторонники ищут (химические) инактивированные вакцины [15, 16, 87, 114].

Наивысший успех борьбы с бруцеллезом за 40-летний период был достигнут ранее в СССР, далее в России, который подтвердил высокую эффективность и главную роль в ликвидации направленными мерами специфической профилактики [1, 2, 97].

Применение для производства вакцины штамма *B. abortus* 19 и ее внедрение 1954-1970 гг. резко сократило клиническое проявление бруцеллеза, позволило ликвидировать очаги инфекции, многократно снизить эпидемиологические и эпизоотологические статистические данные о регистрации болезни [1, 2].

Несмотря на достигнутые результаты, в научной среде и практике возникла дискуссия о необходимости использования вакцины из штамма *B. abortus* 19. Данное обстоятельство было обусловлено, что вакцина из штамма *B. abortus* 19 вызывает длительную поствакцинальную серопозитивность, которая не показывает, что происходит с животными, следовательно, общую эпизоотическую обстановку в хозяйстве, и что мешает оздоровить хозяйство. По этой причине в 1970 г. произошел отказ от применения вакцины для реиммунизации крупного рогатого скота (коров) из штамма *B. abortus* 19. Использование этой вакцины двукратно на телках в возрасте 3-6 месяцев, а также до осеменения не помогло защитить взрослое поголовье от бруцеллеза, и привело к росту числа больного скота и увеличению числа неблагополучных пунктов [1, 2].

Проведенными исследованиями и изучением штаммов бруцелл для создания вакцины был предложен самый перспективный штамм *B. abortus* 82 (ВНИВИ, г. Казань), автор профессор К.М. Салмаков К.М. [95, 96, 97, 98, 99, 100, 101].

Полученные результаты по использованию вакцины с использованием штамма *B. abortus* 82 были подтверждены исследователями в других ветеринарных научных учреждениях страны. Производственный для вакцины штамм *B. abortus* 82 не раз комиссионно проверяли на государственном уровне. Были проведены проверки штамма *B. abortus* 82 государственной комиссией как экспериментально на лабораторных животных, так и условиях производства на крс. Вакцина изготовленная из шт. *B. abortus* 82 имеет слабые агглютиногенные свойства и высокие иммуногенные свойства [1, 2, 43].

В условиях производства вакцину живую нативную из штамма *B. abortus* 82 первоначально испытали в ряде хозяйств Татарстана и Куйбышевской области, а после в трех регионах России на крупном рогатом скоте. Разработанная вакцина сухая живая, которая была изготовлена на Щелковском биокомбинате, была применена во второй половине 1974 года в шести регионах страны. В 1975 году вакцина применялась у крс всех возрастов на территории 10 Союзных Республик, 34 региона РСФСР, республики Средней Азии и Закавказья, Казахской ССР.

По итогам полученных результатов и подведения итогов на координационном совещании после заслушивания научных отчетов организаций исполнителей Научно-технических программ по исследованиям общего союза и между отраслями, которое прошло в г. Кустанай, 1988 г. была установлена высокая эффективность применения вакцины из штамма *B. abortus* 82 для проведения противоэпизоотических мероприятий. С 1988 года на основании приказа Главного ветеринарного управления Минсельхоза СССР вакцина сухая живая из штамма *B. abortus*

82 была широкомасштабно внедрена в практическую ветеринарию для борьбы у крупного рогатого скота с бруцеллезом. Для использования вакцины в соответствии с действующим законодательством была разработана в соответствии с требованиями нормативная документация. Исходя из разнообразных форм проявления в регионах, районах и хозяйствах, эпизоотического статуса и используя полученный производственный и экспериментальный опыт, для использования разработанной вакцины на животных были определены главные схемы иммунизации. Создание иммунитета и ранняя диагностика после вакцинации, 3-6 мес. вместо 2-3 лет при использовании вакцины из штамма 19, позволило снизить эпизоотическую обстановку по бруцеллезу. Для сведения в 1974 г. в РФ регистрировалось неблагополучных пунктов – 5305, применение вакцины с использованием комплекса оптимизированных специальных мер позволило к 2001 году снизить их до 70, общее количество сократилось в разы и снизилось в 75 раз. Аналогичное снижение произошло и по количеству больных бруцеллезом крупного рогатого скота, 74 году XX века больных бруцеллезом животных было 268,8 тыс. голов, а 1 году XXI века количество осталось 5,4 тыс. голов [95, 96, 97, 98, 99, 100, 101].

Разработанные схемы специфической при бруцеллезе профилактики, которые были внедрены с применением вакцины изготовленной из штамма *B. abortus* 82, позволило оздоровить в РФ многие регионы. Большим и важным достижением происходящего явилось массовое снижение заболевания людей этой инфекцией [1, 2].

Очень хороший результат применения вакцины, изготовленной из штамма *B. abortus* 82, получен многими исследователями и практическими специалистами на северных оленях, буйволах [4, 5], маралах [117], яках и свиньях [1, 2, 136, 137].

Вакцину, изготовленную из шт. *B. abortus* 82 в настоящее время успешно и широко используют в РФ во многих субъектах, в комплексе

специальных противоэпизоотических мер на крс при бруцеллезе. Коров и телят подвергают ежегодной иммунизации в количестве 3-4 млн. голов, включая реиммунизацию, согласно ветеринарно-санитарных мер. Начинают иммунизировать телок в возрасте 4-5 месяцев и потом проводят ревакцинацию спустя 10-12 месяцев перед осеменением в благополучных субъектах. В районах благополучных по бруцеллезу, которые находятся на границе с неблагополучными, осуществляют реиммунизацию коров сразу после отела и в последующем два года подряд. Ежегодной вакцинации подвергают коров в районах, которые являются неблагополучными. У крупного рогатого скота останавливают вакцинацию, если прошло четыре года, когда хозяйство было оздоровлено, и отсутствуют хозяйственные и иные связи с приграничными неблагополучными территориями [95, 96, 97, 98, 99, 100, 101].

Использование вакцины и широкое применение штамма *B. abortus* 82, первый раз вводимой нетелям и коровам на разной стадии стельности, у которых отсутствовал иммунный фон против бруцеллеза, вызывало осложнение после вакцинации в виде абортос и др. Слабоагглютиногенная вакцина у некоторых животных после ревакцинации и воздействия разных факторов, давала положительные результаты в РА, особенно в отдаленные сроки после введения вакцины в РСК, что было не предусмотрено инструкцией по использованию вакцины. В этой связи остро возникла необходимость, что после использования вакцины из штамма *B. abortus* 82, необходима дифференциальная диагностика. Несмотря на большие успехи, которые были достигнуты в борьбе с бруцеллезом на основе вакцины изготовленной из шт. *B. abortus* 82 у крупного рогатого скота, научно-исследовательские и экспериментальные работы по усовершенствованию мер борьбы с созданием средств профилактики и диагностики продолжаются [1, 2].

Исследователями в результате генетических экспериментальных целенаправленных исследований был создан новый вариант вакцинного штамма *B. abortus* 82-ПЧ (пенициллин-чувствительный). Было проведено изучение и испытание на крупном рогатом скоте, кроликах и морских свинках нового варианта вакцинного штамма *B. abortus* 82-ПЧ [135].

Исследователями Алт.НИВС, совместно с ВГНКИ, была разработана вакцина живая сухая из штамма *B. abortus* 75/79-АВ. Вакцину применили в 41 районе Алтайского края для ее изучения и определения эпизоотологической эффективности. В результате производственных испытаний было определено, что вакцина обладает достаточной иммуногенностью, слабой агглютиногенностью и отсутствием abortогенности. С учетом полученных положительных результатов испытаний вакцины Депветеринарии Минсельхоза РФ решил расширить внедрение вакцины для испытания на территорию других субъектов РФ, в частности на территории Астраханской области и продолжить исследования в Алтайском крае. Для реализации цели было изготовлено 196 тысяч доз вакцины (15 серий) на Приволжской биофабрике [68, 134].

При использовании производственного вакцинного штамма *B. abortus* 19 было определено, что низкие дозы 3-5 млрд. микробных клеток при конъюнктивальном и подкожном введении, при первичном и повторном введении препарата крупному рогатому скоту вызывают длительный и напряженный иммунитет. Но уровень антител при таких дозах низкий, а в сыворотке крови срок их пребывания короткий. При введении в организм телок вакцинного штамма *B. abortus* 19 в дозе 80 млрд. микробных клеток, с дальнейшим подкожным введением этого же штамма в дозе 3 млрд. микробных клеток, формируют у животных продолжительный и напряженный иммунитет, что показывает перспективу использования. Способ конъюнктивального применения штамма *B. abortus* 19 в пониженной дозе 5 млрд. микробных клеток формирует у животных продолжительный и напряженный иммунитет [121].

Значительный научно-практический интерес вызвали материалы по исследованию, изучению и научно-практическому использованию в США вакцины живой из штамма *B. abortus* RB51 на крс и у других диких животных. В число диких животных входили бизоны и олени. [173].

Исследователями созданы разные штаммы *B. abortus*, обладающих антибиотикорезистентностью – стрептомицину, рифампицину, тетрациклину и другим. В ходе предварительного изучения полученных штаммов было установлено, что они слабоагглютиногенны, культуры представлены в RS-форме, имеют выраженные иммуногенные свойства и их можно использовать при бруцеллезе животных для сочетанной экстренной защиты [119, 122, 123, 124].

Исследователи, изучая иммуноморфогенез поствакцинального процесса при использовании разных антибиотикорезистентных штаммов *B. abortus*: штамм стрептомициноустойчивый – 82-Sr и тетрациклиноустойчивый – 82-Tg, установили, что у морских свинок в организме вызывает изменения как стереотипные, которые характеризуются иммуноморфологической перестройкой, которые проявляются плазмочитарной реакцией, макрофогальной и лимфоидно-гиперпластической реакциями. Указанные штаммы способны обеспечить защиту животных при заражении бруцеллезом с использованием вирулентных штаммов [105].

Исследователи провели исследования иммунобиологических характеристик штамма *B. abortus* 82-SR (стрептомицинрезистентного) и проверили возможность его использования для защиты, сочетанной при бруцеллезе. В результате экспериментов было определено, что в пластинчатой РА на стекле происходит агглютинация с «А» - монорецепторной, R- и S- бруцеллезными сыворотками, и был получен отрицательный результат взаимодействия с "М"- сывороткой. Колонии штамма *B. abortus* 82-SR лизировались "Тб" - фагом, была получена отрицательная проба термоагглютинации, а с акрифлавином

положительный результат. Установлен рост, где присутствовал эритритол, отсутствовала необходимость в повышенной концентрации CO₂, не было синтеза сероводорода и шел рост со стрептомицином на питательных средах [123].

Проведенные исследования противоэпизоотических мероприятий в Республике Дагестан у мрс при бруцеллезе с использованием штамма *B. melitensis* Rev-1 показали рост специфического иммунитета в популяции мелкого рогатого скота и стабилизацию эпизоотического процесса. Установлено, что при проведении комплекса противоэпизоотических противобруцеллезных мероприятий в овцеводческих хозяйствах с использованием вакцины из штамма *B. melitensis* Rev-1, не было установлено случаев прерывания суягности у овцематок, что показывает отсутствие abortогенных свойств данного штамма [143].

Сравнительное изучение вакцин живых, изготовленных с использованием разных штаммов *B. abortus* исследования на этом фоне применения иммуномодуляторов и оценка их эффективности показала, что наивысшая иммунологическая активность была у штамма 19, которая составила 100% эффективность на конвенциональных и СПФ морских свинок, далее штамм 82, что в относительном выражении составила 92,3% и 100%, соответственно, которые были в SR- и S-форме. В ходе экспериментов было установлено, что иммуногенность была ниже у RS-форм (штаммы 82-RTг и 82-ПЧ), а также R-форм(75/79-AB, RB51, R-1096), Данные иммунологических экспериментов, доказали превосходство штамма 82 (РФ) над 19 (США), а также превосходство в связи отсутствием практически у штамма 82 свойств инагглютиногенных, у штамма 19 выраженная и продолжительная серопозитивность при вакцинации морских свинок. Инагглютиногенными свойствами обладали и другие изученные штаммы: RB51, 82 ПЧ, 75/79-AB, 82-RTг, R-1096. Применение иммуномодуляторов ларифана и TNF-α позволило повысить иммуногенность вакцины из штамма *B. abortus* R-1096 (R-форма) на 17,2%

и 7,2%, соответственно. Комплексное сочетанное применение иммуномодуляторов, таких как полиоксидоний, тиосульфат натрия, ларифан повышала иммуногенность вакцины, на основе штамма *B. abortus* 82-RTr (RS-форма) возросла на 16,7% и составила 100 %. Экспериментально, путем заражения штаммом вирулентной культуры, установлена защита животных в 90% случаях, при совместном использовании шт. 82-ПЧ (RS-форма) с полиоксидонием (иммуномодулятор) и TNF- α . 40% было достигнуто без иммуномодуляторов. Предложены различные схемы применения иммуномодуляторов при бруцеллезе животных, с использованием различных штаммов *B. abortus* [102, 103].

При изучении гамма-инактивированных и живых противобруцеллезных вакцин и контроля их иммунологической эффективности в эксперименте на мелком рогатом скоте был продемонстрирован большой иммунологический эффект на овцах живой вакцины из штамма *B. Abortus* 82, экспериментальным путем получены и исследованы подвергнутые гамма облучению штаммы *B.melitensis* Rev-1, *B.abortus* 82, *B. suis* 86 на основе которых были созданы экспериментальные вакцины [62, 63].

Подходы в борьбе с бруцеллезом требуют усовершенствования системы профилактики, средств и методов диагностики.

1.5 Заключение по обзору литературы

Литературные данные свидетельствуют об актуальности проблемы бруцеллеза как для людей, так и для животных. Несмотря на изучение болезни, глобальная социально-экономическая проблема сохраняется, бруцеллез регистрируется в 155 государствах мира. Бруцеллез встречается во многих государствах Америки, Африки, Азии и Средиземноморья, государствах СНГ и России. Последние десятилетия показывают обострение эпизоотической обстановки в странах СНГ. Несмотря на

принимаемые меры, в нашей стране эпизоотическая и, соответственно, эпидемическая обстановка остается напряженной. Убытки складываются из потерь приплода, снижения продуктивности скота, яловости коров, выбраковки животных, больших затрат на ветеринарные, медицинские и другие мероприятия. Ежегодно в РФ регистрируются случаи впервые выявленного бруцеллеза у людей. В хозяйствах, где выявлен бруцеллез, экономические потери большие из-за аборт, яловости, потери продуктивности и многих других причин. В хозяйствах нарушена селекционно-племенная работа по воспроизводству поголовья. Поэтому ликвидация бруцеллеза имеет важное государственное значение.

В род *Brucella* включены виды, которые в дальнейшем подразделяются на биовары, способные вызвать заболевания у других видов животных, отличающиеся по ряду биологических свойств. В род *Brucella* входят *B. abortus*, где крупный рогатый скот является основным носителем, *B. melitensis*, где овцы, козы и верблюды носители, *B. suis*, где свиньи основной носитель, у пустынной крысы, установлено носительство *B. neotomae*, у овец установлено носительство *B. ovis*, у собак *B. canis*, у китов - *B. ceti*, тюленей - *B. pinnipedialis*, и у мышей-полевков - *B. microti*.

В РФ выявляют заболевание у многих видов животных. Виды *B. melitensis*, *B. abortus* имеют широкое распространение и представляют угрозу заболевания бруцеллезом людей. Бруцеллы при неблагоприятных условиях способны к диссоциации, трансформация S-формы в R-форму. Диссоциацию бруцелл можно вызвать искусственным путем, обедняя питательные среды, или создавая факторы, негативно влияющие на них. Бруцеллы существуют и в L-форме, которые появляются при применении химических препаратов и антибиотиков.

Значительная роль при бруцеллезе животных в настоящее время отведена специфической профилактике. Для науки ветеринарной, так и для медицинской, а также для практики проблема существовала и существует по сей день. Необходима вакцина, которая обладает высокой

иммуногенностью, и в практическом аспекте удобная в применении. Разработанные и применяемые вакцины имеют свои недостатки и преимущества. Первые исследователи придерживаются мнения о применении только живых вакцин, которые обладают высокими аглютининогенными свойствами, вторые – сторонники использования для производства вакцин неаглютиногенных штаммов и их применение и другие, третьи сторонники изыскивают (химические) инактивированные вакцины.

При бруцеллезе мелкого рогатого скота с использованием штамма *B. melitensis* Rev-1 показаны рост специфического иммунитета в популяции мелкого рогатого скота и стабилизация эпизоотического процесса. Установлено, что при проведении комплекса противоэпизоотических противобруцеллезных мероприятий в овцеводческих хозяйствах с использованием вакцины из штамма *B. melitensis* Rev-1 не было случаев прерывания суягности у овцематок, что показывает отсутствие abortогенных свойств данного штамма. Для производства вакцин для крупного и мелкого рогатого скота предложены разные производственные штаммы, некоторые из которых внедрены в производственную практику.

Ведущие ученые страны пришли к заключению, что бруцеллез относится к числу инфекционных болезней, где ликвидация заболевания должна строиться на диагностике. Во всем мире, начиная еще со времени открытия возбудителя болезни, проводятся исследования по усовершенствованию диагностики бруцеллеза.

В настоящее время применяются различные методы диагностики бруцеллеза, такие исследования как серологические, бактериологические, аллергические, а также молекулярно-генетические. Направления, связанные с диагностикой у сельскохозяйственного животного бруцеллеза, показаны различными методами исследований. Проведенные многократные исследования показали высокую чувствительность, специфичность реакций и возможность массового скрининга на бруцеллез

поголовья скота. Однако, когда исследование проводится однократно, невозможно выявить всех животных, которые инфицированы. Для оздоровления бруцеллезных хозяйств и ферм требуются комплексные исследования (серологические) многократные. Поэтому создание высокочувствительных средств диагностики, обладающих способностью оперативно и полностью выявлять животных, которые больны, научно-практическая задача. Наиболее широкое практическое применение из них получили РА, РБП, РСК, РДСК и КР.

Множественными исследованиями, которые проводились за рубежом и в нашей стране, показано, что представленные методы чувствительны, специфичны и их можно использовать в практике для диагностики бруцеллеза при массовых исследованиях, но многократность исследований снижает эффект противобруцеллезных мероприятий и продлевает оздоровительные мероприятия в хозяйствах. Одной из существующих реакций перспективна РНГА. Многократные серологические диагностические исследования у животных разных видов показали ее более высокую чувствительность и специфичность. Но использование ее в повседневной практике было затянато в связи с отсутствием стандарта и стабильного эритроцитарного антигена, обеспечивающего получение воспроизводимых результатов РНГА и малой изученности самой реакции

Одним из перспективных методов диагностики бруцеллеза, для практического применения многими исследователями признана РНГА. Все исследователи, изучавшие РНГА, отмечают ее высокую чувствительность и специфичность. По имеющемуся литературным данным, эта реакция специфична и чувствительна, характеризуется простотой и удобством постановки быстротой получения результатов. Кроме того, предложенные научно-исследовательскими учреждениями и отдельными исследователями методы приготовления бруцеллезного антигена, получаемого с помощью существующих методик, являются сложными и

количество конечного продукта незначительно, что не удовлетворяет запросы практической ветеринарии.

Учитывая вышеизложенное, нами проведены исследования по способам получения стандартного эритроцитарного АГ и АТ диагностикума для РНГА при бруцеллезе и изучение этой реакции для диагностики.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась с 2013 по 2020 гг., в лаборатории инфекционной патологии сельскохозяйственных животных Прикаспийского зонального НИВИ - филиал ФГБНУ «ФАНЦ РД», согласно тематическому плану НИР по заданию: «22. Молекулярно-биологические и нанобиотехнологические методы создания биопрепаратов нового поколения, технологии и способы их применения с целью борьбы с особоопасными инфекционными, паразитарными и незаразными болезнями животных» (№ госрегистрации 7.721017821.11.8.001.7). Общая структура исследований представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Общая структура исследований

Направления экспериментальных исследований
<ul style="list-style-type: none"> ➤ стабилизация эритроцитов и создание модификации метода; ➤ способа получения бруцеллезного эритроцитарного антигена; ➤ способа выявления противобруцеллезных АТ в молоке; ➤ исследования для дифференциальной диагностики, после применения вакцины из штамма <i>B. abortus</i> 82; ➤ способа получения бруцеллезного антительного диагностикума.

