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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Краснодар – 2020

Работа выполнена в Прикаспийском зональном научно-исследовательском ветеринарном институте – филиале ФГБНУ «ФАНЦ РД» (г. Махачкала).

Научный руководитель **Черных Олег Юрьевич**,
доктор ветеринарных наук, профессор

Официальные оппоненты **Агольцов Валерий Александрович,**
доктор ветеринарных наук, профессор
кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»

Власенко Василий Сергеевич,
доктор биологических наук, доцент,
отдел ветеринарии ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН)

Защита диссертации состоится «09» декабря 2020 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.038.07 на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13, корпус факультета ветеринарной медицины.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке университета и на сайтах: ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» – http://www.kubsau.ru и ВАК – http://vak.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук Диана Петровна Винокурова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Важным 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. 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 со 118 случаев в 2017 г. до 122 – 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 – 2019 г., мрс – с 385 до 265. Несмотря на некоторое снижение заболеваемости животных, не удается полностью оздоровить и достичь устойчивого эпизоотического благополучия в субъекте РФ. Ежегодно заболевание регистрируется в новых пунктах. Актуальными при бруцеллезе продолжают оставаться вопросы диагностики и профилактики (Скляров О.Д., 2004, 2005; Салмаков К.М., 2008).

Неоценим вклад ученых (Желудков М.М., 1992; Касьянов И.А., 1995; Альбертян М.П., 1996; Косилов И.А., 1999; Сочнев В.В., 2004; Авилов В.М. 2006; Самуйленко А.Я., 2006; Фомин А.М., 2006; Винокуров Н.В., 2008; Хаиров С.Г., 2011; Шумилов К.В., 2011; Скляров О.Д., 2011; Гулюкин М.И., 2013; Дегтяренко Л.В., 2015; Искандаров М.И., 2017 и другие), которые изучали эпизоотологию, 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, как следствие – нетрудоспособность и инвалидность. Неблагополучные по бруцеллезу хозяйства несут экономические потери из-за абортов, 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 (Юсупов О.Ю., 1983; Хаиров С.Г.,2001; Салмаков К.М., 2008).

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 (Сочнев В.В., 1987; Дегтеренко Л.В., 2001; Хаиров С.Г., 2005; Скляров О.Д., 2005; Винокуров Н.В., 2008; Карлова М.Ю., 2009; Попова Т.Г., 2011).

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 (Бруцеллез. Ветеринарные правила ВП 13.3.1302-96; ГОСТ 34105-2017).

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 больных животных – научно-практическая задача (Хаиров С.Г., 1987; Сочнев В.В., 1987; Скляров О.Д., 2005; Дегтяренко Л.В., 2005; Самуйленко А.Я., 2006; Ощепков В.Г. 2010).

Одной из существующих перспективных реакций является РНГА. Многократные серологические диагностические исследования у животных разных видов показали ее более высокую чувствительность и специфичность. Но использование в повседневной практике было затянуто, в связи с отсутствием стандарта и стабильного эритроцитарного антигена, обеспечивающего получение воспроизводимых результатов РНГА и малой изученности реакции (Юсупов О.Ю., 2015).

Таким образом, способы получения бруцеллезных антигенных и антительных ЭД и оценка их эффективности являются актуальной задачей.

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 (Салмаков К.М., 1980; Авилов В.М., 1997; Гордиенко Л.Н., 2001; Шумилов, К.В., 2007; Альбертян М.П., 2014; Аракелян П.К., 2016 и другие). Из методов диагностики перспективной была показана РНГА (Хаиров С.Г., 2005; Винокуров Н.В., 2008; Ромахов Б.Н., 2008; Карлова М.Ю., 2009; Юсупов О.Ю., 2012).

Многократные серологические диагностические исследования у животных разных видов показали ее более высокую чувствительность и специфичность. Однако, существующие способы индикации 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.

Для реализации намеченной цели были поставлены следующие задачи:

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 АТ в молоке экспресс-методом.
4. Изучить эффективность и испытать РНГА при исследованиях дифференциальной диагностики, после применении 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 АТ 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.