2.1.1 Материалы исследований

Для изготовления диагностикума были использован вакцинный штамм *B. abortus* 19.

Патологический материал: сыворотки крови больных бруцеллезом сельскохозяйственных животных, абортированные плоды.

Сыворотки крови здоровых животных.

2.1.2 Методы исследований

Применены различные методы диагностики бруцеллеза, такие исследования как серологические, бактериологические, а также молекулярно-генетические.

Серологические реакции: РНГА, РА, РСК, РДСК, РИД с О-ПС АГ, и РБП.

Для стабилизации эритроцитов использовали следующие методы:

- по Леви М.И. и др.;
- по Csizmas Z. в модификации Меньшова П.М. и Шмутера М.Ф. (1969);
- по Краскиной Н.А. и др.;
- по Вайнбаху Р..

Постановку ПЦР осуществляли согласно инструкции по применению.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Сравнительное изучение методов стабилизации эритроцитов и его модификация

На первом этапе наших исследований в сравнительном аспекте были изучены различные методы стабилизации эритроцитов для РНГА. Способ фиксации эритроцитов имеет значимость для создания эффективных диагностикумов. Существует значительное количество фиксирующих средств, разнообразны и условия стабилизации. Для АГ существуют великое множество различных носителей (бактерии, коалин, латекс, уголь и др.), но эритроциты признаны наилучшими носителями для изготовления тест-систем РНГА, и поэтому они нашли широкое распространение. Преимуществом эритроцитов является доступность и легкость получения. Их размер соответствует степени, которая позволяет видеть реакцию, и осуществлять невооруженным взглядом учет результатов. В этой связи, нами было решено применить ряд методов для стабилизации эритроцитов барана с использованием формалина и последующей сенсibilизации АГ

бруцеллезным (сенситин). Одним из важных этапов при этом подготовка эритроцитов для сенсibilизации.

Кровь от баранов отбирали в стерильные колбы. Используя стеклянные бусы проводили дефибрирование. Фильтрацию осуществляли через четырехслойную марлю, каждый раз отмывая физ. Раствором, используя центрифугу. Скорость вращения составляла 1500 - 2000 об/мин. Процедуру повторяли до тех пор, пока жидкость не стала прозрачной. Производили слив надосадочной жидкости. Осадок, который состоял из эритроцитов, разводили. Сравнительно изучили и оценили эффективность ряда способов стабилизации эритроцитов.

Первоначально изготовили стабилизированные эритроциты по разным методам: – 4 серии (М.И. Леви и соавторы); – 6 (Z. Csizmas в модификации П.М. Меньшова и М.Ф. Шмутера); – 5 (Н.А. Краскина и соавторы); – 10 (Weinbach R. с нашей модификацией).

После стабилизации эритроцитов различными методами, подвергли их сенсibilизации АГ бруцеллезным. Сенсibilизация эритроцитов АГ бруцеллезным была проведена в идентичных условиях, а полученные результаты исследований с агглютинирующей бруцеллезной сывороткой отличались в РНГА по серологической активности. Результаты испытаний способов стабилизации эритроцитов показаны в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты испытаний способов стабилизации эритроцитов

Антиген	Авторы стабилизации эритроцитов	Титр РНГА с агглютинирующей бруцеллезной сывороткой в зависимости от способа стабилизации эритроцитов
Липополисахариднобелковый комплекс, извлеченный из бруцелл по нашему методу	Леви М.С. с соавторами	1:1600
	Краскина Н.А. с соавторами	1:1600

	Меньшов П.И. и Шмутер М.Ф.	1:3200
	Weinbach R. в нашей модификации	1:25600

Как видно, проведенная стабилизации по Леви М.Н. и др. и Краскиной Н.А. и др. показывает невысокую серологическая активность, титр в РНГА (1:1600), с агглютинирующей бруцеллезной сывороткой. Кроме того, стабилизированные эритроциты по Леви М.Н. и др. долго не хранятся, через месяца 3-4 со дня срока изготовления, происходит спонтанная агглютинация их невозможно применять в РНГА. Изготовленные стабилизированные эритроциты по Краскиной Н.С. и др. сохранялись 4-5 мес., а затем отмечался гемолиз. Титр высокий 1:25600 при серологических исследованиях в РНГА был установлен нами при использовании метода Вайнбаха в нашей модификации. Способ П.М. Меньшова, М.Ф. Шмутера дал в РНГА титр 1:3200. Наилучшими свойства абсорбции обладали эритроциты, изготовленные по Вайнбаху в нашей модификации.

Для получения максимального выхода эритроцитов, которые не имеют признаков склеивания и гемолиза, сокращения времени их получения, нами был разработан способ получения стабилизированных эритроцитов на основе метода Weinbach R. в нашей модификации. Модификация заключалась в следующем, эритроциты подвергали формализации вместо 24 часов 15-16 часам в Шутетель-аппарате. Эритроциты подвергали встряхиванию в течение 1,5-2 мин. с получасовым интервалом, с отличием по Weinbach R., где это необходимо делать постоянно. За счет этого время сократилось, а в процессе эритроцитов было получено больше. В процессе получения эритроцитов склеивания и признаков гемолиза не было, который обычно наблюдается при постоянном 24 часовом встряхивании. Свойства адсорбции

стабилизированных эритроцитов не изменились, а срок годности был продлен и составил 2 года и более.

Сравнительные исследования разных методов стабилизации эритроцитов показали, что высокая активность эритроцитных рецепторов была у приготовленных по методу Weinbach R. в нашей модификации. Предложенный вариант является более приемлемым методом, так как нет продолжительного, грубого взбалтывания эритроцитов в суспензии, что позволяет получить 100% готовый продукт. При использовании метода П.Н. Меньшова, М.Ф. Шмутера теряемое количество эритроцитов составляет – 4,5%, – 35% по методу М.Н. Леви и соавт., – 30% по методу Н.А. Краскиной. Результаты наших исследований подтверждают превосходство стабилизации эритроцитов по Weinbach R. с нашими изменениями.

Стабилизацию эритроцитов по Weinbach R. в нашей модификации можно использовать для РНГА при изготовлении бруцеллезного эритроцитарного АГ, который широко внедрен в диагностику.

В дальнейших исследованиях нами применялся именно такой способ стабилизации эритроцитов, в частности, создание для РНГА бруцеллезного АГ эритроцитарного. Используя данный метод было изготовлено стабилизированных эритроцитов 150 серий. Два года сохранялась стабильность и адсорбция, при 4-6⁰С.

Изучении методов стабилизации эритроцитов установлена высокая эффективность метода Weinbach R. с нашей модификацией над другими методами: по Леви М.И. и др., по модификации П.М. Меньшова, М.Ф. Шмутера метода Csizmas Z., по Краскиной Н.А. и др.. Эритроциты, изготовленные методами М.И. Леви и соавторов, Z. Csizmas в модификации П.М. Меньшова, М.Ф. Шмутера, Н.А. Краскиной и соавторов имели небольшой срок годности, 3-4 месяца по методу Леви М.И. и соавторов, 4-5 месяцев по методу Н.С. Краскиной и соавторов, невысокую серологическую активность, титры в РНГА с

агглютинирующей бруцеллезной сывороткой составляли по методам М.И. Леви и др., и Н.С. Краскиной и др. – 1:1600, по способу П.М. Меньшова, М.Ф. Шмутера титры в РНГА достигали – 1:3200. Метод Вайнбаху в нашей модификации имел высокую серологическую активность в РНГА с агглютинирующей бруцеллезной сывороткой, с титром – 1:25600. В дальнейшем нами был использован только этот способ для стабилизации эритроцитов и получению АГ эритроцитарного бруцеллезного для РНГА, со сроком годности стабилизированных эритроцитов 2 года и более.

2.2.2 Изыскание способа получения бруцеллезного эритроцитарного антигена для РНГА

В последние годы в научно-исследовательских учреждениях мира большое внимание уделяется изучению диагностической ценности реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) при бруцеллезе и усовершенствованию антигена, используемого для ее постановки. Известно, что эффективность серологической диагностики напрямую связана с АГ, который должен быть активным и специфичным. В настоящее время для серологического исследования бруцеллеза животных широко используют РИД с ОП-С АГ, РСК, РА, РБЦ, РДСК.

Вышеуказанные реакции в отдельности не могут выявить всех животных больных бруцеллезом, в связи с чем, при оздоровлении неблагополучных ферм необходимо проводить многократные исследования. В последние годы исследователи показали, что при бруцеллезе РНГА имеет специфичность и чувствительность и превосходит другие серологические реакции (РА, РСК, РДСК, РБЦ, и РИД с ОП-С АГ) по данным показателям.

В связи с этим, усовершенствование способа получения эритроцитарного антигена для РНГА при бруцеллезе имеет важное научное и практическое значение. Для изготовления антигена были

использованы вакцинные штаммы *B.abortus*19, 89/23, *B.melitensis* Rev-1, а также некоторые диссоциированные штаммы бруцелл (*B.abortus* 82).

В этой связи, исследования на следующем этапе были направлены на усовершенствование технологии для РНГА получения бруцеллезного АГ с низкими экономическими затратами, специфичного, стандартного, стабильного и высокоактивного. Началом работ послужило сравнительное изучение активности и специфичности различных эритроцитарных диагностикумов, предложенных научно-исследовательскими учреждениями нашей страны.

При сравнительном испытании в РНГА антигенов, изготовленных из одного и того же штамма бруцелл различными способами, было установлено, что они отличаются по активности и специфичности. Из всех испытанных препаратов наиболее пригодным для широкого практического применения был антиген, изготовленный по методу Цыбина Б.П., Таран И.Ф., Хаирова С.Г. путем кипячения в водяной бане с последующей обработкой детергентом (вторичным алкилсульфатом натрия) бакмассы *B.abortus* 19 ВА и сенсibilизацией полученным экстрактом формализированных эритроцитов. Эта методика позволяла получать сравнительно активный антиген с меньшими затратами труда и времени. Однако отдельные серии этого диагностикума были недостаточно специфичными и активными.

В этой связи мы изыскивали метод создания АГ эритроцитарного диагностикума, чтоб повысить его специфичность и активность.

Сопоставляя результаты сравнительного испытания различных диагностикумов, мы установили, что антигены, приготовленные из обоих видов бруцелл, можно использовать для серологических исследований крс и мрс в РНГА. Несмотря на некоторые типоспецифические различия, существенное значение для РНГА не имел вид бруцелл при производстве АГ. В то же время установлено, что важное значение при этом имеют

антигенные свойства штамма и способ получения диагностикума. Исследования показали возможность использования вакцинного штамма *V.abortus 19* при изготовлении антигена для РНГА.

С целью усовершенствования технологии изготовления диагностикума определена взаимосвязь активности АГ, который получаем от рН и концентрации бакмассы, режима ее автоклавирования (или кипячения) и обработки детергентом.

Одним из важных условий получения высокоактивного диагностикума для РНГА является подготовка и сенсibilизация эритроцитов, которые следует проводить при наиболее оптимальном режиме, позволяющем максимально сохранить их адсорбционные свойства и повысить стабильные. Проведенное изучение адсорбции АГ на формализованных эритроцитах барана наиболее эффективно проходило в течение 16-18 часов, когда температура была 37⁰С.

Результаты исследований позволили определить наиболее оптимальные параметры и внести ряд усовершенствований в технологию изготовления эритроцитарного диагностикума. АГ был получен по методике, ранее разработанной (Авторское свидетельство № 828454 (1981 г.)). В матровых колбах выращивали трое суток культуру *B. abortus 19*. Используя раствор хлорида натрия (12%), осуществляли смыв культуры. Концентрацию микробных клеток доводили до 100 млрд в 1 см³. Приготовленную суспензию подвергали автоклавированию в течение 20 минут и температуре 120⁰С. Остужение взвеси проводили до 56-58⁰С и добавили в бакмассу детергент – вторичный алкилсульфат натрия (детергент), доводя концентрацию детергента до 2%. Бруцеллезную взвесь выдерживали при указанной температуре в водяной бане в течение 45 минут, с периодическим перемешиванием. Полученную взвесь деконтировали центрифугированием при 14-15 тыс. об/мин. К полученному осадку вносили вторичный алкилсульфат натрия (0,25 %).

Затем при 18-24⁰С в течение часа выдерживали, перемешивая периодически.

Полученную биомассу использовали в дальнейшем для сенсibilизации формализированных эритроцитов барана.

По указанной методике был изготовлен высокоактивный, специфичный и стандартный эритроцитарный антиген для РНГА.

Результаты проведенных исследований позволили определить наиболее оптимальную технологию изготовления антигена и внести ряд усовершенствований в методику его получения.

Например, для изготовления АГ использовали штамм *B. abortus* 19, который в матровых колбах выращивали в течение трех суток. 12%-ным раствором хлорида натрия осуществили смыв бактериальной культуры. Количество микробных клеток довели до 50-60 млрд бруцелл в 1 см³. Приготовленную суспензию подвергали автоклавированию в течении 20-30 минут, при 120⁰С. Определив типичность культуры, стерильность, чистоту, бактериальную массу подвергали нагреванию до температуры 45⁰С. Потом добавляли детергент, 2%-й вторичный алкилсульфат натрия. Суспензию с детергентом с интервалом перемешивания 5-10 минут размещали в водяной бане при температуре 45⁰С, на 40-45 минут. Полученный сенситин был использован для эритроцитов барана, которые были формализованы, для сенсibilизации.

Минимальную дозу антигена, обеспечивающую активность сенсibilизированных эритроцитов, определяют в предварительном опыте титрации.

Для удобства изложения материала антиген, изготовленный по старой методике, мы решили в дальнейшем обозначить «антиген № 1», антиген, полученный по усовершенствованной методике, как «антиген № 2».

Далее проводили титрацию с целью определения оптимальной дозы бруцеллезного АГ №1, с каждой серией формализованных эритроцитов.

К экстракту бруцелл (антиген) повторно добавляли детергент (0,25%) с экспозицией в течение одного часа с температурой 18-24⁰С. Каждый раз биомассу периодически перемешивали и использовали для эритроцитов, которые предварительно были формализованы, для сенсibilизации.

АГ титрацию осуществляли в пробирках, используя температуру 37-38⁰С градусов, прогревая 5% взвесь эритроцитов, и к их объему равному 1 см³ добавляли сенситин с детергентом в объемах 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 см³. С помощью легкого встряхивания содержимое пробирок перемешивали и вносили в термостат при 37-38⁰С в течение 16-18 часов. Избыток АГ отмывали, удаляя жидкость над осадком, используя метод центрифугирование 1000 об/мин, продолжительностью 5-6 минут три раза, от эритроцитов, которые были сенсibilизированы в физрастворе в соотношении 1:10, удаляя каждый раз надосадочную жидкость. Для получения 2,5% взвеси эритроцитов добавляли физраствор объемом 2 см³. Встряхивая пробирки, проводили гомогенизацию взвеси эритроцитов. Полученную эритроцитарную взвесь применяли для РНГА. Используя отрицательную сыворотку и стандартную антисыворотку *B. Abortus*, провели испытание АГ. Были приготовлены следующие разведения стандартного образца сыворотки на физрастворе 1:6400, 1:3200, 1:1600, 1:800, 1:400, 1:200, 1:100. Образцы, которые были разведены, были инактивированы при 60-62⁰С в течение 30 минут, после этого эритроциты, которые были сенсibilизированы, были внесены в каждую лунку на полистероловую пластину по 0,05 см³. Периодически перемешивая и экспозиционируя 2,5-3 часа, соблюдая комнатную температуру, проводили учет реакции.

Оценивая в 4 креста в РНГА с разведением 1:1600, учитывалась оптимальная доза АГ, которая давала результаты со стандартным образцом сыворотки против *B. abortus*.

Антигенная активность и специфичность при повторной обработке эритроцитов и экстракта бруцелл 0,25%-ным вторичным алкилсульфатом

натрия подвергнутых сенсibilизации различными дозами АГ представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели титрации для определения специфичности и активности АГ эритроцитарного бруцеллезного №1

К-во АГ на 1 см ³ 5%-ной взвеси эритроцитов	Титры РНГА									С физ-ким р-ром	
	Стандартный образец сыворотки против <i>B. Abortus</i>							Отрицательная сыворотка			
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:50	1:100		1:200
0,5	++++	++++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	++++	++++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
1,5	++++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-	-	-
2,0	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	-	-
2,5	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	-	-
3,0	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-
3,5	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-
4,0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-	-

Как видно из таблицы 3, повышена активность и специфичность эритроцитарного АГ, который был изготовлен путем повторного воздействия бруцелл вторичным алкилсульфатом натрия в концентрации 0,25%. Как видно, 2% и последующая 0,25% обработка биомассы бруцелл вторичным алкилсульфатом натрия является наиболее оптимальной. Самой малой дозой сенситина, которая позволяет получить с высокой специфичностью и активностью эритроцитарный АГ является 2,0-2,5 см³ на 1 см³ на 5%-ную взвесь эритроцитов барана, которые были формализованы.

Для приготовления бруцеллезного АГ эритроцитарного для РНГА (№ 1) к экстракту бруцелл добавляли 0,25 % детергента и выдерживали один час с температурой 18-24°C, периодически перемешивая. После этого смешивали в колбе в физиологическом растворе формализованные бараньи эритроциты (5%-ную взвесь) и АГ, который брали из расчета предварительной титрации, после определения сенсibilизирующей оптимальной дозы, помещали в термостат на 16-18 часов, при температуре 37-38⁰С. Избыток АГ с сенсibilизированных эритроцитов осуществляли

путем отмывания в физиологическом растворе трижды. По завершению последнего центрифугирования в физиологическом растворе осадок гомогенизировали из расчета, что доля эритроцитов (концентрация) была 5%, затем вносили формальдегид раствор (0,25 и 0,3%). АГ в РНГА проверяли на активность и специфичность, разведя предварительно АГ 1:1 и ставили реакцию) (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты определения специфичности и активности эритроцитарного АГ бруцеллезного в РНГА (№1)

Разведение стандартного образца сыворотки против <i>B. abortus</i>						Разведение негативной сыворотки физиологическим раствором			
1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:50	1:100	1:200	-
#	#	#	#	#	+	-	-	-	-

Использование вторичного алкилсульфата натрия для обработки бактериальной массы первично в концентрации 2% и повторно – 0,25% и последующая сенсбилизация бараньих эритроцитов, из соотношения на 5% взвесь эритроцитов в объеме 1 см³ и АГ в объеме 2,0-2,5 см³, дает возможность получить эритроцитарный АГ бруцеллезный (специфичный, активный и стандартный) для РНГА.

Далее проводили титрацию с целью определения оптимальной дозы бруцеллезного АГ №2 с каждой серией формализованных эритроцитов.

В АГ в форме взвеси бактерий, в водяной бане при прогреве до 45⁰С, и наличии в 1 см³ 50-60 млрд микробных клеток, добавляли 2% вторичный алкилсульфат натрия в качестве детергента. Держали 40-45 минут, периодически перемешивания. Титрацию АГ осуществляли в пробирках.

Результаты определения специфичности и активности эритроцитарного АГ бруцеллезного в РНГА при обрабатывании вторичным алкилсульфатом натрия (2%-ным) взвеси бруцелл и эритроцитов, сенсбилизированных АГ в разных дозах, данные в таблице 5.

Таблица 5 – Данные определения специфичности и активности эритроцитарного АГ бруцеллезного в РНГА (№2)

Кол-во АГ в 1 см ³ 10%-ной взвеси	Титры РНГА									Физиологический раствор	
	Стандартный образец сыворотки против <i>B. abortus</i>						Отрицательная сыворотка				
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:50	1:100		1:200
0,5	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-
1,0	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	-	-
1,5	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	-	-
2,0	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	-	-
2,5	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-
3,0	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-
3,5	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-
4,0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-	-

Полученные данные показывают, что наиболее эффективный результат при обработке АГ 2% вторичным алкилсульфатом натрия можно получить, где АГ 0,75-1,0 см³ на 1 см³ 10%-ной взвеси формализированных эритроцитов барана, тогда как по старому методу (антиген №1) на 1 см³ 5%-ных эритроцитов доза антигена была 2,0-2,5 см³, т.е. в 2,6 раза больше, чем антигена № 2, если учесть, что для антигена №2 используют 10%-ные эритроциты, то рентабельность его увеличивается еще в 2 раза.

АГ (№2), который получен, применяют для сенсibilизации бараньих формализированных эритроцитов. Путем титрации предварительно определяли оптимальную сенсibilизирующую дозу АГ, для этого к объему 1 см³ 10%-ных эритроцитов вносят 1,0 см³ и 0,75 см³ АГ, два часа выдерживая в 45⁰С в водяной бане, периодически перемешивая с интервалом 5-10 минут, последующим трехкратным отмыванием физиологическим раствором избытков АГ от сенсibilизированных эритроцитов, используя центрифугирование продолжительностью 15-20 минут при скорости вращения 1000-1500 об/мин. Получали, разбавляя физраствором, 5% взвесь эритроцитов, в качестве консерванта добавляют формальдегид (концентрация 0,25-0,3%). В РНГА проверяют активность и специфичность. Приготовленный

препарат помещают и хранят в холодильнике при температуре 4-6⁰С. Годность АГ составляет – 1,5 года.

Исходя из изложенного, обрабатывание вторичным алкил сульфатом натрия (концентрация 2%) бактериальной бруцеллезной массы и последующая сенсбилизация бараньих эритроцитов, в соотношении на 10%-нею взвесь эритроцитов в объеме 1 см³ вносится 0,75-1,0 см³ АГ, дает возможность получить для РНГА эритроцитарный бруцеллезный АГ, который получается стандартным, высокоактивным, стабильным и высокоспецифичным. Эритроцитарный АГ, полученный по усовершенствованной методике («антиген № 2»), имеет ряд преимуществ, сокращено время сенсбилизации, отпадает время осаждения центрифугированием бактериальной массы, повышается рентабельность изготовления АГ в два раза, способ изготовления препарата значительно упрощается, а экономия АГ возрастает в 2,6 раза.

Таблица 6 – Результаты исследования сыворотки крови коров, абортировавших на почве бруцеллеза, в РНГА различными бруцеллезными диагностикумами

№№ пп	Кличка коров	Диагностикум № 1	Диагностикум № 2
		Титр в РНГА	Титр в РНГА
1	Изабела	800	800
2	Анжела	400	400
3	Елена	400	400
4	София	200	200
5	Берцин	100	100
6	Лиза	200	200
7	Цумур	400	400
8	Алена	200	200
9	Гавчар	800	800
10	Луиза	800	800
11	Лилбург	800	800
12	Сидрат	200	200
13	Исбет	200	200
14	Космос	400	400
15	Венера	400	400
16	Лида	800	800
17	Шарик	100	100
18	Роза	100	100
19	Зоя	200	200

20	Зита	1600	1600
----	------	------	------

Как видно из таблицы 6, по активности антигены, изготовленные разными методами, не имеют различий, так как все пробы сывороток крови животных положительно реагировали в РНГА и титры были одинаковые.

Сравнительное испытание в РНГА и определение активности диагностических наборов при исследовании сывороток крови крс и мрс из хозяйств неблагополучных по бруцеллезу выявлено, что диагностикумы № 1 и № 2 показали высокую эффективность в РНГА. При этом получено положительных результатов 59,3%, сомнительных – 10,9 %, тогда как в РА положительно и сомнительно реагировали, соответственно, 29,6; 39 и РСК – 15,6; 1,5 % (таблица 7).

Таблица 7 – Результаты РА, РСК и сравнительного испытания в РНГА эритроцитарных диагностических наборов

Вид животных, кол-во проб		Наименование диагностикумов		РА	РСК
		№ 1	№ 2		
Крупный рогатый скот, 108 проб	Положительный результат	64	64	34	10
	Относительное количество, %	59,2	59,2	31,48	9,2
	Средний титр	1:409	1:409	1:159	-
	Сомнительно реагирующих	12	12	42	-
	Относительное количество, %	11,1	11,1	38,8	-
Мелкий рогатый скот, 20 проб	Положительный результат	12	12	4	10
	Относительное количество, %	60	60	20	50
	Средний титр	1:158	1:158	1:50	-
	Сомнительно реагирующих	2	2	8	2
	Относительное количество, %	10	10	40	10
Итого: 128 проб	Положительный результат	76	76	38	20
	Относительное количество, %	59,3	59,3	29,6	15,6
	Средний титр	1:381	1:381	1:141	

	Сомнительно реагирующих	14	14	50	2
	Относительное количество, %	10,9	10,9	39	1,5

По сообщению многих исследователей, РНГА поглощает всех больных бруцеллезом животных, реагирующих в РА + РСК, с помощью этой реакции дополнительно выявляют от 5 до 12% реагирующих позитивно животных, что совпадает с результатами наших исследований.

Таким образом, для диагностики бруцеллеза крс и мрс усовершенствована технология получения эритроцитарного АГ для РНГА и РПГА, которая экономична, доступна для массового производства, требует меньше времени и затрат труда для получения большего количества препарата. Эритроцитарный бруцеллезный АГ получается высокоспецифичным, высокоактивным, стандартным и стабильным.

2.2.3 Испытание усовершенствованного АГ эритроцитарного диагностикума для РНГА

Изучение специфичности АГ эритроцитарного диагностикума, изготовленного по усовершенствованному способу, проводили, исследуя в РНГА сыворотки крови крс и мрс из благополучных по бруцеллезу хозяйств. Параллельно в РСК и РА исследовали сыворотки крови животных, а также в РДСК и РБП. Для постановки РА и РНГА сыворотки крови крс разводили, начиная с 1:50.

Всего с целью изучения специфичности бруцеллезного АГ эритроцитарного диагностикума в РНГА исследованию было подвергнуто 4886 сывороток крови.

В результате исследований были получены следующие результаты. У красностепой породы из благополучных двух хозяйств по бруцеллезу Карабудахкентского района, СПК «Какашуринский» и СПК «Манаскентский», в количестве 150 голов случного возраста телок и коров

и племенных бычков в количестве 59 голов, в возрасте 12 месяцев – в количестве 26 голов, которые принадлежат благополучному по бруцеллезу хозяйству Кизилюртовского района (СПК «Шамхальский») проведены исследования сывороток крови в серологических реакциях (РСК, РНГА, РА, РДСК) (таблица 8).

Таблица 8 – Данные исследований животных из благополучных хозяйств по бруцеллезу в серологических реакциях

Наименование района, хозяйства, группа животных	Исследовано сывороток	РНГА			РА			РСК			РДСК		
		отр.	1:50	1:100	отр.	сом.	пол.	отр.	сом.	пол.	отр.	сом.	пол.
Карабудахкентский р-н, СПК «Манаскентский», коровы	150	150	-	-	150	-	-	150	-	-	150	-	-
СПК «Какашуринский», телки случ. возр.	59	59	-	-	59	-	-	59	-	-	59	-	-
Кизилюртовск. р-н, МТФ «Шамхальский», племябычки 12 мес.	26	26	-	-	26	-	-	26	-	-	26	-	-
Итого:	235	235	-	-	235	-	-	235	-	-	235	-	-

Серологические исследования в РДСК, РСК, РА и РНГА показывают, у всех половозрастных групп крс из хозяйств благополучных по бруцеллезу отсутствуют реагирующие животные, в том числе нет титров в РНГА в 1:50 и 1:100.

У 261 гол молодняка крс и 133 коров, которые принадлежат частным владельцам с. Чирката Гумбетовского муниципального района, проведены серологические исследования в РСК, РА и, начиная с разведения 1:25, в РНГА, результаты которых были отрицательными (таблица 9).

Таблица 9 – Результаты серологических исследований РСК, РА и начиная с разведения 1:25 в РНГА

Наименование населенного пункта, группа животных	Исследовано сывороток	РНГА				РА			РСК		
		отр.	1:25	1:50	1:100	отр.	сом.	пол.	отр.	сом.	пол.
с. Чирката											
коровы	133	131	2	-	-	133	-	-	133	-	-
телки, бычки	261	261	-	-	-	261	-	-	261	-	-
Итого:	394	392	2	-	-	394	-	-	394	-	-

Идентичные данные были получены в РА, РСК, РДСК, РБП и, начиная с разведения 1:25, в РНГА, при исследовании сывороток крови от 2-х бычков-производителей, 122 коров и нетелей в количестве 61 головы черно-пестрой породы из СПК им. Ленина Карабудахкентского района и представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Данные исследований крс в серологических реакциях

Группа животных	Исследовано гол.	РНГА			РА		РСК		РДСК		РБП	
		отр.	1:25	1:50	отр.	сом.	отр.	сом.	отр.	сом.	отр.	пол.
Быки-производ.	2	2	-	-	2	-	2	-	2	-	2	-
Коровы	122	122	-	-	122	-	122	-	122	-	122	-
Телки	73	73	-	-	73	-	73	-	73	-	73	-
Нетели	61	61	-	-	61	-	61	-	61	-	61	-
Итого:	258	258	-	-	258	-	258	-	258	-	258	-

С этой же целью в РНГА, в сравнении с РА и РСК, были исследованы сыворотки крови от 2514 гол. крс из 9 населенных пунктов и 6 хозяйств благополучных по бруцеллезу Карабудахкентского, Кизлярского, Гумбетовского муниципальных районов (таблица 11).

Таблица 11 – Результаты серологических исследований у крс из хозяйств благополучных по бруцеллезу в РСК, РА и РНГА

Район, хозяйство населен. пункт	Исследовано сывороток	Группа животных	РНГА			РА			РСК		
			отр.	1:50	1:100	отр.	сом.	пол.	отр.	сом.	пол.
Гумбетовский р-н СПК им. Мичурина	214	бычки телки, старше 6 мес.	214	-	-	214	-	-	214	-	-
	138	нетели, коровы	138	-	-	138	-	-	138	-	-
СПК им.М.Гаджиева	365	коровы и молодняк 6-7 мес.	365	-	-	365	-	-	365	-	-
СПК им.Гагарина	64	коровы	64	-	-	64	-	-	64	-	-
сел.Арадерих	101	коровы	101	-	-	101	-	-	101	-	-
	50	телки, бычки	50	-	-	50	-	-	50	-	-
сел.Ингишо	184	телки, бычки	184	-	-	184	-	-	184	-	-
сел.Тлярата	120	телки, бычки	120	-	-	120	-	-	120	-	-
сел.Годори	98	телки, бычки ст.1года	98	-	-	98	-	-	98	-	-
Кизлярский р-н СПК «Россия»	51	телки 5- бмес.	51	-	-	51	-	-	51	-	-
СПК «Огузерский»	57	коровы	57	-	-	57	-	-	57	-	-
СПК «Горьковский»	62	телки, бычки 5-6 мес.	62	-	-	62	-	-	62	-	-
СПК «Вперед»	25	коровы	25	-	-	25	-	-	25	-	-
	9	молодняк 1-2 года	9	-	-	9	-	-	9	-	-
сел. Б. Орешовка	172	коровы	172	-	-	172	-	-	172	-	-
	135	молодняк 1-2 года	135	-	-	135	-	-	135	-	-
сел.Некрасовка	73	коровы	73	-	-	73	-	-	73	-	-
	40	молодняк 1-2 года	40	-	-	40	-	-	40	-	-
Карабудахкент. р-н сел. Параул	556	коровы, буйволы и молодняк 6-7 мес. и старше	556	-	-	556	-	-	556	-	-
Всего	2514		2514	-	-	2514	-	-	2514	-	-

Серологические исследования 2514 проб сывороток крови у разных половозрастных групп крс дали отрицательные результаты, как в РНГА, так и в РА и РСК.

При проведении серологических исследований в РСК, РА, РБП и начиная с разведения 1:25 в РНГА перед иммунизацией вакциной из штамма *B. abortus* 82 телок возрасте 5-6 месяцев в количестве 164 голов, находящихся на ферме благополучной по бруцеллезу, расположенной в Цумадинском муниципальном районе, в РНГА выявлен титр 1:25 у трех телок. Результаты были отрицательными в РА, РСК и РБП у всей группы животных.

Проведено исследование в РНГА с использованием АГ эритроцитарного диагностикума 1201 проб сывороток крови крс разных половозрастных групп из неблагополучных хозяйств по бруцеллезу, имеющих различную степень распространения и имеющих разное течение болезни, для изучения в сравнительном аспекте с другими диагностическими тест-системами, по результатам которых были получены следующие данные.

Проведены исследования сывороток крови частного сектора острова Чечень в количестве 440 голов крс от разных половозрастных групп (бычков, телок, нетелей, коров) в РНГА с использованием АГ эритроцитарного диагностикума, по сравнению с РСК и РА. Когда в частном секторе у животных были отмечены аборты, 135 голов нетелей и коров подверглись серологическим исследованиям на бруцеллез. В РСК и РА тридцать голов реагировало положительно. Своевременной изоляции больных животных не было произведено и поэтому болезнь распространилась.

Вакцинация противобруцеллезными вакцинами крс в частном секторе ранее не проводилась. Повторное серологическое исследование было проведено у 440 голов крс с использованием РА, РСК и РНГА (таблица 12).

Таблица 12 – Результаты серологических исследований крс в частном секторе о. Чечень в РНГА, РА и РСК

Исследовано проб	РНГА		РА		РСК		РА+РСК		Полож. показ. РНГА совпадали с		Реагировало только в РНГА	
	пол-но	сом-но	пол-но	сом-но	пол-но	сом-но	пол-но	сом-но	пол-но РА и РСК	сом-но РА и РСК	пол-но	сом-но
440	171	34	110	49	89	7	148	25	148	18	6	26
100%	38,8	7,7	25	11,1	20,2	1,6	33,6	5,7	33,6	4,3	1,3	5,9

Серологическими исследованиями было установлено, что в РНГА титре 1:100 171 проба была положительной, титре 1:50 сомнительными были 34 пробы. 148 проб сывороток в РА и РСК дали положительный результат, а 25 – сомнительный. Сопоставление РНГА с вместе взятыми реакциями РА с РСК подтвердило, как высокую чувствительность первой, так и достоверность результатов. Следовательно, РНГА полностью охватывает результаты двух реакций, РСК и РА, как положительные, так и сомнительные результаты.

Результаты серологических исследований крс частного сектора о. Чечень в РНГА продемонстрированы в таблице 13.

Таблица 13 – Данные серологических исследований крс частного сектора о. Чечень в РНГА

Количество проб	РНГА, титры								
	отр.	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
440	235	34	40	29	34	16	30	12	10

Результаты постановки РНГА показали, что у наибольшего количества животных положительные результаты совпали с РСК и РА (положительные и сомнительные). Но наряду с этим, РНГА дала 24 положительных результата, которые в РА реагировали сомнительно, а у двух титр составлял 1:25.

В хозяйстве неблагополучном по бруцеллезу в Карабудахкентском районе (СПК «Рассвет») в РДСК, РСК, РА и РНГА проведены серологические исследования 249 нетелей и коров (таблица 14).

Таблица 14 – Результаты серологических исследований на бруцеллез нетелей и коров СПК «Рассвет»

Реакции	Исследовано проб	положительная	сомнительная	отрицательная
РНГА	249	55	9	185
РА	249	29	24	196
РСК	249	32	-	218
РДСК	249	39	-	210
РА+РСК+РДСК	249	46	13	189

В 55 случаях в титре 1:100 и выше в РНГА получен положительный результат, при этом только 46 сывороток крови дали положительный результат реакций вместе взятых РА, РДСК, РСК (таблица 15). Одновременно положительный результат из них в 44 случаях совпал с положительно реагирующими в РНГА.

Таблица 15 – Результаты сопоставления реакций: РДСК, РСК, РА и титр 1:100 и выше в РНГА

Исследовано сывороток	Полож. РНГА (титр 1:100 и выше)	Совпадение по серологическим реакциям							
		РСК		РА		РДСК		РДСК+РСК+РА	
		Пол.	Сом.	Пол.	Сом.	Пол.	Сом.	Пол.	Сом.
249	55	31	-	29	21	37	-	44	11

У 55 голов крс положительная реакция в РНГА подтвердила сомнительный и положительный результат в реакциях: РДСК, РСК и РА. В РА, РДСК и РСК вместе взятых получено 46 реагирующих животных, 44 животных дали положительную реакцию в РНГА. 13 животных в РА реагировало сомнительно, из них 11 проб дали положительный результат, а у 2-х в РНГА была сомнительная реакция, следовательно, применение РНГА позволяет поставить при бруцеллезе лабораторный диагноз, при первичном исследовании из 13 сомнительно реагирующих в РА, 11 голов положительных, или к взятым вместе серологическим реакциям, РСК, РА,

РДСК, дополнительно выявить животных, которые реагируют положительно на бруцеллез в количестве 11 голов. Экспериментальные данные подтверждают, что чувствительность РНГА более высокая, с применением предлагаемого нами диагностикума, в сравнении с РСК, РА, и РДСК. Все указанные реакции проведены в трех повторностях, являются официально принятыми, и они практически выявили одних и тех же животных, которые положительно реагировали, что подтверждает достоверность полученных данных. Две пробы, которые отрицательно реагировали в РНГА, получены в разведении 1:5 в РДСК с оценкой 3 или 2 креста.

Агглютинины из 9 голов крс у трех выявлены в РНГА в титрах 1:50, две пробы дали положительный результат и одна 1:25. РНГА четко показывает реакцию, по сравнению с РА. Результаты продемонстрированы в таблице 16.

Таблица 16 – Данные РНГА И РА проб сывороток крс из неблагополучных хозяйств по бруцеллезу

Серологическая реакция	Количество иссл. проб	Титры АТ							Итого с положительным титром - 1:100 и выше
		1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	отр.	
РА	249	15	24	14	15	-	-	181	29
РНГА	249	12	9	17	13	11	14	173	55

Серологические исследования проведены с 280 пробами из хозяйств неблагополучных по бруцеллезной инфекции в РНГА, РДСК, РА, РБП, Цумадинского района, где за 2-3 месяца до взятия крови для исследований регистрировали отдельные случаи аборт у коров (таблица 17).

Таблица 17 – Данные исследований животных из неблагополучных хозяйств по бруцеллезу в РБП, РДСК, РСК, РА и РНГА

Метод исследования	Исследовано проб	Результат исследования			
		отр.	сом.	пол.	% полож.
РНГА	280	209	23	48	17,1
РА	280	266	8	6	2,1

РСК	280	249	7	24	8,6
РДСК	280	248	3	29	10,4
РБП	280	247	10	33	8,2
РА+РСК+РДСК+РБП	280	230	15	35	12,5

Используя РНГА и разработанный нами диагностикум, установили, что из 280 проб сывороток при проведении реакции реагировало положительно 48 животных, при использовании РБП, РДСК, РСК и РА было выявлено таких проб - 35, что подтверждает, чувствительность РНГА выше в сравнении с другими диагностическими реакциями.

Определенную ценность РНГА для диагностики бруцеллеза представляют данные сравнительного изучения других серологических реакций, применяемых на практике, которые представлены в таблице 18.

Таблица 18– Сравнительные результаты серологических реакций: РБП, РДСК, РСК, РА и РНГА

РА, МЕ	РСК	РДСК	РБП	Кол-во	РНГА								
					отр	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200 и выше
-	-	-	-	225	187	20	15	3	-	-	-	-	-
-	с	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
-	с	с	-	2	-	-	1	1	-	-	-	-	-
-	-	-	+	4	-	-	1	3	-	-	-	-	-
-	с	с	+	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
-	-	+	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
-	с	+	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
-	-	+	+	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
-	с	+	+	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
-	+	+	-	7	-	-	1	5	-	1	-	-	-
-	+	+	+	10	-	-	-	1	8	1	-	-	-
25	-	-	-	5	1	1	1	-	2	-	-	-	-
25	-	-	+	6	-	-	3	2	-	1	-	-	-
25	-	+	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
50	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-
50	с	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
50	-	-	+	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
50	+	+	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-
50	+	+	+	3	-	-	-	1	2	-	-	-	-
100	-	-	+	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-
200	+	+	+	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
400	-	-	+	2	-	-	-	-	-	-	-	1	1
1600 и выше	+	+	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Итого				280	188	21	23	25	14	4	-	2	3

Примечание: результаты реакции,
 - - отрицательная;
 + - положительная;
 с - сомнительная.

РНГА имеет явные преимущества в сравнении с другими реакциями. Для примера, многие животные, которые заразились бруцеллезом и в РА еще отсутствует диагностическое значение, и связано это, что занос возбудителя на ферму был недавно.