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 АТ 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.

Разработано и внедрено в производство 5 нормативных документов, из которых 3 – методические рекомендации, утвержденные в установленном порядке, новизна полученных данных подтверждена 2 Патентами РФ.

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

В результате экспериментальных исследований разработана НД:

1. Изготовление и испытание эритроцитарных бруцеллезных антигенных и антительных диагностикумов для РНГА с целью выявления специфических антител в сыворотке крови и индикации бруцелл в биоматериале, утв. ГНУ «Прикаспийский зональный НИВИ» от 19.09.2013 г. (2013).

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

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

Методология и методы исследования. В представленной работе были использованы серологические, бактериологические методы исследования. 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 повторностях, 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 Прикаспийского зонального 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.

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
➢ стабилизация эритроцитов и создание модификации метода; ➢ способ получения бруцеллезного эритроцитарного антигена; ➢ способ выявления противобруцеллезных АТ в молоке; ➢ исследования для дифференциальной диагностики после применения вакцины из штамма *B. abortus* 82; ➢ способ получения бруцеллезного антительного диагностикума.

В работе использован вакцинный штамм бруцеллы *B. abortus* 19. Патологический материал: сыворотки крови и молоко больных бруцеллезом сельскохозяйственных животных, абортированные плоды, сыворотки крови и молоко здоровых животных.

Применены различные методы диагностики бруцеллеза, такие 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.;

– 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

Способ фиксации эритроцитов имеет значение для создания эффективных диагностикумов. На первом этапе наших исследований в сравнительном аспекте были изучены различные методы стабилизации эритроцитов для РНГА (таблица 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	Леви М.С. с соавторами	1:1600
	Краскина Н.А. с	1:1600

бруцелл по нашему методу	соавторами	
	Меньшов П.И. и Шмутер М.Ф.	1:3200
	Weinbach R. в нашей модификации	1:25600

Метод по Вайнбаху в нашей модификации имеет 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 получения антигена эритроцитарного бруцеллезного для РНГА, со сроком годности стабилизированных эритроцитов 2 года и более.

2.2.2 Изыскание способа получения бруцеллезного эритроцитарного АГ для РНГА

Для получения эритроцитарного АГ использовали классическую методику («антиген № 1»), для «антигена № 2» разработали усовершенствованный метод. Показатели титрации для определения специфичности и активности АГ эритроцитарного бруцеллезного № 1 и № 2 представлены в таблицах 3, 4.

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

К-во АГ на 1 см^3 5%-ной взвеси эритро-цитов	Титры РНГА										С физ-ким р-ром
	Стандартный образец сыворотки против *B. abortus*							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	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-	-

Таблица 4 – Данные определения специфичности и активности эритроцитарного АГ бруцеллезного в РНГА (№ 2)

Кол-во АГ в 1 см^3 10%-ной	Титры РНГА										Физиио-логичес-кий раствор
	Стандартный образец сыворотки против *B. abortus*							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	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-	-

Обработка вторичным алкилсульфатом натрия (концентрация 2%) бактериальной бруцеллезной массы и последующая сенсибилизация бараньих эритроцитов, в соотношении к 10%-ной взвеси эритроцитов в объеме 1 $см^3$, вносится 0,75-1,0 $см^3$ АГ, дает возможность получить для РНГА эритроцитарный бруцеллезный АГ, который является стандартным, высокоактивным, стабильным и высокоспецифичным. Эритроцитарный АГ, полученный по усовершенствованной методике («антиген № 2»), имеет ряд преимуществ, сокращено время сенсибилизации, отпадает время осаждения центрифугированием бактериальной массы, повышается рентабельность изготовления АГ в два раза, способ изготовления препарата значительно упрощается, экономия АГ возрастает в 2,6 раза.

Активность АГ-ов, изготовленных разными методами, не имеет различий, так как все пробы сывороток крови животных положительно реагировали в РНГА и титры были одинаковые.