Приведенные выше результаты свидетельствует, что эритроцитарный АГ диагностикум, изготовленный Прикаспийским зональным НИВИ, способен обнаружить АГ в серологических реакциях всех сельскохозяйственных животных больных бруцеллезом, которые могут реагировать как положительно, так и сомнительно.

Системные исследования с практическим использованием в совокупности без РНГА позволяют выявлять животных, которые больны, с большим количеством, но все эти реакции уступают РНГА по чувствительности и отдельная реакция не может выявить большой процент зараженных животных бруцеллезом.

Если объединить полученные как положительные, так и сомнительные титры в РДСК, РСК, РБП и РА и считать, что животные по обоим полученным результатам больны бруцеллезом, то по чувствительности указанные реакции приближаются к РНГА.

Ранее в таблице 17 продемонстрированы результаты серологических исследований и получен положительный результат у 25 голов животных с минимальным титром в РНГА 1:100. В 23 случаях положительные результаты совпали в титрах диагностических с другими примененными серологическими реакциями.

Сомнительный титр 1:50 был у 23 голов животных в РНГА, специфичность была подтверждена другими серологическими реакциями у 8 животных, что составило 35%.

Ранее представленные в таблице 16 данные продемонстрировали, что, используя комплексные системные исследования и официальные диагностические реакции, РДСК, РСК, РБП и РА, у 280 голов крс при

исследовании на бруцеллез положительный результат был получен в 35 случаях, а 15-ти сомнительный, но, используя РНГА, было выявлено 48 положительно реагирующих голов.

При исследовании сывороток крови положительный результат был выявлен у 43-х животных, и полученные результаты соответствовали другим серологическим реакциям, положительным и сомнительным, при этом у 3-х из пяти голов животных был получен результат с титром 1:25 в РА, что подтверждает высокую достоверность и чувствительность результатов в РНГА (таблица 19).

Таблица 19 – Данные серологических исследований нетелей и коров неблагополучного хозяйства по бруцеллезу в РДСК, РСК, РБП и РА, в сравнении с РНГА

Количество реагирующих в РНГА	Количество положительных результатов в РНГА совпадающих с результатами РБП+РА+РСК+РДСК		Количество реагирующих только в РНГА		Получены положительные РБП+РА+РСК+РДСК	
	полож.	сомнит.	полож.	сомнит.	при отриц. РНГА	при сомнит. РНГА
48	33	10	5	15	-	2

С совместным использованием РДСК, РСК, РБП и РА было выявлено 35 голов животных, которые давали положительный результат, в РНГА положительно реагировало 33, при этом сыворотки от 2 голов животных, одна из которых была положительной в титре 1:5 в РДСК и РБП, вторая в аналогичном титре в РДСК и РСК, была в РНГА сомнительной (таблица 17 и 18).

К указанным официальным реакциям дополнительно с использованием РНГА было выявлено реагирующих положительно 15 голов животных, среди которых сомнительно реагировало -10 голов, у 2-х, которые реагировали, титр составил 1:25, а у 3 голов животных по указанным реакциям не было реагирования.

Применяя комплексно РДСК, РСК, РБП и РА, у 15 сывороток был получен сомнительный результат, проведенная РНГА подтвердила в диагностических титрах 10 проб положительных, 5 проб дали сомнительный результат.

Исходя из вышеизложенного, все животные, которые дали реакцию в диагностических титрах в РДСК, РСК, РБП и РА, в совокупности были поглощены РНГА.

Контрольные плановые исследования у животных на бруцеллез в Кизилюртовском районе (МТФ «Шамхальский») были проведены через 3 года после завершения оздоровления. Серологические исследования 120 голов крс были проведены в РНГА, РСК и РА. РА и РСК дали отрицательный результат у всего поголовья, в РНГА реагировало 3 животных, два с титром 1:100, а одно в титре 1:50 (таблица 20).

Таблица 20 – Итоги контрольного серологического исследования коров МТФ «Шамхальский» в РНГА, РА и РСК

Исследовано проб	РА			РСК			РНГА			
	отр.	пол.	сом.	отр.	пол.	сом.	отр.	1:50	1:100	1:200
120	120	-	-	120	-	-	117	1	2	-

Повторные серологические исследования спустя 2 месяца выявили увеличение титра в РНГА и получение положительных результатов в РСК и РА (таблица 21).

Таблица 21 – Результаты повторного серологического исследования коров МТФ «Шамхальский» в РНГА, РА и РСК

№№ пп	Инд. № коровы	Результат первоначального исследования			Результат повторного исследования		
		РА	РСК	РНГА	РА, М.Е.	РСК	РНГА
1	4124	-	-	1:50 +++	200	пол.	1:800+++
2	113	-	-	1:100+++	400	пол.	1:800+++
3	395	-	-	1:100+++	400	пол.	1:1600+++

Далее проведены нами исследования сывороток в РСК, РНГА и РА 113 нетелей и коров на бруцеллез неблагополучного Кизилюртовского района, где заболевание бруцеллезом широко распространилось (таблица 22).

Таблица 22 – Итоги серологических исследований нетелей и коров неблагополучной по бруцеллезу МТФ «Шамхальский» в РА, РСК и РНГА

Исследовано сывороток	РНГА			РА			РСК			РА+РСК		
	пол	сом	% полож	пол	сом	% полож	пол	сом	% полож	пол	сом	% полож
113	51	11	45,1	14	10	12,4	42	2	37,2	44	3	38,9

Из таблицы 22 видно, что использование РНГА для диагностики бруцеллеза в неблагополучных стадах позволяет более полно, чем РА и РСК выявить больных животных бруцеллезом.

Сравнение результатов проведенных исследований определило, что в диагностическом титре 1:100 и более в РНГА, были обнаружены животные, которые положительно и сомнительно реагировали в РСК и РА (таблица 23).

Таблица 23 – Данные РНГА в сравнении с РСК и РА крс МТФ неблагополучной по бруцеллезу

РСК	РА, МЕ	К-во	РНГА									
			-	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
-	-	66	51	11	1	1	2	-	-	-	-	-
-	50	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
-	100	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
+	50	9	-	-	-	2	2	1	3	-	1	-
+	100	6	-	-	-	-	-	1	1	-	2	2
+	200	3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1
+	400	2	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-
+	800	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
с	-	2	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
+	-	21	-	-	4	4	7	2	3	-	1	-
Всего		113	51	11	6	9	11	5	9	-	6	5

Примечание: реакция + - положительная;
 - - отрицательная;
 с - сомнительная.

Применение РНГА, кроме РСК, РА позволило обнаружить у 7 голов бруцеллез, где с сомнительным результатом РСК и РА было 3 головы.

Важно отметить тот факт, что положительные диагностические титры в РНГА были во всех сыворотках 23 животных, которые давали положительную реакцию только в РСК, а также положительную и сомнительную при отрицательных значениях РА. Это свидетельствует, что РНГА обнаруживает агглютинины, а также комплементсвязывающие АТ, которые присутствуют в сыворотке даже в низких титрах, и когда разведение 1:5, где оценка в один крест можно обнаружить в РСК. Помимо этого, анализ результатов показывает о достоверности результатов РНГА и действительно подтверждает сделанный вывод, что титры 1:100 и более нужно оценивать, как положительный диагностический результат, в виду того, что 51 животное дало реакцию в названных титрах, а 44 были положительными, 3 сомнительными в РСК или РА. Из 23 голов животных, которые реагировали в РСК, получены титры 1:100 и выше в РНГА.

На МТФ им. Ленина в Цумадинском районе РД, неблагополучной по бруцеллезной инфекции, провели серологические исследования 33 телок в возрасте 4-6 месяцев в РБП, РСК, РА и РНГА до иммунизации и после применения вакцины из шт. 82. У двух телок в РНГА был положительный результат при отрицательных значениях в РБП, РА, и РСК (таблица 24).

Таблица 24 – Данные серологических исследований молодняка крс из неблагополучного хозяйства по бруцеллезу в РБП, РСК, РНГА, РА

Количество исследованных сывороток	Титры РНГА				РСК		РБП		РА
	1:25	1:50	1:100	1:200	пол.	сом.	пол.	сом.	пол.
33	1	-	1	1	-	-	-	-	-

В серологических исследованиях (РБП, РДСК, РСК, РА) из хозяйства Хунзахского района, 86 проб от телок, возраст которых был 12 месяцев и более, провели сравнение с РНГА (таблица 25).

Таблица 25 – Результаты серологического исследования телок из Хунзахского муниципального района в РА, РСК, РДСК и РБП и РНГА

Исследовано сывороток	РНГА		РА		РСК		РДСК		РБП
	сом.	пол.	сом.	пол.	сом.	пол.	сом.	пол.	пол.
86	-	8	1	3	-	7	-	8	4

Исследования показали, что РНГА поглощает результаты, когда ставится диагноз на бруцеллез во всех 4-х официально принятых реакциях (таблица 26).

Таблица 26 – Данные серологических исследований на бруцеллез молодняка крс в РНГА по сравнению с РБП, РДСК, РА, РСК

РА, МЕ	РСК	РДСК	РБП	К-во	РНГА							
					отр.	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
отр.	пол.	пол.	отр.	4	-	-	2	2	-	-	-	-
400	пол.	пол.	пол.	1	-	-	-	-	-	-	-	1
100	пол.	пол.	пол.	1	-	-	-	-	-	-	1	-
100	отр.	пол.	пол.	1	-	-	-	-	1	-	-	-
50	пол.	пол.	пол.	1	-	-	-	1	-	-	-	-
отр.	отр.	отр.	отр.	78	78	-	-	-	-	-	-	-
Итого				86	78	-	2	3	1	-	1	1

2.2.4 Выявление противобруцеллезных АТ в молоке и сыворотке экспресс-методом

РНГА на основе эритроцитарного АГ имеет много заслуг за возможность обнаруживать животных, инфицированных бруцеллезом. АТ могут присутствовать при заболевании в молоке. В молоке при проведении КР на бруцеллез регистрируется нестабильность. Это обусловлено, что АТ в молоке могут в некоторых долях вымени отсутствовать, а других присутствовать. В разные сроки заболевания наблюдалось выпадение КР с молоком или обнаруживались АТ вновь, реагируя в реакции. Помимо вышесказанного, недостатком КР с молоком являются неспецифические реакции, которые бывают в ряде случаев.

Чувствительный метод экспресс диагностики имеет практическое применение.

При исследовании молока основной целью являлось сравнительно изучить КР с молоком и РСК, РА и РНГА с сывороткой крови.

Обнаружение гемагглютининов в молоке, в РНГА, в сравнение с КР с молоком, провели исследуя 1280 коров, из них из хозяйств благополучных по бруцеллезной инфекции – 400 проб, и неблагополучных – 880. В это же время в РСК, РНГА, РА параллельно проводили исследования сывороток крови. Разведя физиологическим раствором молоко 1:400, 1:200, 1:100, 1:50, 1:25 от максимума до минимального титра осуществляли постановку РНГА.

Результаты исследований представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Результаты исследований молока и сывороток от животных в РНГА из хозяйства благополучного по бруцеллезной инфекции

Кол-во иссл. коров	КР с молоком		РНГА с молоком		Сыворотки крови					
					РА		РСК		РНГА	
	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.
400	396	4	400	-	400	-	400	-	400	-

Из хозяйств, которые являются неблагополучными по бруцеллезной инфекции, провели серологические исследования и исследования молока (таблица 28).

Таблица 28 – Данные по исследованию молока в РНГА и КР, сывороток крс в РСК, РА и РНГА неблагополучного по бруцеллезной инфекции хозяйства

Кол-во коров исслед.	Сыворотки крови				Молоко			
	РНГА		комплекс РА + РСК		КР		РНГА	
	пол.	%	пол.	%	пол.	%	пол.	%
880	247	28,0	154	17,5	122	13,8	247	28,0

При исследовании молока в РНГА положительные результаты были в 28% случаях у коров (247 проб), что аналогично с сывороткой крови, а КР с молоком реакция была в 13,8% случаях у коров (122 пробы). 17,5% (154 пробы) положительных результатов было установлено в совокупности в РА с РСК.

При исследовании патматериала от коров в РНГА с разработанным нами диагностикумом бруцеллезным АТ эритроцитарным и используя ПЦР, была реакция с молоком лишь в РНГА, когда были отрицательные показания в других реакциях. Положительные показания были во всех пробах, что подтверждает присутствие АГ бруцеллезного в сыворотке крови и молоке, а также в экстракте гомогенизированных органов и лимфатических узлах.

Наибольшая чувствительность с молоком в РНГА над КР с молоком и серологическими реакциями РСК, РНГА, РА была подтверждена исследованием четырех абортировавших плодов на фоне бруцеллезной у коров инфекции.

Полученные данные подтверждают, что при исследовании молока на бруцеллез от коров, применяя РНГА, чувствительность выше, чем у КР с молоком, которая не уступает диагностическим значениям совокупности серологических исследований РА+РСК, а также РНГА. Особенность превосходства исследования молока применяя РНГА и обнаружением большего числа больных, в сравнении над серологическими исследованиями с использованием РСК, РА, РНГА, видимо, обусловлена, что инфекционный патологический процесс активно идет в молочной железе.

2.2.5 Изучение эффективности и испытание РНГА при исследованиях сыворотки крови и молока при поствакцинальной иммунизации крс против бруцеллеза и дифференциальной диагностики, при применении вакцины из штамма *B. abortus* 82

Значение для диагностики и возможность в РНГА использования эритроцитарного АГ для дифференциальной диагностики после иммунизации вакциной, изготовленной из штамма *B. abortus* 82, изучали в сравнении с широко применяемым в практике официально принятым методом – РИД с О-ПС АГ и другими серологическими реакциями (РА, РСК).

Исследования проводили на базе Республиканской ветеринарной лаборатории Республики Дагестан при участии ветврачей серологического отдела лаборатории. Провели исследования 202 проб в серологических реакциях РИД, РА, РСК, РНГА после применения вакцины из шт. *B. abortus* 82 (таблица 29).

Таблица 29 – Данные проведенных серологических исследований крс в РИД, РСК, РНГА и РА из стад неблагополучных по бруцеллезной инфекции, иммунизированного вакциной из штамма *B. abortus* 82

Наименование хозяйства	Иссл-но голов	РНГА		РА		РСК		РА+РСК		РИД
		сом.	пол.	сом.	пол.	сом.	пол.	сом.	пол.	пол.
Карабудахкентский р-н, пос. Манаскент	50	5	16	5	12	3	16	4	16	14
с. Какашура	53	5	4	4	-	5	4	5	4	3
Кировский р-н, пос. Шамхал	99	5	13	8	7	2	12	2	12	9
Всего:	202	15	33	17	19	10	32	11	33	26
%			16,8		9,4		16,6		16,6	12,8

Приведенные данные показывают, из всех испытанных серологических методов РНГА является наиболее чувствительной диагностической реакцией, которая выявляет максимальное количество реагирующих на бруцеллез животных. Всего в РНГА в диагностических титрах реагировало 48, в РА+РСК – 44 коровы. Положительная РИД с О-ПС антигеном получена с сыворотками крови 26 животных.

При сравнительном анализе результатов исследований (таблица 29) установлено, что положительная РИД с О-ПС антигеном получена только с сыворотками крови животных, реагировавших в РНГА и РСК в высоких титрах. Точнее из 26 коров, положительно реагирующих в РИД, 23 имели положительную РНГА, при этом титр гемагглютининов составил 1:400, у 3 голов 1:200 и оценен в 3 или 4 креста и 1:40 при разведении сыворотки в РСК. Иначе говоря, сыворотки животных, реагировавших в серологических реакциях РСК и РНГА в высоких титрах, которые согласно инструкции считаются инфицированными бруцеллезом,

полностью совпадали с положительной РИД. У животных с сомнительными серологическими реакциями в случаях, когда действительно требуется дифференциация поствакцинальных реакций от постинфекционных иммунологических реакций, ни в одном случае с помощью РИД с О-ПС антигеном не удалось выявить в сыворотке крови преципитины, которые, по мнению авторов О-ПС антигена, свидетельствуют об инфицировании животного бруцеллезом. Мало того, в 6 случаях с сыворотками крови явно больных бруцеллезом коров с высокими титрами РНГА и РСК (у 2-х коров с РНГА 1:400 и РСК 1:40 и у 6 – с РНГА 1:200 и РСК 1:40) показания РИД были отрицательными. Данные показатели показывают о низкой чувствительности распространенной и широко используемой в лабораторной диагностической практике при дифференциации диагностики поствакцинальной бруцеллезной инфекции РИД с О-ПС АГ. Наряду с этим, результаты проведенных исследований, которые показали, что животные с положительной РИД с сывороткой крови во всех случаях реагируют в РНГА в высоких титрах, свидетельствуют о возможности замены РИД с О-ПС антигеном, разработанным ИЭВСиДВ, более чувствительным методом диагностики бруцеллеза – РНГА с использованием эритроцитарного антигена, что значительно облегчит, удешевит и, главное, повысит эффективность результатов проведенных исследований по дифференциации и определению иммунизированного вакциной из штамма *B. abortus* 82 от реакций инфицированных животных бруцеллезом.

Специальный опыт проведен нами в 2017 г. с целью изучения диагностического применения РНГА с молоком для дифференциации поствакцинальных реакций зараженных бруцеллезом животных, привитых вакциной из штамма 82.

Для этого в благополучном по бруцеллезу хозяйстве СПК «УРИ» вакциной из штамма 82 иммунизировали 44 лактирующих коровы.

Животных исследовали в период, когда поствакцинальные реакции имеют максимальные титры (20-30 дней после заражения), а также в более поздние сроки (через каждые 30 дней). Во всех случаях при исследовании молока в РНГА получены отрицательные результаты, тогда как с сыворотками крови получены положительные реакции в диагностических титрах (РНГА 1:200 и выше, РСК 1:10 и выше). Результаты этих исследований дают основание рекомендовать применение РНГА с молоком в качестве одного из методов по дифференциации здоровых коров с поствакцинальными реакциями от зараженных естественным бруцеллезом животных при исследованиях для диагностики крс, после применения вакцины из шт. *B. abortus* 82.

Таблица 30 – Данные по исследованию в РИД и РНГА при сравнительном испытании при диагностике и дифференциации бруцеллеза крс после иммунизации вакциной из штамма *B. abortus* 82

Наименование хозяйства	РНГА		РА, МЕ						РСК				РИД	
	400	200	100	50	отр.	1:40	1:20	1:10	1:5	отр.	пол.	отр.		
Частный сектор с. Какашура	1:400	4	-	2	2	4	-	-	-	-	3	1		
	1:200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	1:50	4	-	-	1	3	-	4	-	-	-	4		
	отр.	45	-	-	-	45	-	-	-	45	-	45		
Карабудахкентский р-н, пос. Манаскент	итого	53	-	2	1	50	4	4	-	45	3	50		
	1:400	13	9	2	1	1	13	-	-	-	12	1		
	1:200	3	1	-	-	-	2	-	-	1	2	1		
	1:100	2	-	1	1	-	1	1	-	-	-	2		
	1:50	3	-	-	-	3	-	1	2	-	-	3		
Кировский р-н, пос. Шамхал	отр.	29	-	-	-	29	-	-	-	29	-	29		
	итого	50	10	2	4	1	16	2	2	30	14	36		
	1:400	8	3	2	-	-	7	-	-	1	8	-		
	1:200	5	1	1	2	1	4	-	-	1	1	4		
	1:100	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1		
Всего	1:50	4	-	-	2	2	-	2	-	2	-	4		
	отр.	81	-	-	-	81	-	-	-	81	-	81		
	итого	99	3	4	3	5	11	2	-	85	9	90		
	1:400	25	12	5	-	3	24	-	-	1	23	2		
	1:200	8	1	1	3	1	6	-	-	2	3	5		
Всего	1:100	3	-	1	2	-	1	1	-	-	-	3		
	1:50	11	-	-	3	8	-	7	2	2	-	11		
	отр.	155	-	-	-	155	-	-	-	155	-	155		
	итого	202	13	6	9	7	31	8	2	160	26	176		

2.2.6 Разработка и испытание эритроцитарного бруцеллезного антительного диагностикума для РНГА

Наиболее точным методом определения наличия бруцеллеза, при получении положительного результата, является бактериологический метод. Подлежащий массовой проверке материал очень часто оказывается непригодным для бактериологического исследования из-за загрязненности посторонней микрофлорой. В литературе имеются сообщения об испытании для этих целей серологических тестов, в частности, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с антительным эритроцитарным диагностикумом и реакции нейтрализации антител (РНАт). Антительный диагностикум привлекает внимание, так как он выступает современным способом выявления АГ в биоматериале. Многие авторы считают, что РНГА с антительным диагностикумом проста по технике постановки и позволяет намного быстрее, по сравнению с бактериологическим методом исследования, выявить возбудителя заболевания в исследуемом материале. Однако при бруцеллезе ее использование не имеет до сих пор широкого практического применения. Это связано с недостаточной изученностью ее при этой инфекции и трудностью получения стандартного высокоактивного и специфичного антительного диагностикума.

Учитывая изложенное, нами ставилась задача – разработать способ получения антительного эритроцитарного диагностикума для РНГА с целью выявления бруцеллезного антигена в биоматериале.

С этой целью мы проводили исследования по испытанию эритроцитов стабилизированных различными способами, подбору высокоактивных бруцеллезных сывороток и конъюгирующих средств, определению оптимального режима сенсibilизации эритроцитов и проверки специфичности и активности изготовленных серий антительного диагностикума. В качестве конъюгирующих средств при изготовлении диагностикума применяли ализариновый синий, глутаровый альдегид и амидол.

Исследования показали возможность изготовления бруцеллезного АТ диагностикума, используя амидол в качестве конъюгата.

Сенсибилизация формализированных эритроцитов.

Для сенсибилизации эритроцитов применяют позитивные сыворотки, разведенные физиологическим раствором 1:50 – 1:100.

Максимальная чувствительность бывает, когда соотношение ингредиентов в РНГА следующее: свежеприготовленный амидол - 0,43-0,44%-ный раствор – 1 объем, 40%-я взвесь эритроцитов (барана) 2 объема от осадка, позитивная сыворотка крови – 1,0-1,5 объема, разведение которой составляет 1:50-1:100, которая разведена в растворе *NaCl* (0,85% раствор, 7,0-7,2 рН), когда отсутствуют фосфатный буфер, который в течение 30 минут был инактивирован при 60⁰С. Полученную смесь, выдерживают и перемешивают 28-32 минуты в водяной бане при температуре 55-56⁰С, встряхивают периодически с ритмичностью 5-6 минут. С использованием раствора *NaCl*, который содержит кроличью нормальную сыворотку (НКС), необходимо осуществлять отмывку эритроцитов, которые сенсибилизированы, используя разведения 1:100 или (НЛС) – лошадиную нормальную сыворотку, используя разведение 1:250, подвергнутые инактивации продолжительностью 30 минут при 60⁰С, 7,0-7,2 рН. Когда завершилось центрифугирование, взвесь эритроцитов добавляют в физиологический раствор для создания концентрации эритроцитов (2,5%), и используют для постановки РНГА с целью индикации бруцеллезного антигена в биоматериале.

Молоко исследуют в нативном виде или после концентрации бруцелл центрифугированием при 2500-3000 об/мин. в течение 2-х часов. Для исследования берут соответственно верхний слой или осадок.

Патологический материал. Кусочки органов, лимфоузлов и тканей от здоровых и больных бруцеллезом животных или абортировавших плодов и другой материал предварительно измельчают в фарфоровой ступке, растирают с добавлением 9 объемов 0,85% раствора *NaCl*, затем

фильтруют через ватный фильтр. Пробирки с исследуемым материалом прогревают в течение 30 минут при 100°C (в кипящей водяной бане) для обеззараживания материала. После этого содержимое пробирок фильтруют через бумажный фильтр. Полученный прозрачный фильтрат можно использовать в РНГА.

В лунки полистероловых пластин вносят 0,5 см³ разведенный в физиологическом растворе один из стабилизаторов: нормальную кроличью сыворотку (НКС) или нормальную лошадиную сыворотку (НЛС), разведенных 1:100 – 1:250, инактивированных при 60°C в течение 30 минут. В первые лунки каждого ряда вносят по 0,5 см³ исследуемого материала, титруют аппаратом Флоринского до предельного титра.

3, 4 креста считаются положительным результатом.

Изучение специфичности эритроцитарного бруцеллезного антительного диагностикума.

Для изучения в РНГА специфичности эритроцитарного АТ бруцеллезного диагностикума провели исследование от здорового поголовья 20 голов крс и 30 овец (таблица 31).

Таблица 31 – Данные исследований по специфичности АТ диагностикума в РНГА

Биоматериал	Число голов	Число исследованных лимфоузлов и органов	Число реагирующих в РНГА	
			отр.	пол.
Органы и лимфоузлы здорового крс	20	200	200	-
лимфоузлы и орган овец	30	150	150	-

Показатели применения эритроцитарного АТ диагностикума в РНГА, разработанного по нашему способу, при исследовании суспензии органов и лимфоузлов здоровых крс и овец дали результат отрицательный, что указывает на высокую специфичность.

Изучение активности антительного бруцеллезного эритроцитарного диагностикума в РНГА.

Активность разработанного нами эритроцитарного АТ диагностикума проводили в РНГА, исследуя в РСК, РА, РДСК, в предельных титрах единый бруцеллезный АГ (таблица 32).

Таблица 32 – Данные исследований в РНГА активности АТ эритроцитарного диагностикума

Метод	Амидол, концентрация в %									
	0,24	0,27	0,30	0,32	0,34	0,36	0,38	0,40	0,43	0,44
по Вайнбаху в нашей модификации (формализация)	Выявлено бруцелл (тыс. микробных клеток в 1 см ³)									
	366,2	183,1	91,5	45,7	22,8	11,4	5,7	2,8	1,43	1,43

Созданный нами АТ бруцеллезный диагностикум для РНГА является высокоактивным препаратом, который может выявлять в объеме 1 см³ бруцеллезный антиген в биоматериале 1430 клеток микробных. Увеличение до 32 минут сенсibilизации эритроцитов, увеличивает чувствительность индикации ПБА, а если температура превышает 28-32⁰С, и экспозиция превышает 40-60 минут, происходит гемагглютинация спонтанная (таблица 33).

Таблица 33 – Данные по определению оптимальных режимов экспозиции и температуры, для сенсibilизации эритроцитов положительной сывороткой крови

Разведение, сенситин (положительная бруцеллезная сыворотка)	Экспозиция (мин.) и температура (°С)											
	45° С			50° С			55-56° С			60° С		
	28	32	40	28	32	40	28	32	40	28	32	40
1:40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	-	-	-	-	-	-	Дв	Дв	Спонтанная гемагглютинация			
1:100	-	-	-	Дс	Дс	Дч	Дв	Дв	- // - // -			
1:150	-	-	-	Дч	Дч	Спонтанная гемагглютинация			- // - // -			

Условные обозначения: Диагностический набор в РНГА по чувствительности:

Дс –слабый;

Дч –чувствительный, но не высокие титры;

Дв –высокочувствительный;

СГ-спонтанная гемагглютинация;

«-» - отрицательный результат.

Далее провели сравнительное изучение эффективности для диагностики в РНГА разработанного нами бруцеллезного АТ эритроцитарного диагностикума, бактериологического метода и РНАт.

Провели исследования материала из неблагополучных хозяйств: смывы с объектов внешней среды – 3 пробы, вода, инфицированная бруцеллами – 10, молоко – 10, овцы – 15, крс - 10 (таблица 34).

Таблица 34 – Показатели сравнительного изучения разных методов обнаружения АГ бруцелл

материал, вид животных	Обнаружение АГ бруцелл						Число проб
	Бактериологический метод		РНАт		РНГА с АТ диагностикумом		
	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	
Почва, корма, навоз, смыв объектов внешней среды, искусственно обсемененных антигеном <i>V.abortus</i> 19	-	-	3	-	3	-	3
Контаминированное бруцеллами водопроводная вода	10	-	10	-	10	-	10
Молоко контаминированное бруцеллами	9	1	9	1	10	-	10
Экстракт из лимфоузлов и органов, овцы	13	2	14	1	15	-	15
Экстракт из органов и лимфоузлов, крс	7	3	8	2	10	-	10

В результате эксперимента у бруцеллезного АТ эритроцитарного диагностикума определена высокая чувствительность и специфичность для обнаружения АГ бруцеллезного в исследуемом материале.

Сравнивая результаты использования для РНГА диагностикума бруцеллезного АТ эритроцитарного и РНАт, определено, что первый превосходит второй в 67 раз. А именно, АТ диагностикум выявляет АГ бруцеллезный при наличии 1430 клеток микробных в объеме 1 см³, а РНАт при 100000 клеток микробных в объеме 1 см³. Помимо этого, РНГА с диагностикумом АТ по технике проста в постановке, тогда как РНАт сложна.

На способ изготовления диагностикума получен патент на изобретение (№ 249387 от 27 сентября 2013 г.).

Нами было проведено также сравнительное изучение чувствительности антительного бруцеллезного эритроцитарного диагностикума для РНГА и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для индикации бруцеллезного антигена в биоматериале.

В работе использовали материал (биоматериал от убитых животных – внутренние органы, лимфатические узлы) – 9 овцематок и коз, 1 бычка, 7 коров, и смыв искусственно обсемененных *B.abortus* 19 тринадцати объектов ветеринарного надзора.

АТ диагностикум испытали в РНГА и параллельно в ПЦР, исследуя патматериал: экстракт органов и лимфоузлов крс здоровых животных (таблица 35).

Таблица 35 – Данные определения специфичности ПЦР и РНГА

Патматериал, экстракт	Количество проб	Количество исследований органов и лимфоузлов	РНГА		ПЦР	
			отр.	пол.	отр.	пол.
Органы и лимфоузлы и органы здоровых коз	3	60	60	-	60	-
Органы и лимфоузлы и органы здорового	3	60	60	-	60	-

кр.пог.скота						
Итого:	6	120	120	-	120	-

Все исследования дали отрицательный результат, что было подтверждено ПЦР и показало высокую специфичность антительного диагностикума, изготовленного нами.

Многие исследователи считают полимеразную цепную реакцию (ПЦР) – высокоэффективным методом для выявления бруцеллезного антигена в биоматериале. Нами проведены сравнительные исследования (таблица 36).

Таблица 36 – Данные сравнительного исследования АТ диагностикума, в сравнении с ПЦР для индикации бруцеллезного антигена в биоматериале

Группа животных и смыв объектов внешней среды	Количество исследованных		Положительная РНГА с антительным диагностикумом		Положительная ПЦР	
	животных	объектов	всего	%	всего	%
Козематеки и овцематки, больные бруцеллезом	6	128	128	100	128	100
Смыв искусственно обсемененных объектов внешней среды с <i>B.abortus</i> 19		13	13	100	13	100
Коровы и бычок, больные бруцеллезом	5	100	100	100	100	100
Контроль (единичный бруцеллезный АГ)		1	1	100	1	100

Представленные данные показывают, что РНГА с АТ диагностикумом имеет высокую специфичность, быстроту, чувствительность, простоту постановки, воспроизводимость, что соответствует требованиям к экспресс-методам для индикации АГ.

2.2.7 Разработка и испытание эритроцитарного антительного овисного диагностикума для РНГА при инфекционном эпидидимите баранов

Бруцеллезная природа инфекционного эпидидимита баранов (ИЭ) установлена Simmons G. и Hall W. (1953), Buddle M. и Boyes B. (1953) в Австралии и Новой Зеландии, где это заболевание было установлено впервые и имело широкое распространение.

В Российской Федерации инфекционный эпидидимит баранов диагностирован серологически в 1967 году в Псковской области Триленко П.А. и др. (1968) и в Дагестане Далгат М.М. (1978). В последние годы это заболевание регистрировалось во многих хозяйствах целого ряда других областей, республик и краев, в том числе в Дагестане.

Прижизненная диагностика инфекционного эпидидимита баранов включает клинический осмотр животных, исследование сыворотки крови в РНГА, РДСК и биоматериал – реакции нейтрализации антител (РНАт) и бактериологически.

РДСК имеет ряд недостатков, обусловленных необходимостью использования многих компонентов, нестабильностью компонента, антикомплементарностью антигена, сложности постановки реакции.

Клинический осмотр (пальпация семенников и придатков) служит только ориентировочным методом диагностики, так как орхиты и эпидидимиты у баранов наблюдаются и при ряде других инфекционных и неинфекционных заболеваниях и, наоборот, эти признаки, нередко, могут не быть у инфицированных *V.ovis* баранов.

Наиболее точным методом диагностики инфекционного эпидидимита, также как и бруцеллеза, является бактериологический. Однако, он не пригоден для массовых прижизненных исследований в связи с необходимостью в ряде случаев убоя животных и значительной сложностью и длительностью проведения исследований. Срок бактериологического исследования составляет 15-30 дней и более при

постановке биологической пробы, в лучшем случае результаты известны лишь через 4-5 дней.

Нередко от животных с положительными серологическими реакциями или имеющих клинические признаки заболевания обнаружить возбудитель не получается, что указывает на относительные результаты этого метода.

По литературным данным одним из перспективных методов обнаружения возбудителя болезни или антигена в исследуемом материале является РНГА с антительным эритроцитарным диагностикумом. Однако, при инфекционном эпидидимите баранов антительный эритроцитарный диагностикум для РНГА еще не разработан, а при бруцеллезе животных эта реакция изучена недостаточно.

В этой связи, создание высокоэффективного, надежного, быстрого и точного метода диагностики инфекционного эпидидимита баранов, в частности, РНГА с антительным эритроцитарным диагностикумом, предназначенным для индикации антигена в биоматериале, имеет большое научное и практическое значение.

Исследования проводили на 10 баранах из неблагополучных по инфекционному эпидидимиту хозяйств.

Бактериологическое исследование проводили по общепринятой методике. РНГА и РНАт ставили согласно утвержденной Россельхознадзором «Инструкции по применению набора препаратов для диагностики инфекционного эпидидимита баранов в РНГА и РНАт».

Значительный объем научно-исследовательской работы по инфекционному эпидидимиту баранов, а именно усовершенствованию диагностики был выполнен нами.

В итоге исследований разработан с использованием модификации метода Вайнбаха, применения овисной гипериммунной сыворотки, применения в качестве конъюгата ализаринового синего индикатора,

		ных	ов						
1.	Мрс, бараны - производители из неблагополучных хозяйств по ИЭБ	10	53	24,5	13	45,2	24	60,3	32
2.	Мрс, бараны - производители из благополучных хозяйств по ИЭБ	10	240	-	-	-	-	-	-
3.	Овцематки привитые вакциной из штамма <i>Brucella melitensis</i> Rev-1 из хозяйств благополучных по инфекционному эпидидимиту	4	60	-	-	-	-	-	-

Для изучения пригодности использования сконструированного нами антительного эритроцитарного овисного диагностикума для индикации антигена *Brucella ovis* в РНГА, в сравнении с РНАт, были исследованы также биофабричный овисный антиген для РДСК, единый бруцеллезный антиген для РА и РСК, R-антигены для РСК из штаммов 16/4 и 1096 и смывы из объектов внешней среды (почва, корма, навоз), инфицированные *Brucella ovis* (таблица 38).

Таблица 38 – Результаты испытания антительного диагностикума для индикации антигена *Brucella ovis* в сравнении с РНАт

	Материал, подвергнутый исследованию	Количество проб	Положительный результат			
			РНАт	%	РНГА с антительным диагностикумом	%
1.	АГ <i>B. ovis</i> биофабричного приготовления (R-форма)	1	1	100	1	100
2.	Единый бруцеллезный АГ для РА, РСК (РДСК) (S-форма)	2	отр.	-	отр.	-
3.	АГ, приготовленные из штаммов бруцелл <i>B. abortus</i> 16/4 и 1096 (R-форма)	2	2	100	2	100
4.	Смывы объектов внешней среды, искусственно инфицированные <i>B. ovis</i>	10	8	80	10	100

Полученные результаты указывают, что для РНГА пригоден АТ-диагностикум для обнаружения антигена *Brucella ovis*.

На способ изготовления антительного диагностикума получен патент №2509306 от 10.03.2014 г..

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Литературные данные свидетельствуют об актуальности проблемы бруцеллеза как для людей, так и для животных. Несмотря на изучение болезни, глобальная социально-экономическая проблема сохраняется.

Многочисленными исследованиями, которые проводились за рубежом и в нашей стране показано, что представленные методы чувствительны, специфичны и их можно использовать в практике для диагностики бруцеллеза при массовых исследованиях, но многократность исследований снижает эффект противобруцеллезных мероприятий и продлевает оздоровительные мероприятия в хозяйствах. Одной из перспективных существующих реакций является РНГА. Многократные серологические диагностические исследования у животных разных видов показали ее более высокую чувствительность и специфичность. По результатам проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1. Изучены методы стабилизации эритроцитов и модифицирован метод по Вайнбаху, показавший высокую серологическую активность в РНГА с агглютинирующей бруцеллезной сывороткой, с титром – 1:25600, со сроком годности стабилизированных эритроцитов 2 года и более.

2. Разработан способ получения бруцеллезного эритроцитарного антигена для РНГА, который позволяет выявлять инфицированных больных животных. АГ высокоспецифичен, высокоактивен, стандартный и стабильный.

3. Разработан способ выявления противобруцеллезных АТ в молоке экспресс-методом. Применение созданного эритроцитарного антигена позволяет обнаружить бруцеллезные гемагглютинины в молоке коров, и ставить диагноз на бруцеллез.

4. Гемагглютинины в высоких титрах (1:200-1:400 и выше) в РНГА после иммунизации крс вакциной, изготовленной из штамма *B. abortus* 82, свидетельствуют об инфицировании животных возбудителем бруцеллеза.

5. Разработан и испытан эритроцитарный бруцеллезный антительный диагностикум для РНГА, показавший высокую чувствительность и специфичность для обнаружения АГ бруцеллезного в исследуемом материале. Получен патент РФ № 2493871 от 27.09.2013);

6. Разработан и испытан эритроцитарный антительный овисный диагностикум для РНГА при инфекционном эпидидимите баранов, показавший высокую специфичность для РНГА эритроцитарного АГ диагностикума. Получен патент РФ (№2509306 от 10.03.2014).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

В результате экспериментальных исследований для практики разработаны НД:

1. Изготовление и испытания эритроцитарных бруцеллезных и антительных диагностикумов для РНГА с целью выявления специфических антител в сыворотке крови и индикации бруцелл в биоматериале, утв. ГНУ Прикаспийского зонального НИВИ от 19.09.2013 г. (2013).
2. Применение нового экспресс-метода для поствакцинальной дифференциальной диагностики бруцеллеза овец и коз, утв. Ученым советом ФГБНУ Прикаспийского зонального НИВИ 11.12.2017 г. (2017).
3. Применение РНГА с усовершенствованным антигеном в «Наборе для серологической диагностики бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации, утв. Управлением ветеринарии Ростовской области 08.04.2020 г. (РНГА) (2020).