При сравнительном испытании в РНГА и определении активности диагностических наборов при исследовании сывороток крови крс и мрс из хозяйств, неблагополучных по бруцеллезу животных, выявлено, что диагностикумы № 1 и № 2 показали высокую эффективность в РНГА.

Таким образом, усовершенствована технология изготовления эритроцитарного АГ для РНГА, которая экономична, доступна для массового производства, требует меньше времени и затрат труда для получения большего количества препарата. Эритроцитарный бруцеллезный АГ является высокоспецифичным, высокоактивным, стандартным, стабильным и в РНГА позволяет выявлять инфицированных больных животных.

2.2.3 Испытание усовершенствованного АГ эритроцитарного диагностикума для РНГА

Испытание усовершенствованного АГ эритроцитарного диагностикума для РНГА проводили, исследуя в РНГА сыворотки крови крс из благополучных по бруцеллезу хозяйств (таблица 5).

Таблица 5 – 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 5-6мес.	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. Арешевка	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 в РСК, РА и РНГА показывают, что 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.

Проведено исследование в РНГА с использованием АГ эритроцитарного диагностикума 1201 пробы сывороток крови крс разных половозрастных групп из неблагополучных хозяйств по бруцеллезу, имеющих различную степень распространения и разное течение болезни, для изучения в сравнительном аспекте с другими диагностическими тест-системами. По результатам исследований были получены следующие данные: в РНГА реагировало – 335 голов, РА – 162, РСК – 194.

Плановые контрольные исследования на бруцеллез животных 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, одно – в титре 1:50. Повторные серологические исследования спустя 2 месяца выявили увеличение титра в РНГА и получение положительных результатов в РСК и РА (таблица 6).

Таблица 6 – 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+++

Изучение и испытание усовершенствованного АГ эритроцитарного диагностикума для РНГА показало, что в диагностическом положительном титре 1:100 и выше выявлено положительно и сомнительно реагирующих животных в РСК и РА.

2.2.4 Выявление противобруцеллезных АТ в молоке и сыворотке экспресс-методом

Обнаружение гемагглютининов в молоке коров из неблагополучных хозяйств в РНГА, в сравнении с КР, провели, исследуя 880 проб (таблица 7).

Таблица 7 – 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% случаев у коров (247 проб), что аналогично с сывороткой крови, КР с молоком реакция была в 13,8% случаев у коров (122 пробы). 17,5% (154 пробы) положительных результатов было получено в совокупности в РА с РСК. Превосходство исследования молока, применяя РНГА и обнаруживая большее число больных, в сравнении с серологическими исследованиями с использованием РСК, РА, РНГА, видимо, обусловлено тем, 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

Проведены исследования 202 проб в серологических реакциях РНГА, РА, РСК и РИД после иммунизации вакциной из штамма *B. abortus* 82 (таблица 8).

Таблица 8 – Данные по исследованию в РНГА, РА, РСК и РИД 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.
Сектор частный 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
	итого	53	-	-	2	1	50	4	-	4	-	45	3	50
Карабудахкентский р-н, пос. Манаскент	1:400	13	9	2	1	-	1	13	-	-	-	-	12	1
	1:200	3	1	-	2	-	-	2	-	-	-	1	2	1
	1:100	2	-	-	1	1	-	1	-	1	-	-	-	2
	1:50	3	-	-	-	-	3	-	-	1	2	-	-	3
	отр.	29	-	-	-	-	29	-	-	-	-	29	-	29
	итого	50	10	2	4	1	33	16	-	2	2	30	14	36
Кировский р-н, пос.	1:400	8	3	3	2	-	-	7	-	-	-	1	8	-