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АГ – антиген;
- АТ – антитело;
- ВАК – Высшая аттестационная комиссия;
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
- ВП – Ветеринарные правила;
- ИХА – иммунохроматографический анализ;
- ИЭБ – инфекционный эпидидимит баранов;
- КР – кольцевая реакция с молоком;
- крс – крупный рогатый скот;
- Минобрнауки – Министерство образования и науки;
- мрс – мелкий рогатый скот;
- МЮНПК – Межд. юбилейная научно-практическая конференция;
- ОП-С АГ – О-полисахаридный антиген;
- РА – реакция агглютинации;
- РБП – роз-бенгал проба;
- РДСК – реакция длительного связывания комплемента;
- РИД – реакция иммунодиффузии;
- РНАт – реакция нейтрализация антител;
- РНГА – реакция непрямой гемагглютинации;
- РНГем – реакция непрямого гемолиза;
- РНПК - региональная научно-практическая конференция
- РП – реакция преципитации;
- РПГА – реакция пассивной гемагглютинации;
- РСК – реакция связывания комплемента;
- РТНГА – реакция торможения непрямой гемагглютинации;
- РФ – Российская Федерация;
- СП – Санитарные правила;
- УФ – ультрафиолет;
- ЭД – эритроцитарный диагностикум.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авилов, В.М. Борьба с бруцеллезом крупного рогатого скота с применением вакцины из штамма 82 / В.М. Авилов, К.М. Салмаков, А.А. Новицкий // Ветеринария с.-х. животных. -2006. -№ 1. - С.17-21.
2. Авилов, В.М. Бруцеллез животных и его специфическая профилактика / В.М. Авилов, В.В. Селиверстов, К.В. Шумилов [и др.] // Ветеринария. – 1997. – № 7. – С. 3-13.
3. Алиев, А. И. Некоторые дополнительные мероприятия по борьбе с паратуберкулезом крупного рогатого скота / А. И. Алиев, Н. Г. Фадеева // Профилактические и лечебные мероприятия в условиях отгонного животноводства. Т. 12 / Дагест. науч.-исслед. ветеринар. ин-т. – Махачкала: 1981. – С.95.
4. Алиев, Э.А. Применение вакцины из штамма 82 на крупном рогатом скоте и буйволах / Э.А. Алиев // Научн. труды Казанского вет. ин-та. – 1980. – Т. 135. – С.70-74.
5. Алиев, Э.А. РНГА при диагностике бруцеллеза буйволов и крупного рогатого скота / Э.А. Алиев // Инфекционные и паразитарные болезни животных в Азербайджане: сборник научных трудов. – Баку, 1984. – Т. 30. – С. 12-17.
6. Алимов, А.М. Влияние на бруцелл ультрафиолетовых лучей и азотистой кислоты /А.М. Алимов // Научные труды Казан. вет. ин-та. - 1980 (1981). – Т. 135. – С.133-136.
7. Альбертян, М.П. Иммунологическая, патоморфологическая оценка эффективности противобруцеллезных вакцин и совершенствование средств и методов специфической профилактики бруцеллеза животных: автореф. дис. ...док. вет. наук. – М, 1996. – 50 с.
8. Альбертян, М.П. Проблемы и перспективы специфической профилактики бруцеллеза крупного рогатого скота живыми вакцинами /

- М.П. Альбертян, М.И. Искандаров, А.И. Федоров, М.И. Гулюкин // Ветеринария и кормление. – 2014. – № 5. – С. 62-63.
9. Антонов, В.К. Изменчивость бруцелл под влиянием некоторых биологических и физических факторов /В.К. Антонов // Тр. НИВИ Казах. Акад. с/х наук. – 1961. – Т.10. – С.119-122.
10. Аракелян, П.К. Диагностическая ценность РИД с разными О-ПС антигенами при бруцеллезе крупного рогатого скота / П.К. Аракелян, Г.В. Разницына, Т.А Янченко [и др.] // Ветеринария. – 2016. - № 7. – С. 25-29.
11. Большая медицинская энциклопедия / гл. ред. Б. В. Петровский. – 3-е изд. – М.: Советская энциклопедия, 1974 – 1989. – Т. 1-30.
12. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Американский пластинчатый способ реакции агглютинации при диагностике бруцеллеза у животных / В. С. Рягузов, Н. Я. Литвинова, В. Ф. Бессарабов : Сборник науч. работ и материалов / Под. общ. ред. И. В. Гинзбурга; Бруцеллезное бюро Наркомземов СССР и РСФСР и Наркомздрава РСФСР. - Москва : Сельхозгиз, 1934 ("Образцовая" тип.). – Обл., 215 с.
13. Буланов, П.А. Аттенуация бруцелл и получение вакцинных штаммов /П.А. Буланов, Е.Н. Наурызбаев, А.А.Мякушина //Труды Алма-Атинского зоовет. ин-та. – 1959. – Т.11. – С.321-325.
14. Булашев, А.К. Изучение антигенности белков бруцелл в иммуноферментном анализе / А.К. Булашев, А.С. Сыздыкова, Ж.А. Сураншиев, К.А. Турсунов, С.З. Ескендинова // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. – 2019. – № 1 (50). – С. 92-100.
15. Вашкевич, Р.Б. Пластинчатая реакция агглютинации при бруцеллезе северных оленей / Р.Б. Вашкевич // Эпизоотология и иммунопрофилактика болезней: сборник научных трудов. Новосибирск, 1983. – С. 16-20.
16. Вершилова, П.А. Опыт иммунизации морских свинок и белых мышей против бруцеллеза авирулентной культурой бруцелл и полисахаридно-липоидным комплексом /П.А. Вершилова //ЖМЭИ. – 1947. – №7. – С. 17-23.

17. Вершилова, П.А. Патогенез и иммунология бруцеллеза /П.А. Вершилова, М.И. Чернышева, Э.Н. Князева //- М., 1974. – 245 с.
18. Веселовский, С.Ю. Сравнительная оценка вакцин против бруцеллеза крупного рогатого скота из штаммов *Brucella abortus*: 82, кв 17/100 и рб-51 / С.Ю. Веселовский, А.А. Частов, В.А. Агольцов // Научная жизнь. – 2016. – № 3. – С. 125-133.
19. Винокуров, Н.В. Изучение диагностической эффективности реакции непрямой геммагломинации при бруцеллезе /Н.В. Винокуров, Е.С. Слепцов// Якутский медицинский журнал. – Якутск, 2008. -№4. –С.72-73.
20. Воробьев, А.Л. Диагностическая эффективность бруцеллезного антигена, содержащего специфический фаг / А.Л. Воробьев, Л.Н. Гордиенко // Ветеринарная патология. – 2017. – № 3 (61). – С. 8-18.
21. Высоцкий, В.В. Ультраструктура бруцелл. Сообщ. 2. Ультраструктура R-клеток бруцелл /В.В. Высоцкий, Д.С. Курдина, Н.Н. Островская //Микробиология. -1967. -№ 3. - С.19-23.
22. Гольцов, А.С. Кольцевая реакция с молоком при ранней диагностике бруцеллеза у коров, реиммунизированных вакциной из штамма 82 / А.С. Гольцов // Пути совершенствования профилактики и диагностики бруцеллеза с.-х. животных: сб. науч. тр. – Омск, 1990. – С. 39-42.
23. Гордиенко, Л.Н. Характеристика иммунных реакций при бруцеллезе крупного рогатого скота в свежем очаге инфекции / Л.Н. Гордиенко, Т.В. Гуськова, Г.М. Гайдуцкая, Н.Б. Еланцева // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. 2014. Т. 3. № 7. С. 449-453.
24. Гордиенко, Л.Н. Эффективность применения R- и L-диагностикумов в общем комплексе лабораторных исследований северных оленей на бруцеллез / Л.Н. Гордиенко, В.Г. Толстикова, А.Ю. Шварева // Материалы Всероссийской научной конференции по проблемам хронических инфекций (бруцеллез, туберкулез): сборник трудов конференции. – Омск, 2001. – С. 57-63.

25. ГОСТ 33675-2015 Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Бактериологические методы.
26. ГОСТ 34105-2017 Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы.
27. Гулюкин, М.И. Бруцеллез сельскохозяйственных животных в Российской Федерации / М.И. Гулюкин, М.П. Альбертян, М.И. Искандаров [и др.] // Ветеринария. – 2013. – № 6. – С. 23-28.
28. Гулюкин, М.И. История вакцинопрофилактики бруцеллеза крупного рогатого скота в России / М.И. Гулюкин М.И., Альбертян М.П. [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2014. – № 5. – С. 50-52.
29. Дегтеренко, Л.В. Концептуальная схема оптимизации диагностики болезней, вызываемых у животных бруцеллами / Л.В. Дегтяренко, В.Г. Ощепков, С.К. Димов, А.С. Димова // Сибирский вестник с-х. науки. - 2005. -№1. -С.71-79.
30. Дегтеренко, Л.В. Оптимальная система дифференциальной диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и ее противоэпизоотическая эффективность / Л.В. Дегтеренко // Материалы Всероссийской науч. конф. по проблеме хронических инфекций (Сб. науч. тр.) РАСХН. Сиб. отд-ние ВНИИТБЖ. –Омск. -2001. –С.67-69.
31. Дегтяренко, Л.В. Испытание РНГА с молоком при дифференциальной поствакцинальной диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота / Л.В. Дегтяренко, М.Ю. Карлова, О.Д. Складов [и др.] // Достижения науки и техники АПК. - № 9. – 2011. – С. 64-67.
32. Дегтяренко, Л.В. Новые дифференциально-диагностические тесты молока крупного рогатого скота на бруцеллез / Л.В. Дегтяренко, О.Д. Складов // Аграрная наука - сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана и Болгарии: сборник научных докладов XVII международной научно-практической конференции в 2 частях. Редакционная коллегия: Донченко А.С., Сатыбалдин А.А., Гантлга Г.;

Составители: Смолянинов Ю.И.; Шаповалов Д.В. Рогоулькина М.Е. – 2014. – С. 96-98.

33. Дегтяренко, Л.В. Перспективность применения дифференциальных экспресс-тестов при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота / Л.В. Дегтяренко, О.Д. Складов // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. - № 4. – С. 58-60.

34. Дегтяренко, Л.В. Разработка и совершенствование средств, методов диагностики бруцеллеза животных и инфекционного эпидидимита баранов: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / Л.В. Дегтяренко. – Новосибирск, 2005 . – 39 с.

35. Димова, А.С. Эффективность диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота в новой тест-системе ИФА / А.С. Димова, С.К. Димов, А.А. Сизов [и др.] // Ветеринария. – 2015. - № 8. – С. 18-20.

36. Дмитриев, А. Ф. Рекомендации по оздоровлению от хронических инфекционных заболеваний крупного рогатого скота в целях повышения сохранности животных и увеличения объемов мясной и молочной продукции : метод. рекомендации / А. Ф. Дмитриев [и др.] – Ставрополь : АГРУС, 2011. – 36 с.

37. Дубровская, И.Н. Наследственно закрепленные изменения в составе варианта бруцелл со стойко ослабленной вирулентностью /И.Н. Дубровская // Вопросы мед. химии. -1967. -Т.13. -№2. - С. 168-171.

38. Дубровская, И.Н. Состав специфических полисахаридов одного варианта бруцелл типа “abortus” /И.Н. Дубровская // Биохимия. -1967.- Т.32. -№ 1. - С.31-35.

39. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Хадарцев О.С., и др. Состояние заболеваемости бруцеллезом на территории РФ. / В сб. Современные аспекты эпидемиологического надзора за особо-опасными инфекционными заболеваниями на юге России (мат.н.-практ.конф.).- 2007.-Ч.1.- С.142-145.

40. Желудков, М.М. Антигенемия в динамике инфекционного и вакцинного процессов при бруцеллезе /М.М. Желудков, М.И. Чернышева, И.П. Павлова, Н.С. Умнова //ЖМЭИ. -1992. -№ 7-8. - С.71-72.
41. Иванов, М.М. Изменение свойств бруцеллезных культур воздействием антибиотиков /М.М. Иванов, Л.В. Кириллов //Труды ГНКИ. -1964. -Т. 12. - С. 199-203.
42. Иванов, А.В. Состояние и перспективы специфической профилактики и ликвидации бруцеллеза крупного рогатого скота / А.В. Иванов, К.М. Салмаков, А.М. Фомин // Ветеринария. – 2013. – № 7. – С. 10-13.
43. Иванов, М.М. Итоги изучения вакцинных штаммов бруцелл /М.М. Иванов, Т.И. Малахова, У.Э. Ниязов // Труды ВГНКИ. -1977. -Т. 23. - С. 94-103.
44. Иванов, Н.П. Научные основы разработки диагностических препаратов из бруцелл: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / Н.П. Иванов. – Казань, 1984. – 50 с.
45. Иванов, Н.П. Сравнительная эффективность применения КР, РА, РСК при исследовании проб молока с целью дифференциации вакцинированных животных от спонтанно больных / Н.П. Иванов, В.М. Антюхов // Пути и методы повышения эффективности животноводства и кормопроизводства. – Петропавловск, 2001. – С. 224-228.
46. Иоффе, В.И. Итоги работ по серологическому анализу некоторых экспериментальных инфекций и очередные задачи дальнейших исследований. / В.И.Иоффе // ЖМЭИ. -1940. -№11. -С.13.
47. Иоффе, В.И. Экспериментальные материалы к объяснению большой чувствительности длительного холодного связывания. /В.И.Иоффе, К.М.Розенталь // ЖМЭИ. -1943. - №12.- С.65.
48. Искандаров, М.И. Бруцеллез животных в России: монография / М.И. Искандаров, М.И. Гулюкин, А.М. Гулюкин [и др.]. – Новосибирск: ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, 2017. – 286 с.

49. Искандаров, М.И. Бруцеллез животных в России: эпизоотологические особенности и совершенствование специфической профилактики: автореф. дисс. ... докт. вет. наук: 06.02.02 / Искандаров Марат Идрисович. - Москва, 2012. -45 с.
50. Искандаров, М.И. Диагностика бруцеллеза / М.И. Искандаров, А.И. Федоров, М.П. Альбертян // Животноводство России. – 2007. - № 5. - С. 59-60.
51. Искандаров, М.И. Профилактика бруцеллеза мелкого рогатого скота / Искандаров М.И., Альбертян М.П., Федоров А.И.// Веткорм. - 2011. - № 2.- С. 20-21.
52. Кайтмазова, Е.И. Изучение лечебного действия сочетаний из антибиотиков при экспериментальной бруцеллезной инфекции/Е.И. Кайтмазова // Антибиотики. -1962. -№ 4. - С. 324-328.
53. Каральник, Б.В. Изучение механизма взаимодействия небелковых бактериальных сенситинов с эритроцитами как основа стандартизации эритроцитарных диагностикумов / Б.В. Каральник // Автореферат дис. на соискание ученой степени доктора медицинских наук. / Перм. гос. мед. ин-т. - Пермь : [б. и.], 1971. - 30 с.
54. Каральник, Б.В. Эффективность различных реакций определения антител и теста антигенсвязывающих лимфоцитов в диагностике бруцеллеза у людей / Б.В. Каральник, Т.Г. Денисова, Г.Б. Жунусова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8. – № 4. – С. 567-572.
55. Карлова, М.Ю. Разработка S- и R-бруцеллезных эритроцитарных диагностикумов, испытание их при бруцеллезе крупного рогатого скота / М.Ю. Карлова, Л.В. Дягтеренко, Г.В. Разницына // Ветеринария и кормление. – 2009. -№4. – С.4-5.
56. Карлова, М.Ю. Разработка S- и R-бруцеллезных эритроцитарных диагностикумов, изучение их эффективности при бруцеллезе животных: диссертация ... кандидата ветеринарных наук: 06.02.02 / М.В. Карлова;

[Место защиты: Ин-т эксперим. ветеринар. Сибири и Дал. Востока].- Омск, 2010.- 180 с.

57. Касымов, Т.К. Эпизоотология бруцеллеза и оптимизация противобруцеллезных мероприятий в условиях Кыргызстана: Автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра ветеринар. наук: 16.00.03 / Касымов Тойчубек Касымович. - Новосибирск, 2002. - 47 с.

58. Касымов, Т.К. Эпизоотология бруцеллеза и оптимизация противобруцеллезных мероприятий в условиях Кыргызстана: дис. ... д-ра вет. наук / Т.К. Касымов. – Бишкек, 2002. – 298 с.

59. Касьян, Ж.А. Разработка тест-системы для дифференциации видов бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени / Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, С.А. Щербакова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 3. – С. 47-51.

60. Касьянов, И.А. Диагностическая эффективность реакция пассивной гемагглютинации при бруцеллезе северных оленей / И.А. Касьянов, Р.Б. Вашкевич // Вопросы ветеринарной арахно-энтомологии: сб. науч. тр. – Тюмень, 1985. – С. 72-75.

61. Клочков, А.А. Получение слабовирулентного штамма бруцелл воздействием ультрафиолетовых лучей /А.А. Клочков // Ветеринария. - 1964. -№2. - С. 31-35.

62. Косарев, М.А. Дифференциальная серологическая диагностика бруцеллеза у крупного рогатого скота, привитого вакциной из штамма 82, и ее значение в общей системе мер борьбы с данным заболеванием / М.А. Косарев, А.М. Фомин, Г.М. Сафина, С.А. Григорьева, Л.А. Тухватуллина // Ветеринарный врач. – 2019. – 5. – С. 23-28.

63. Косарев, М.А. Иммунологическая эффективность живых и гамма-инактивированных противобруцеллезных вакцин для мелкого рогатого скота: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 06.02.02 /Косарев Максим Аркадьевич – Казань, 2011. – 21 с.

64. Косилов, И.А. Бруцеллёз сельскохозяйственных животных /И.А. Косилов, П.К. Аракелян, С.К. Димов, А.Г. Хлыстунов; под ред. И.А. Косилова. – Новосибирск, 1999. -344с.
65. Кузнецова, И.В. Изучение генетического разнообразия штаммов бруцелл, выделенных в Северо-Кавказском федеральном округе / И.В. Кузнецова, Д.А. Ковалев, Ю.М. Евченко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 58-62.
66. Логинов, Ф.С. Характеристика культур бруцелл, выделенных от коров, привитых вакциной из штамма Br. abortus №19/Ф.С. Логинов //Сб. научн. работ СибНИВИ. – Новосибирск, 1961. -В.9. - С.17-26.
67. Невский, И.Н. Иммунобиологическая характеристика штамма бруцелл № 12 Уз.НИВИ /И.Н. Невский // Сб. научн. трудов научно-исслед. ин-та ветеринарии Узбек. акад. с.-х. наук. -1959. -В.13. -С.140-143.
68. Никифоров, И.П. Результаты апробации штамма В. abortus 75/79-А Алтайской НИВС в качестве вакцинного для иммунизации крупного рогатого скота /И.П. Никифоров //Основные научные исследования по проблеме туберкулеза и бруцеллеза с.-х. животных, профилактика и организация мероприятий по ликвидации болезней в регионах Сибири: тез. докл. научно- практ. конф. – Новосибирск, 1995. - С. 95-97.
69. Новосельцев, Н.Н. Изменчивость бруцелл в организме иммунных животных /Н.Н. Новосельцев //Тр. Ростовск. гос. научно-исслед. противочумн. ин-та.- Ростов на Дону.-1959. -Т.14. - С.147-151.
70. Нуратинов, Р.А. Туберкулез крупного рогатого скота в Республиках Северного Кавказа и Калмыкии: Эпизоотология, проблемы дифференциальной диагностики и меры борьбы: автореферат дис. ... доктора ветеринарных наук: 16.00.03 / Всероссийский НИИ эксперимент. ветеринарии. - Москва, 1998. - 37 с.
71. Нурлыгаянова, Г.А. Диагностическая ценность и разрешающая способность реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) при

бруцеллезе крупного рогатого скота / Г.А. Нурлыгаянова // Ветеринарная патология. – 2013. – № 2. – С. 27-30.

72. Омаров, К.С. Опыт заражения рыб *Bt. melitensis* /К.С. Омаров //Изв. АН Казах. ССР. Серия краевой патологии. Сб. работ по бруцеллезу. - Алма-Ата, 1951. -В.5. - С.37-38.

73. Орлов, Е.С. Бруцеллез овец : автореф. дис. ... докт. вет. наук / Е.С. Орлов// Всесоюз. ин-т эксперим. ветеринарии М-ва сельского хозяйства СССР. – Москва. -1954. - 23 с.

74. Орлов, Е.С. Испытание иммуногенных свойств слабовирулентного штамма *Bt. bovis* /Е.С. Орлов, Ю.Ф. Борисович //Бюлл. научно-технич. информации ВИЭВ. -1956. -№ 1. - С.12-15.

75. Островская, Н.Н. Изменчивость бруцелл под влиянием бактериофага и перспективы получения новых вакцинных штаммов /Н.Н. Островская // Изменчивость микроорганизмов и бактериофагия. - М., 1960. - С.300-302.

76. Островская, Н.Н. Изучение стабильности свойств вариантов бруцелл, полученных в результате воздействия бактериофага /Н.Н. Островская //ЖМЭИ. -1961. -№ 8. - С.122-125.

77. Островская, Н.Н. К вопросу об образовании L-форм у бруцелл в условиях искусственной питательной среды /Н.Н. Островская // ЖМЭИ.- 1972. -№ 4. - С. 108-111.

78. Островская, Н.Н. Распространение бруцеллёзного бактериофага среди культур бруцелл и характеристика последних /Н.Н. Островская, Ф.В. Чистякова // Изменчивость микроорганизмов. - М., 1957. -Т.2. - С. 88-91.

79. Ощепков, В.Г. Система усовершенствованной диагностики и профилактики бруцеллеза овец и коз / В.Г. Ощепков, П.К. Аракелян, В.М. Чекишев, О.В. Бондарева // Актуальные проблемы инновационного развития ветеринарной науки и практики: сборник научных трудов, посвященный 105-летию института ТОО "Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт". – Алматы, 2010. – С. 269-273.

80. Ощепков, В.Г. Состояние и перспективы усовершенствования мероприятий против бруцеллеза и туберкулеза животных / В.Г. Ощепков // Актуальные проблемы бруцеллеза и туберкулеза животных: сб. науч. тр. – 2000. – С. 4-14.
81. Парамонова, Э.И. Изменение свойств штаммов *Brucella abortus* при пассаже через организм черепах / Э.И. Парамонова // Труды Казах. НИВИ. –1963. -Т.11. - С.53-57.
82. Плотников, К.И. Бруцелловыделение и бациллоносительство у бруцеллёзного крупного рогатого скота в стадии выздоровления и характеристика выделенных диссоциантов бруцелл /К.И. Плотников //Ветеринария. -1948. -№ 11. - С.19-20.
83. Погорелов, Н.А. Итоги изучения инагглютинабельных форм бруцелл /Н.А. Погорелов, И.Ф. Таран // Зоонозы. – Ставрополь, 1966. - С.126-129.
84. Поляков, И.И. К оценке различных методов выделения антигенов из бруцелл для получения эритроцитарных диагностикумов / И.И. Поляков и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. -1969. С. 77-81.
85. Попова, А.Ю. Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза: Методические указания /А.Ю. Попова и соавт. // - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. - 2017. -60 с.
86. Попова, Т.Г. Диагностическое значение кольцевой реакции с молоком при бруцеллезе крупного рогатого скота / Т.Г. Попова, П.К. Аракелян, А.А. Новицкий [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 09. – С. 61-64.
87. Попова, Т.Г. Купирование бруцеллеза с применением химической вакцины ВНИИБТЖ /Т.Г. Попова, В.С. Бронников, В.Г. Ощепков // Матер. междунар. симпозиума, 28-30 ноября 2005 г. – Казань, 2005. -Ч.II. - С.267-272.

88. Попова, Т.Г. Роль кольцевой реакции с молоком в диагностике бруцеллеза у коров / Т.Г. Попова, А.А. Новицкий // Актуальные проблемы бруцеллеза и туберкулеза животных: сб. тр. конф. – Омск, 2000. – С. 270-276.
89. Профилактика и борьба с болезнями, общими для человека и животных: Сборник санитарных и ветеринарных правил. М.: Инф.-изд. центр Госкомсанэпиднадзора России, 1996. – 256 с.
90. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Бруцеллез. Санитарные правила СП 3.1.085-96. Ветеринарные правила ВП 13.3.1302-96.
91. Ромахов, Б.Н. Испытание РНГА с эритроцитарным антигеном для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и овец / Б.Н. Ромахов, Л.А. Малышева, В.П. Руденко // Ветеринарная патология. – 2008. – № 1 (24). – С. 73-76.
92. Ромахов, В.А. Эффективность сухого эритроцитарного диагностикума ВИЭВ-ВГНКИ для РНГА и РНАт при диагностике инфекционного эпидидимита баранов / В.А. Ромахов, У.Э. Ниязов, К.В. Шумилов [и др.] // Инфекционная патология сельскохозяйственных животных: сб. трудов ВИЭВ. – М., 1984. – Т. 61. – С. 30-37.
93. Рягузов, В.С. Новый вакцинный штамм бруцелл № 21/ В.С. Рягузов // Сб. науч. трудов Донского СХИ. -1967. -Т.3. -В.3. - С.5-8.
94. Сагидибиров, О.П. Бруцеллёз крупного рогатого скота и меры борьбы с ним / О.П. Сагидибиров, М.М. Ахмедов, Н.И. Магомаев, С.Г. Хаиров // Методические рекомендации. – Махачкала. – 2005. -17с.
95. Салмаков, К.М. Результаты изучения вакцинного штамма 82 и его испытания на крупном рогатом скоте в производственных условиях /К.М. Салмаков // Матер. докл. Всесоюзной науч. конф. -1974. -Т.1. - С. 154-156.
96. Салмаков, К.М. Живая вакцина из штамма В. abortus 82 и её эффективность в профилактике и ликвидации бруцеллёза /К.М. Салмаков,

- Ю.Ш. Абузаров, Б.А. Киршин // Науч. труды Казанского гос. вет. ин-та. - 1980. -Т.135. - С.27-34.
97. Салмаков, К.М. Живая вакцина из штамма *V. abortus* 82 и результаты её широкого применения при оздоровлении от бруцеллеза крупного рогатого скота в Российской Федерации и странах СНГ /К.М. Салмаков // Уч. записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. -2008. -Т.192. - С.129-133.
98. Салмаков, К.М. Изучение живых и убитых бруцеллезных вакцин на крупном рогатом скоте в экспериментальных условиях /К.М. Салмаков // Матер. конф. молодых ученых. -1970. - С.70-71.
99. Салмаков, К.М. Изыскание и испытание новых вакцинных штаммов бруцелл: автореф. дисс. ... док. вет. наук:16.00.03 /Салмаков Константин Михайлович – Казань, 1977. -32 с.
100. Салмаков, К.М. Изыскание и совершенствование вакцинных препаратов против бруцеллеза /К.М. Салмаков // Сб. научн. трудов. – Новосибирск, 1987. - С.26-36.
101. Салмаков, К.М. Эффективность применения живой вакцины из штамма 82 на крупном рогатом скоте /К.М. Салмаков, Ю.Ш. Абузаров, Б.А. Киршин //Ученые записки КВИ. -1978. - С.38-44.
102. Салмакова, А.В. Сравнительное изучение живых вакцин из различных штаммов *V.abortus* и влияния иммуномодуляторов на их эффективность: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.В. Салмакова. – Казань, 2010. – 22 с.
103. Салмакова, А.В. Стабильность свойств вакцинных штаммов *V.abortus* 19 / А.В. Салмакова // Матер. науч. конф. молодых ученых и специалистов «Достижения молодых ученых – в производство», посвящ. 100-летию со дня рождения профессора Х.Х. Абдуллина. – Казань, 2008. – С. 168-172.
104. Самуйленко, А.Я. Промышленная технология производства противобактериальных препаратов / Е. А. Рубан и др.; под ред. А. Я. Самуйленко // - М.: Академкнига. - 2006. - 267 с.

105. Свинцов, Р.А. Иммуноморфогенез вакцинного процесса при применении различных штаммов бруцелл: автореф. дисс. ...канд. биол. наук: 16.00.02 / Свинцов Роман Андреевич. – Казань, 2009. – 21 с.
106. Селиванов, А.В. Результаты сравнительных исследований патогенных и иммуногенных свойств инагглютинабельного штамма *Br. melitensis* № 7270 и *Br. abortus* 19 /А.В. Селиванов, Л.П. Рыжкова // Сб. науч. работ Сибир. НИВИ. -1966. –В.14. - С.329-332.
107. Скаршевская Е.И. Изучение специфичности и чувствительности непрямой (пассивной) гемагглютинации и иммунофлуоресценции при серологической диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота. /Е.И.Скаршевская//Диссерт.канд.вет.наук. Москва, 1970.-С.3-24.
108. Скаршевская, Е.И. Изучение специфичности и чувствительности реакций непрямой (пассивной) гемагглютинации и иммунофлуоресценции при серологической диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Е.И. Скаршевская. – М., 1971 – 19 с.
109. Скляр О.Д., Экспресс-методика бруцеллеза методом ПЦР / О.Д. Скляр, С.Б. Янышина, К.В. Шумилов [и др.] // Ветеринария. – 2004. – № 9. – С. 18-22.
110. Скляр, О.Д. Пути решения проблем, обуславливающих актуальность бруцеллеза в РФ / О.Д. Скляр, А.И. Климанов, К.В. Шумилов [и др.] // Ветеринария. – 2011. – № 1. – С. 34-38.
111. Скляр, О.Д. Результаты сравнительного изучения методов диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота / Скляр О.Д. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. -М., 2005. - С. 150-182.
112. Сочнев, В.В. Сравнительная оценка некоторых серологических реакций при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота / В.В. Сочнев, Т.А. Демина, Н.П. Старунова; В.М. Петешева; Г.И. Григорьева // Профилактика и лечение инфекционных и инвазионных заболеваний с.-х. животных в условиях Нечерноземья. Сб. науч. тр. - 1987. - С. 33-37.

113. Сочнев, В.В. Функционирование паразитарной системы бруцеллеза в европейской части РФ / В.В. Сочнев, Н.Г. Горчакова, А.В. Усенков // Ветеринарная патология. – 2004. – № 4 (11). – С. 46-54.
114. Сумароков, А.А. Сравнительное изучение безвредности, реактогенности и антигенной активности бруцеллёзной химической и живой вакцин в условиях контролируемого эпидемиологического опыта /А.А. Сумароков, Г.А. Каринская, Е.А. Драновская //ЖМЭИ. -1984. - №2. - С.58-63.
115. Таран, И.Ф. Иммунологическая реактивность морских свинок в условиях взаимных наслоений вакцинного и инфекционного процессов при бруцеллёзе /И.Ф. Таран, Н.А. Погорелов, Н.А. Рыбасов //Проблемы особо опасных инфекций. -1969. -№ 4. - С.63-67.
116. Тимофеев, А.Ф. Изменение бруцелл типов Bovis и Melitensis под влиянием организма иксодовых клещей и тирация бруцеллезных штаммов /А.Ф. Тимофеев // Известия АН Киргиз. ССР. Серия биол. наук. -1962 -Т. 4. -В.5. - С.15-26.
117. Третьяк, Н.Т. Оздоровление маралов от бруцеллеза с помощью прививки вакцины из штамма 82/Н.Т. Третьяк // Ветеринария. -1985. -№5. - С.23-25.
118. Уласевич, П.С. Применение вакцины из штамма Rev 1 в целях профилактики бруцеллёза мелкого рогатого скота /П.С. Уласевич // Тр. ВИЭВ. -1974. -Т.42. - С.257-262.
119. Уразов, Т.Н. Изучение иммуногенеза и иммунных свойств новых вакцинных штаммов бруцелл /Т.Н. Уразов, Г.М. Сафина, А.М. Фомин, А.К. Галиуллин, К.М. Салмаков, Э.М. Плотникова, Р.А. Салахутдинов, В.П. Ильичев, Г.М. Ахунова, О.Т. Муллакаев, Г.Р. Нурмухаметова // Ветеринарный врач. -2004. №1. - С.13-17.
120. Уралева, В.С. Характеристика антибиотикоустойчивого штамма Brucellamelitensis 599-Т-17 как возможного вакцинного /В.С. Уралева //

Спец. профилактика особо опасных инфекций.–М.: Медицина,1964. - С.193-199.

121. Устаев, В.М. Бруцеллез крупного рогатого скота в Астраханской области: эпизоотологический мониторинг и совершенствование противобруцеллезных мероприятий: автореф. дис. ... канд. вет. наук / В.М. Устаев. – М., 2010 – 27 с.

122. Фомин, А. М. Разработка и совершенствование средств и методов диагностики и специфической профилактики при бруцеллезе крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра вет. наук / А. М. Фомин. – Казань, 2001. – 36 с.

123. Фомин, А.М.Abortогенные и антигенные свойства антибиотикорезистентных вариантов штамма *B. abortus* 82 /А.М. Фомин, К.М. Салмаков, Г.М. Сафина, Г.М. Галимова, Р.А. Крючков //Ветеринарный врач. -2006. -Усовершенствованная технология эритроцитарный АГ для РНГА и РПГА, экономичен, доступен для массового производства, требует меньше времени и затрат труда для получения большего количества препаратаУсовершенствованная технология эритроцитарный АГ для РНГА и РПГА, экономичен, доступен для массового производства, требует меньше времени и затрат труда для получения большего количества препарата№ 1. - С.18-20.

124. Фомин, А.М. Титрация дозы иммуностимулятора ксимедона на молодняке крупного рогатого скота, привитого противобруцеллезной вакциной из инагглютиногенного штамма R-1096 *Brucella abortus* /А.М. Фомин, Х.Н. Макаев, Т.М. Ткачев, Ю.В. Куняев, Л.П. Боровикова, В.А. Локтионова //Матер. Междунар. науч. конф., посвящ. 125-летию КГАВМ. – Казань,1998. -Ч. 1. - С.92.

125. Хаиров С.Г. РНГА в диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота // Вестник ветеринария. – 2005. – № 1(32). – С. 18-26.

126. Хаиров, С.Г. Антиген бруцеллезный эритроцитарный для реакции непрямой гемагглютинации: Технология получения, стандартизация,

контроль, диагностическая эффективность: дис. ... докт. вет. наук / С.Г. Хаиров. –Махачкала. - 2001. - 288 с.

127. Хаиров, С.Г. Получение стандартного эритроцитарного диагностикума для РНГА / С.Г. Хаиров, О.Ю. Юсупов, К.В. Шумилов [и др.] // Особенности профилактики и меры борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных в условиях Дагестана: сб. науч. трудов. – Махачкала, 1987. – С. 26-32.

128. Хаиров, С.Г. Реакция непрямой гемагглютинации при бруцеллезе крупного рогатого скота / С.Г. Хаиров, О.Ю. Юсупов, К.В. Шумилов, А.Н. Климанов // Ветеринария. – № 2. – 2005. – С. 25-26.

129. Хаиров, С.Г. РНГА при бруцеллезе овец и коз / С.Г. Хаиров, О.Ю. Юсупов // Вестник Ветеринарии. – 2005. – № 4(35). – С. 39-43.

130. Хаиров, С.Г. Сравнительная оценка бруцеллезных антигенов в реакции непрямой гемагглютинации / С.Г. Хаиров, О.Ю. Юсупов, Д.М. Рамазанова, Э.А. Яникова // Вестник ветеринарии. -2011. -№3(58). –С.61-66.

131. Цэрэндаш, Ч. Опыт применения вакцины из штамма *Br. melitensis* Рев-1 на крупном рогатом скоте в условиях МНР /Ч. Цэрэндаш //Инфекционная патология сельскохозяйственных животных: тр. ВИЭВ. – М., 1984. -Т.61. -С.21-26.

132. Чулков, П.А. Изучение ветеринарных мероприятий при ликвидации бруцеллеза крупного рогатого скота и их экономической эффективности : диссертация ... кандидата ветеринарных наук: 16.00.00 / П. А. Чулков. - Москва, 1971. - 164 с.

133. Шахов, А.Г. К вопросу об иммуногенных свойствах штаммов бруцелл, не образующих антител /А.Г. Шахов //Тр. Воронеж. НИВС. - 1966. -В.5. - С.57-61.

134. Шумилов, К.В. Вакцина против бруцеллеза крупного рогатого скота из штамма *Brucella abortus* 75/79-AB /К.В. Шумилов, О.Д. Скляр, Л.П.

Мельниченко, А.И. Климанов, И.П. Никифоров // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва, 2007; Т. 68. - С. 111-118.

135. Шуралев, Э.А. Изучение иммуногенности вакцины из штамма *B. abortus* 82-ПЧ на морских свинках при сочетанном применении с иммуномодуляторами /Э.А. Шуралев, К.М. Салмаков //Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария. – Екатеринбург. -1999. - С.297-298.

136. Щипко, С.Г. Реактогенные и иммуногенные свойства вакцины из штамма 82 на свиньях /С.Г. Щипко //Сб. научн. трудов Казан. вет. ин-та. - 1984. - С.65-75.

137. Щипко, С.Г. Специфическая профилактика бруцеллеза свиней с помощью живой вакцины из штамма *B. abortus* 82: автореф. дисс. ... канд. вет. наук: /Щипко С.Г. – Казань, 1989. -21 с.

138. Юсупов, О.Ю. Диагностическое значение РНГА при бруцеллезе животных / О.Ю. Юсупов, С.Г. Хаиров, С.Ш. Кабардиев, О.Д. Скляр, А.И. Климанов, В.Г. Ощепков, Л.В. Дегтяренко, Д.А. Девришов //Ветеринария. - 2012. -№ 8. -С.7-12.

139. Юсупов, О.Ю. Опыт борьбы с бруцеллезом овец / О.Ю.Юсупов // Ветеринария. - 1983. - № 6. - С. 15-16.

140. Юсупов, О.Ю. Система мер борьбы с бруцеллезом овец в условиях отгонного животноводства / О.Ю. Юсупов // Сб. Матер, науч. сессии РАСХН. - М. - 1999. - С. 176-177.

141. Юсупов, О.Ю. Эффективность РНГА при бруцеллезе крупного рогатого скота, овец и коз / О.Ю. Юсупов, С.Г. Хаиров, С.Ш. Кабардиев, О.Д. Скляр, А.И. Климанов, В.Г. Ощепков, Л.В. Дегтяренко, Д.А. Девришов //Ветеринария. -2015. -№ 11. - С.22-25.

142. Яникова, Э.А.Изыскание метода получения бруцеллезного эритроцитарного антигена для РНГА/ Яникова, Э.А., Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю.,Алиев А.Ю. // Ученые записки Казанской государственной академии

ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – Казань. -2015. - Том 221 (1). – С.269-273.

143. Янышев, А.А. Бруцеллез крупного и мелкого рогатого скота в Южном Федеральном округе: эпизоотологический мониторинг и совершенствование противоэпизоотических мероприятий: автореф. дис. ... канд. вет. наук / А.А. Янышев. – М., 2007. – 21 с.

144. Abdelbaset E. Abdelbaset. Sero-diagnosis of brucellosis in sheep and humans in Assiut and El-Minya governorates, Egypt / Abdelbaset E. Abdelbaset, Mostafa F. N. Abushahba, Maha I. Hamed, Mohamed S. Rawy // International Journal of Veterinary Science and Medicine. – 2018. – Vol. 6. – P. s63-s67.

145. Abeledo, M.A. Eficacia comparativa entre diferentes metods serological para el diagnostico de la brucellosis bovina / Abeledo M.A. // Revista de Salud Animal. – 1982. – Vol. 4. – № 2. – P. 33-41.

146. Akhvlediani, T. Epidemiological and clinical features of brucellosis in the Country Of Georgia / T. Akhvlediani, M.P. Nikolich, N. Trapaidze, C.T. Bautista, N. Garuchava, L. Sanodze, L. Malania, N. Chitadze, K. Sidamonidze, P. Innadze, N. Kokaia, R.G. Rivard, M.J. Hepburn // PLoS ONE. – 2017. – V. 12. – № 1. – P. e0170376.

147. Ali, S. Seroprevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in the Potohar Plateau, Pakistan / S. Ali, I. Khan, M.W. Akbar, M.N. Iqbal, S. Akhter, M. Irfan, A. Muhammad, S. Umar, A. Mahmood, H. Neubauer, F. Melzer, H. El-Adawy, E.N. Abatih, Q. Ali, H. Ahmed // BMC Research Notes. – 2017. – V. 10. – № 1. – P. 73.

148. Alshaikh, M. A.A. First Detection of Brucella abortus in Camel Serum in Saudi Arabia using the Polymerase Chain Reaction / M. A.A. Alshaikh , A. I. Al-Haidary , R. S. Aljumaah , O. B. Mohammed , M. M. Al-Korashi , Sawsan A. Omer , A. R. Gar ElNabi & M. F. Hussein // Journal of Applied Animal Research. 2007. – Vol. 31. – № 2. – P. 149-152.

149. Amato Gauci, A.J. The return of brucellosis / A.J. Amato Gauci // *Maltese Medical Journal*. – 1995. – Vol. 7. – P. 7-8.
150. Anisur Rahman, A.K.M. Bayesian estimation of true prevalence, sensitivity and specificity of indirect ELISA, Rose Bengal Test and Slow Agglutination Test for the diagnosis of brucellosis in sheep and goats in Bangladesh / A.K.M. Anisur Rahman, Claude Saegerman, Dirk Berkvens, David Fretin, Abatih Emmanuel // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2013. – Vol. 110. – № 21. – P. 242-252.
151. Arif, Sh. Evaluation of three serological tests for diagnosis of bovine brucellosis in smallholder farms in Pakistan by estimating sensitivity and specificity using Bayesian latent class analysis / Shumaila Arif, Jane Heller, Marta Hernandez-Jover, David M. McGill, Peter C. Thomson // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2018. – Vol. 149. – P. 21-28.
152. Bedr'Eddine Aïnseba. A model for ovine brucellosis incorporating direct and indirect transmission / Bedr'Eddine Aïnseba, Chahrazed Benosman & Pierre Magal // *Journal of Biological Dynamics*. – 2010. – Vol. 4. – № 1. – P. 2-11.
153. Beradze, I. БіобезпекатадіагностикабруцельозувлабораторіїміністерствасільськогосподарстваГрузії / I. Beradze, M. Nikolaishvili, M. Donduashvili, M. Zakareishvili // *Ветеринарна медицина*. – 2013. – № 97. – P. 50-51.
154. Braun, W. On the problem of naturally occurring aberrant strains of brucella / W. Braun, G.Oglesby // *Proc. Ses. Exp. Biol. Med.* -1962. -109. - P.875-879.
155. Bricker, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis / B.J. Bricker // *Veterinary Microbiology*. – 2002. – Vol. 90. – P. 435-446.
156. Ciocchini, Andrés E. A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigen for diagnosis of bovine brucellosis / Andrés E. Ciocchini, Diego A. Rey Serantes, Luciano J. Melli, Leticia S. Guidolin, Juan E. Ugalde // *Veterinary Microbiology*. – 2014. – Vol. 172. – Issues 3-427. – P. 455-465.