Шамхал	1:200	5	-	1	1	2	1	4	-	-	-	1	1	4
	1:100	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1
	1:50	4	-	-	-	2	2	-	-	2	-	2	-	4
	отр.	81	-	-	-	-	81	-	-	-	-	81	-	81
	итого	99	3	4	3	5	84	11	1	2	-	85	9	90
Всего	1:400	25	12	5	5	-	3	24	-	-	-	1	23	2
	1:200	8	1	1	3	2	1	6	-	-	-	2	3	5
	1:100	3	-	-	1	2	-	1	1	1	-	-	-	3
	1:50	11	-	-	-	3	8	-	-	7	2	2	-	11
	отр.	155	-	-	-	-	155	-	-	-	-	155	-	155
	итого	202	13	6	9	7	167	31	1	8	2	160	26	176

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

Для этого в благополучном по бруцеллезу хозяйстве СПК «УРИ» вакциной из штамма 82 иммунизировано 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).

Установлено, что при сравнительном анализе результатов испытания РНГА и РИД для диагностики дифференциальной, после иммунизации крс вакциной, изготовленной из штамма 82, положительная РИД с О-ПС антигеном получена у животных, в сыворотке крови которых циркулируют гемагглютинины в высоких титрах (1:200-1:400 и выше), свидетельствующие об инфицировании их возбудителем бруцеллеза.

2.2.6 Разработка и испытание эритроцитарного бруцеллезного антительного диагностикума для РНГА

Разработан бруцеллезный эритроцитарный АТ диагностикум. Провели исследования материала из неблагополучных хозяйств: смывы с объектов внешней среды – 3 пробы, вода, инфицированная бруцеллами – 10, молоко – 10, овцы – 15, крс – 10 (таблица 9).

Таблица 9 – 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 B.abortus 19	-	-	3	-	3	-	3

Контаминированная 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. Данный метод пригоден для осуществления контроля за благополучием крупного рогатого скота и отвечает требованиям, предъявляемым к экспресс-методам диагностики бруцеллеза. На способ изготовления диагностикума получен патент на изобретение (№ 2493871 от 27 сентября 2013 г.).

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

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 (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты испытания антительного диагностикума для РНГА, в сравнении с РНАт и бактериологическим методом, для выявления антигена B.ovis

	Вид и группы животных	Количество исследованных		Выделено культур		Положитель-ная РНАт		Положительная РНГА с антительным диагностикумом	
		живот-ных	объек-тов	%	всего	%	всего	%	всего
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 Brucella	4	60	-	-	-	-	-	-

	melitensis Rev-1, из хозяйств, благополучных по инфекционному эпидидимиту								

Специфичность диагностикума изучали путем исследования экстракта гомогенизированных лимфоузлов и органов от 10 здоровых баранов и 4 овцематок, привитых бруцеллезной вакциной из штамма Rev-1 (300 проб материала). Во всех случаях получены результаты отрицательные, что показывает специфичность для РНГА эритроцитарного АТ диагностикума.

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

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

4 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

В результате экспериментальных исследований для практики разработана НД:

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

5 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гулиева, А.Т. Экспресс-метод диагностики бруцеллеза лактирующих коров с применением РНГА с молоком / Гулиева А.Т., Юсупов О.Ю., Микаилов М.М., **Яникова Э.А.**, Халиков А.А. // Проблемы ветеринарной науки и пути их решения: сб. науч. тр. регион. науч.-практ. конф. Махачкала, 2019. – С. 98-106.
2. Микаилов, М.М. Мониторинг эпизоотической ситуации по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота в Республике Дагестан за 2008-2017 гг. / Микаилов М.М., Юсупов О.Ю., **Яникова Э.А.**, Кабахова П.М., Халиков А.А., Гулиева А.Т., Шехилалиева Г.М., Гунашев Ш.А. // Проблемы развития АПК региона. – 2018. – № 4 (36). – С. 137-142.
3. Микаилов, М.М. Об эпизоотической ситуации по бруцеллезу животных в Республике Дагестан и мерах по ее стабилизации / Микаилов М.М., Юсупов О.Ю., Халиков А.А., **Яникова Э.А.**, Кабахова П.М., Шехилалиева Г.М., Гулиева А.Т. // Ветеринарная патология. – 2019. – № 3 (69). – С. 5-11.
4. Микаилов, М.М. Применение РНГА с усовершенствованным антигеном в «Наборе для серологической диагностики бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)» / Микаилов М.М., **Яникова Э.А.**, Черных О.Ю., Кривонос Р.А., Гулюкин А.М., Халиков А.А., Гулиева А.Т., Кощаев А.Г., Чернов А.Н. // Методические рекомендации. – Ростов-на-Дону, 2020. – 18 с.
5. Микаилов, М.М. Эпизоотическая ситуация по бруцеллезу животных в Чеченской Республике / Микаилов М.М., **Яникова Э.А.**,