157. Corrente, M. Serological diagnosis of bovine brucellosis using *B. melitensis* strain B115 / Marialaura Corrente, Costantina Desario, Antonio Parisi, Erika Grandolfo, Domenico Buonavoglia // *Journal of Microbiological Methods*. – 2015. – Vol. 119. – P. 106-109.
158. Ducrotoy, M. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: current challenges for management, diagnosis and control / Ducrotoy M., Welburn S., Bertu W.J., Gusi A.M., Ocholi R., Matope G., Cadmus S., Conde-Álvarez R., Moriyón I., Blasco J.M. // *Acta Tropica*. – 2017. – Vol. 165. – P. 179-193.
159. Emmerzaal, A. The Dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: The impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests / A. Emmerzaal, J.J. de Wit, Th. Dijkstra, D. Bakker & F.G. van Zijderveld // *Veterinary Quarterly*. – 2002. – Vol. 24. – Issue 1. – P. 40-46.
160. Erganis, O. Comparison of rose bengal plate test antigens prepared from *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* / O. Erganis [et al.] // *Bul.veter.Inst. in Pulawy*. – 2005. – Vol. 49. – № 2. – P. 165-167.
161. Ficht, T.A. *Brucella* taxonomy and evolution / Ficht T.A. // *Brucellosis 2005: International Research Conference Including the 58th Brucellosis Research Conference Merida, Yucatan*. – Mexico October 15th to 19th, 2005. – P. 42-53.
162. Grushina, T. Universal indirect enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of human and animal brucellosis in Kazakhstan / T. Grushina, B. Atshabar, M. Syzdykov, S. Daulbaeva [et al.] // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № Suppl. 5. – P. F46-F48.
163. Gwatkin, R. Search for a *Brucella* bacteriophage / R.Gwatkin // *J. Inf. Dis.* -1931. -48. -P.404-411.
164. Iskandarov, M.I. The chromatic antigen for express-diagnostics of animal brucellosis / M.I. Iskandarov, R. Karadurdyev, S. Iskandarova, B. Sopiyevev // *Türkmenistanyň resmi patent býulleteni*. – Ashgabat, 2003. – P. 10-11.
165. Kassymov, E.I. An improved method of conglutinating test at diagnostics of brucellosis and other infectious diseases / E.I. Kassymov, S. Zhumagalikyzy

// World Academy of Science, Engineering and Technology. – 2011. – Vol. 80. – P. 247-248.

166. Kostov, G. Epizootiology of Brucellosis of Animals in Bulgaria / G. Kostov & S. Martinov // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2001. – Vol. 15. – № 2. – P. 136-139.

167. Leyla, G. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples / G. Leyla, G. Kadri // Veterinary Microbiology. – 2003. – Vol. 93. – №1. – P.53-61.

168. Majid Avijgan. Clinical and serological approach to patients with brucellosis: A common diagnostic dilemma and a worldwide perspective / Majid Avijgan, Mahsa Rostamnezhad, Hamidreza Jahanbani-Ardakani // Microbial Pathogenesis. – April 2019. – Vol. 129. – P. 125-130.

169. Martinez, D.E. Brucellosis in buffalos from Corrientes northeast (Argentina) / D.E. Martinez, R.A. Jacobo, M.F. Cipolini, E.I. Martinez & G. Crudeli // Italian Journal of Animal Science. – 2007. – Vol. 6 – Issue sup2. – P. 832-834.

170. Miller, R. The prevalence of brucellosis in cattle, goats and humans in rural Uganda: a comparative study / R. Miller, J.B. Kaneene, J.L. Nakavuma, P. Ssajjakambwe, P. Vudriko, N. Musisi // Transboundary and Emerging Diseases. – 2016. – Vol. 63. – № 6. – P. e197-e210.

171. Montagnaro, S. Comparison of fluorescence polarization assay with Rose Bengal (RB) test and complement fixation tests for the diagnosis of buffalo (*Bubalus bubalis*) brucellosis in a high-prevalence area / S. Montagnaro, U. Pagnini, T. Diana, L. Bruno, L. Baldi & G. Iovane // Italian Journal of Animal Science. – 2007. – Vol. 6. – Issue sup2. – P. 858-861.

172. Neglia, G. Brucella DNA is not detected in in-vitro produced embryos derived from ovaries of naturally infected buffaloes / G. Neglia, L. Zicarelli, Di Palo, E. Picillo, L. Attanasio, L. Boccia, B. Gasparrini, De Rosa, T. Pepe, A.E. Gravino, G. Iovane, C. Buonavoglia & L. Manna // Italian Journal of Animal

Science. – 2007. – Vol. 6 - Issue sup2: Proceedings of the 8th World Buffalo Congress, Caserta, October 19-22, 2007. – P. 900-903.

173. Olsen, S.C. Immune responses of elk to initial and booster vaccinations with *Brucella abortus* strain RB51 or 19 /S.C. Olsen, S.J Fach., M.V.Palmer, R.E.Sacco, W.C. Stoffregen, W.R. Waters // Clin. Vaccine Immunol. -2006. Oct. -N.13(10). -P.1098-1103.

174. Osterman, B. International committee on systematic of prokaryotes; subcommittee on the taxonomy of *Brucella* /B.Osterman, I. Moriyon // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. -2006. -Vol.56 (5). -P.1173-1175.

175. Rietschel E.T, Brade H, Brade L, Brandenburg K. et al. Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. Prog. Clin. Biol. Res. 1987; 231:25.

176. Rietschel E.T, Brade L, Shade U. Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian hosts. Weinheim: Verlag chemie, 1998; p.1-41.

177. Rietschel E.T, Sidorczyk Z, Zahringer U, Wollenweber H.-W, Liideritz O. Analysis of the primary structure of lipid A. ACS Symp. Ser. 1983; 231: 214.

178. Rietschel E.T. Bacterial endotoxins: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J 1994; 8: 217-225.

179. Simon, E.M. Patogenicity and immunogenicity of streptomycin-dependent mutants of *Brucella* / E.M. Simon, D.T. Berman // J. Bacteriol. - 1962.- 83. -N. 6. P. 1347-1354.

180. Zamri-Saad, M. Control of animal brucellosis: the Malaysian experience / M. Zamri-Saad, M.I. Kamarudin // Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. – 2016. – Vol. 9. – № 12. – P. 1136-1140.

Приложение



Автор(ы): *Хаиров Сайгидтага Гаджиевич (RU), Юсупов Омар Юсупович (RU), Яникова Эльмира Арслановна (RU)*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2509306

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНОГО
АНТИТЕЛЬНОГО ОВИСНОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ
РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА) С
ЦЕЛЬЮ ИНДИКАЦИИ ОВИСНОГО АНТИГЕНА В
БИОМАТЕРИАЛЕ**

Патентообладатель(ли): *Государственное научное учреждение
Прикаспийский зональный научно-исследовательский
ветеринарный институт Российской академии
сельскохозяйственных наук (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2012101543

Приоритет изобретения **17 января 2012 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации **10 марта 2014 г.**

Срок действия патента истекает **17 января 2032 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Б.П. Симонов

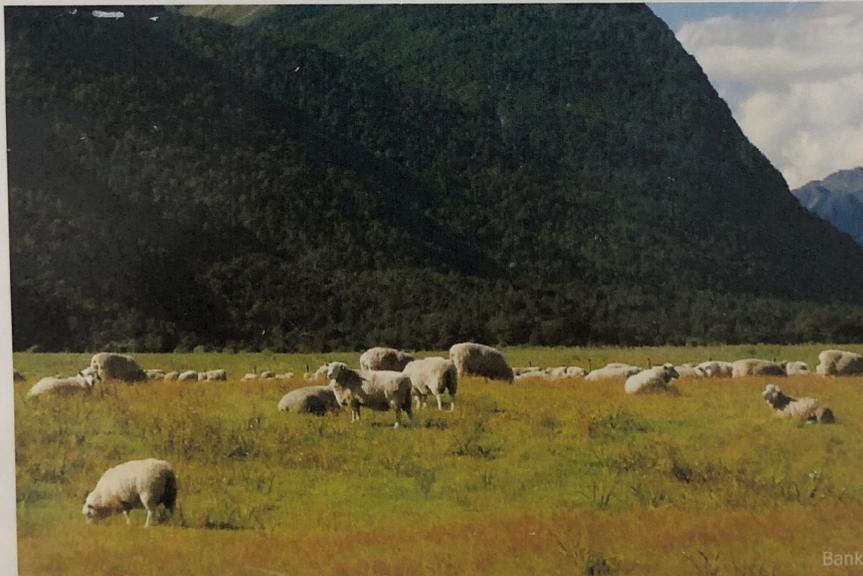


Автор(ы): *Хаиров Сайгидтага Гаджиевич (RU), Юсупов Омар Юсупович (RU), Яникова Эльмира Арслановна (RU)*

Российская академия сельскохозяйственных наук
ГНУ Прикаспийский зональный научно-исследовательский
ветеринарный институт

**ИЗГОТОВЛЕНИЕ И ИСПЫТАНИЕ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ
БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ АНТИГЕННЫХ И АНТИТЕЛЬНЫХ
ДИГНОСТИКУМОВ ДЛЯ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ
ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА) С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И
ИНДИКАЦИИ БРУЦЕЛЛ В БИОМАТЕРИАЛЕ**

(МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ)



МАХАЧКАЛА 2013 г.

Методические рекомендации изготовления эритроцитарных бруцеллезных антигенных и антительных диагностикумов для РНГА с целью выявления специфических антител в сыворотке крови и индикации бруцелл в биоматериале подготовили: главный научный сотрудник лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики бруцеллеза ГНУ Прикаспийского зонального НИВИ, доктор ветеринарных наук Хаиров С. Г., заведующий лабораторией эпизоотологии, диагностики и профилактики бруцеллеза ГНУ Прикаспийского зонального НИВИ, доктор ветеринарных наук, профессор Юсупов О.Ю., младший научный сотрудник лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики бруцеллеза Прикаспийского зонального НИВИ Яникова Э. А.

Предназначены для ветеринарных лабораторий и научных сотрудников, занимающихся проблемой бруцеллеза.

Рекомендации рассмотрены, одобрены и рекомендованы к изданию ученым советом ГНУ Прикаспийского зонального НИВИ (протокол № 3 от 19 сентября 2013 г.) и Комитетом по ветеринарии РД (протокол № 1 от 24 сентября 2013 г.)



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный
институт»

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению нового экспресс-метода для поствакцинальной
дифференциальной диагностики бруцеллеза овец и коз



МАХАЧКАЛА 2017

Методические рекомендации подготовили главный научный сотрудник лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики бруцеллеза доктор ветеринарных наук, профессор О.Ю. Юсупов, научные сотрудники Э.А. Яникова, П.М. Кабахова, младшие научные сотрудники Г.М. Шехилалиева, К.Х. Алиева и А.А. Халиков.

Рекомендации рассчитаны на специалистов научно-исследовательских ветеринарных учреждений, работающих по проблеме бруцеллеза, ветеринарных лабораторий и практических ветеринарных работников.

Одобрены Ученым советом ФГБНУ Прикаспийского зонального НИВИ (протокол № 9 от 11 декабря 2017 г.)

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
**ПРИКАСПИЙСКИЙ ЗОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-
 ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ – ФИЛИАЛ
 ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
 НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
 «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РЕСПУБЛИКИ
 ДАГЕСТАН»**
 (Прикаспийский зональный НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦ РД»)
**СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ЗОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-
 ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ – ФИЛИАЛ
 ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
 НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ РОСТОВСКИЙ
 АГРАРНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»**
 (СКЗНИВИ – филиал ФГБНУ ФРАНЦ)
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
 ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
 «КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
 ИМЕНИ И.Т. ТРУБИЛИНА»**
 (ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ)

Утверждаю

И.о. начальника Управления ветеринарии

Ростовской области



«08» апреля 2020 г.

Овчаров А.П.

**Применение РНГА с усовершенствованным антигеном в
 «Наборе для серологической диагностики бруцеллеза крупного
 и мелкого рогатого скота в реакции непрямой
 гемагглютинации (РНГА)»
 (методические рекомендации)**

г.Ростов-на-Дону 2020

Рекомендации разработаны к.в.н. М.М. Микаиловым, Э.А. Яниковой (Прикаспийский зональный НИВИ – филиалом ФГБНУ «ФАНЦ РД»), д.в.н., профессором О.Ю. Черных (ГБУ Краснодарского края «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория») к.в.н. Р.А. Кривonos (Департамент ветеринарии Краснодарского края), д.в.н. А.М. Гулюкиным (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН), А.А. Халиковым, А.Т. Гулиевой (Прикаспийский зональный НИВИ – филиалом ФГБНУ «ФАНЦ РД»), д.б.н., профессор А.Г. Кошаевым (ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ), д.б.н., А.Н. Черновым (Татарский НИИАХП – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН), д.в.п., доцент Коваленко А.В., к.с.-х.н., доцент Дробин Ю.Д. (СКЗНИВИ – филиал ФГБНУ ФРАНЦ).

Рекомендации рассчитаны на специалистов научно-исследовательских ветеринарных учреждений, работающих по проблеме бруцеллеза и работников практических ветеринарных лабораторий.

Рецензенты:

Мусиев Д.Г. – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой эпизоотологии ФГБОУ ВО «ДагГАУ им. М.М. Джамбулатова»

Гунашев Ш.А. – кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры эпизоотологии ФГБОУ ВО «ДагГАУ им. М.М. Джамбулатова»



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПРИКАСПИЙСКИЙ ЗОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ – ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН»
(Прикаспийский зональный НИВИ – филиал ФГБНУ «ФАНЦ РД»)

ул. Дахадаева, 88, г. Махачкала, Республика Дагестан, 367000 Телефон, факс: 8 (8722) 67-94-65
www.pznivi.ru, e-mail: pznivi@bk.ru

14.09.2020, № 01-03/57

На № _____ от _____

Справка

об использовании в курс повышения квалификации материалов кандидатской диссертации Яниковой Эльмиры Арслановны на тему: «Способы получения бруцеллезных антигенных и антительных эритроцитарных диагностикумов и оценка их эффективности»

Результаты научно-исследовательской работы и кандидатской диссертации старшего научного сотрудника лаборатории инфекционной патологии сельскохозяйственных животных Прикаспийского зонального НИВИ – филиала ФГБНУ «ФАНЦ РД» Яниковой Э.А. внедрены в курс повышения квалификации работников ветеринарных служб в виде методических рекомендаций.

Справка дана для предъявления в совет по защите диссертации.

Директор Прикаспийского зонального НИВИ –
филиала ФГБНУ «ФАНЦ РД», д.в.н.

А.Ю. Алиев



УТВЕРЖДАЮ:
Начальник ГБУ РД
«Карабудахкентское РВУ»

И.Г. Гаджиев
2013 г.

АКТ

Изучение специфичности усовершенствованного антигенного эритроцитарного диагностикума для РНГА

Мы, ниже подписавшиеся, ветеринарный врач Карабудахкентского района Ибадуллаев П., главный научный сотрудник Прикаспийского ЗНИВИ, доктор ветеринарных наук Хаиров С.Г., младший научный сотрудник Прикаспийского ЗНИВИ Яникова Э.А., составили настоящий акт о том, что 28 февраля 2011 г. проведены испытания усовершенствованного антигенного эритроцитарного диагностикума для РНГА в благополучных по бруцеллезу хозяйствах Карабудахкентского района. С целью изучения специфичности было подвергнуто исследованию 556 голов крупного рогатого скота (коровы, буйволы и молодняк 6-7 мес. и старше).

Серологические исследования 556 проб сывороток крови у разных половозрастных групп крупного рогатого скота дали отрицательные результаты, как в РНГА, так и в РА и РСК.

(Handwritten signatures of P. Ibadullaev, S.G. Khaierov, and E.A. Yanikova)

П. Ибадуллаев

С.Г. Хаиров

Э.А. Яникова

УТВЕРЖДАЮ:

Начальник ГБУ РД
«Кизилюртовское ВУОЖ»

Р.С. Айдиев

«12» мая 2015 г.



АКТ

Испытание эффективности применения усовершенствованного антигенного эритроцитарного диагностикума для РНГА

Мы, ниже подписавшиеся, ветеринарный врач МТФ «Шамхальский» Кизилюртовского района Гайдаров Х., главный научный сотрудник Прикаспийского ЗНИВИ, доктор ветеринарных наук Хаиров С.Г., младший научный сотрудник Прикаспийского ЗНИВИ Яникова Э.А., составили настоящий акт о том, что с марта 2015 по май 2015 года в хозяйстве проведены испытания эффективности применения усовершенствованного антигенного эритроцитарного диагностикума для РНГА. Серологические исследования 120 голов крупного рогатого скота были проведены в РНГА, РСК и РА. РА и РСК дали отрицательный результат у всего поголовья, в РНГА реагировало 3 животных, два с титром 1:100, а одно в титре 1:50.

Повторные серологические исследования спустя 2 месяца выявили увеличение титра в РНГА и получение положительных результатов в РСК и РА. Далее проведены нами исследования сывороток в РСК, РНГА и РА 113 нетелей и коров на бруцеллез неблагополучного Кизилюртовского района, где заболевание бруцеллезом широко распространилось.

Заключение: Анализ результатов показывает достоверность результатов РНГА и действительно подтверждает сделанный вывод, что титры 1:100 и более нужно оценивать, как положительный диагностический результат, в виду того, что 51 животное дало реакцию в названных титрах, а 44 были положительными, 3 сомнительными в РСК или РА. Из 23 голов животных, которые реагировали в РСК, получены титры 1:100 и выше в РНГА.

Х. Гайдаров

С.Г. Хаиров

Э.А. Яникова

УТВЕРЖДАЮ:
 Заведующий Сулакской ветеринарной
 лечебницей Гунибского района РД
 Микаилов М.М.
 «15» Сентября 2017 г.



АКТ

Изучение эффективности и испытание РНГА при исследованиях молока в поствакцинальной и дифференциальной диагностике крупного рогатого скота привитого вакциной из штамма В. abortus 82

Мы, ниже подписавшиеся, ветеринарный фельдшер Сулакской ветеринарной лечебницы Гунибского района Курбанов Г.А., старший научный сотрудник Прикаспийского ЗНИВИ, кандидат ветеринарных наук Микаилов М.М., научный сотрудник Прикаспийского ЗНИВИ Яникова Э.А., составили настоящий акт о том, что специальный опыт проведен нами в 2017 г. с целью изучения диагностического значения РНГА с молоком для дифференциации поствакцинальных реакций животных, привитых вакциной из штамма 82. Для этого в благополучном по бруцеллезу хозяйстве СПК «УРИ» вакциной из штамма 82 иммунизировали 44 лактирующих коровы.

Животных исследовали в период, когда поствакцинальные реакции имеют максимальные титры (20-30 дней после иммунизации), а также в более поздние сроки (через каждые 30 дней). Во всех случаях при исследовании молока в РНГА получены отрицательные результаты, тогда как с сыворотками крови получены положительные реакции.

Заключение: Результаты этих исследований дают основание рекомендовать применение РНГА с молоком в качестве одного из методов дифференциации здоровых коров с поствакцинальными реакциями от естественно зараженных бруцеллезом животных при диагностических исследованиях крупного рогатого скота, привитого вакциной из штамма В. abortus 82.

Г.А. Курбанов

М.М. Микаилов

Э.А. Яникова