Халиков А.А., Гулиева А.Т. // Ветеринария и кормление. – 2020. – № 4. – С. 40-41.

6. Хаиров, С.Г. Изготовление и испытание эритроцитарных бруцеллезных антигенных и антительных диагностикумов для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с целью выявления специфических антител в сыворотке крови и индикации бруцелл в биоматериале / Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю., **Яникова Э.А.** // Методические рекомендации. – Махачкала, 2013.– 14 с.

7. Халиков, А.А. Применение РНГА с молоком при диагностике бруцеллеза коров / Халиков А.А., Микаилов М.М., **Яникова Э.А.**, Гулиева А.Т. // Ветеринария и кормление. – 2020. – № 4. – С. 50-53.

8. Юсупов, О.Ю. Диагностика бруцеллеза крупного рогатого скота с применением РНГА с сывороткой крови и молоком / Юсупов О.Ю., Микаилов М.М., **Яникова Э.А.**, Халиков А.А. // Ветеринария и кормление. – 2017. – № 5. – С. 9-12.

9. Юсупов, О.Ю. Динамика поствакцинальных иммунологических реакций у овец, привитых вакциной из штамма B. melitensis REV-1 / Юсупов О.Ю., Микаилов М.М., **Яникова Э.А.**, Халиков А.А. // Успехи современной ветеринарной медицины в становлении устойчивого благополучия региона по заболеваниям сельскохозяйственных животных: тез. докладов Междунар. юбил. научн.-практ. конф., посвящ. 50-летию ФГБНУ Прикаспийский зональный НИВИ, 2017. – С. 125-131.

10. Юсупов, О.Ю. Применение нового экспресс-метода для поствакцинальной дифференциальной диагностики бруцеллеза овец и коз / Юсупов О.Ю., **Яникова Э.А.**, Кабахова П.М., Шехилалиева Г.М., Алиева К.Х., Халиков А.А. // Методические рекомендации. – Махачкала, 2017. – 14 с.

11. **Яникова, Э.А.** Диагностическое значение реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) при индикации бруцеллезного антигена в биоматериале / Яникова Э.А., Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю. // Ветеринарный врач. – 2014. – № 6. – С. 13-17.

12. **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. – 2015. – Т. 221. – № 1. – С. 269-273.

13. **Яникова, Э.А.** Экспресс-метод выявления противо-бруцеллезных антител в сыворотке крови и молоке / Яникова Э.А., Юсупов О.Ю., Кабахова П.М., Шехилалиева Г.М., Микаилов М.М., Гулиева А.Т. // Ветеринарный врач. – 2016. – № 5. – С. 16-20.

14. **Яникова, Э.А.** Сравнительное испытание бруцеллезного антительного эритроцитарного диагностикума в РНГА и полимеразной цепной реакции (ПЦР), для индикации бруцелл в биоматериале / Яникова Э.А., Махиева Б.М. // Ветеринария и кормление. – 2016. – № 5. – С. 41.

Патенты:

1. Патент на изобретение RU 2493871 C1, 27.09.2013. Способ получения эритроцитарного антительного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с целью индикации бруцелл в патматериале / Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю., **Яникова Э.А.**

2. Патент на изобретение RU 2509306 C2, 10.03.2014. Способ получения эритроцитарного антительного овисного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с целью индикации овисного антигена в биоматериале / Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю., **Яникова Э.А.**