

На правах рукописи

Зинова Анастасия Александровна

РАЗРАБОТКА РИД-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА
СОБАК, ВЫЗЫВАЕМОГО *B. CANIS*

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

МОСКВА 2009



003481467

Работа выполнена в лаборатории качества и стандартизации лекарственных средств против бактериальных болезней животных ФГУ «ВГНКИ», в лаборатории бруцеллеза ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, в городских ветеринарных лабораториях Москвы и Санкт-Петербурга, а также в Ленинградской и Волгоградской областных ветеринарных лабораториях в период с 2005 по 2009 год.

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук,
доцент Скияров О.Д.

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук,
доцент Альбертян М.П.

доктор ветеринарных наук,
Зенов Н.И.

Ведущая организация:

Государственное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский
институт бруцеллеза и туберкулеза живот-
ных» (ГНУ «ВНИИБТЖ» СО РАСХН), г. Омск

Защита состоится «26» ноября 2009 г. в «11⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета Д.220.011.01 в Федеральном государственном учреждении «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ») по адресу: 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, тел/факс 253-14-91.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ВГНКИ».

Автореферат разослан «19» ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,
Заслуженный ветеринарный врач РФ

 О.А. Козырев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бруцеллез собак, вызываемый *B. canis*, на сегодняшний день известен во всех странах мира. В России это заболевание относится к малоизученным. Наряду с эпизоотической и эпидемической опасностью оно препятствует успешному ведению собаководства и наносит значительный экономический ущерб отрасли, который складывается из утраты воспроизводительной функции кобелей, аборт, рождения нежизнеспособного приплода у сук, выбраковки высокопородных и ценных в племенном отношении животных.

Установлены случаи заражения людей *B. canis* как за рубежом, так и в России (Nidia E., Lucero et al, 2005; Ying и et al, 1999; Михайлова Ю.П., 2000).

Сообщения о выделении культур бруцелл от собак с отличными от *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis* свойствами были опубликованы в 60-70 годы прошлого века (Burner D.W. et al., 1968; Carmichael L.E. et al., 1966, 1968, 1981). Впервые возбудитель, ответственный за эпизоотические аборты у сук, был выделен Carmichael L.E. и предложен им совместно с Burner D.W в 1968 г. в качестве нового вида *B.canis* и принят под таким названием в 1974г.

В Российской Федерации бруцеллез собак, вызванный *B.canis*, впервые зарегистрирован в 1994г. в Волгоградской области (Шумилов К.В. и др., 1996), а впоследствии это заболевание наблюдали и в других регионах (Алиев А.А. и др., 1999; Дегтяренко Л.В. и др., 1999; Малышева Л.А., 2000).

Окончательный диагноз этого заболевания устанавливают по результатам лабораторных исследований и, в первую очередь - бактериологического тестирования. Диагностическая ценность метода существенно снижена из-за ограниченного перечня тестируемых образцов, так как прижизненное бактериологическое исследование сводится преимущественно к исследованию проб крови. Гораздо более широкими представляются возможности серологического исследования, однако до выполнения настоящей работы средств диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*, в РФ зарегистрировано не

было. Попытки разработать такие средства, одними из первых в стране, предприняли Калмыков В.В., Михайлова Ю.П., Климанов А.И., Шумилов К.В., Желудков М.М., Толмачева Т.А. в 1999-2001гг. В ходе выполненных серологических (РА и РСК), с использованием собственных разработок, и бактериологического исследования ими были выявлены больные животные. Причем, было установлено, что пробы сыворотки крови примерно от 25 % исследованных собак проявляли антикомплементарные свойства, что ограничивает применение этой реакции (Михайлова Ю.П., 2000). Между тем известно, что в реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) с О-ПС-антигеном, также как и в РСК, выявляются иммуноглобулины класса G, но она позволяет исследовать сыворотки, несмотря на их антикомплементарность.

За рубежом для диагностики заболевания применяют ряд серологических тестов: пластинчатую реакцию агглютинации (RSAT), пробирочную реакцию агглютинации (TAT) и реакцию иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) с использованием антигенов, изготовленных разными способами, и полученные при этом результаты часто варьируют (Carmichael L.E. et al., 2006; Hollet R.B., 2006).

С учетом вышеизложенного, разработку чувствительных и специфичных средств диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*, следует считать актуальной.

Цель и задачи исследований. Целью исследований являлась разработка тест-системы на основе реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*.

Для достижения этой цели на разрешение были поставлены следующие задачи:

- разработать технологию получения активных и специфичных бруцеллезных R-антигена и R-сыворотки для диагностики бруцеллеза собак в РИД;
- изготовить экспериментальные серии бруцеллезных R-антигенов для диагностики бруцеллеза собак в РИД и РА;

- изготовить экспериментальные серии бруцеллезной кроличьей R-сыворотки;

- изучить специфичность и чувствительность РИД с использованием разработанных диагностикумов в сравнении с РА, РСК и бактериологическими методами исследований при диагностике бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*;

- разработать тест-систему для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*, основанную на использовании РИД, с полученными бруцеллезными R-антигенами и гомологичной им сывороткой. Изучить активность и специфичность тест-системы в ветеринарных лабораториях РФ.

Научная новизна. Впервые в стране разработана технология изготовления активного и специфичного бруцеллезного R-антигена и оптимальная схема получения бруцеллезной R-сыворотки для диагностики в РИД бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*.

Установлена возможность получения эффективных бруцеллезных R-антигенов и R-сыворотки с использованием живой культуры штамма *B. abortus* КВ 17/100.

В процессе исследований с использованием набора компонентов для диагностики в РИД и РА бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*, и репрезентативной выборки проб сыворотки крови от собак получены эпизоотологические данные по этому заболеванию в Москве, Санкт-Петербурге, Московской и Ленинградской областях.

Практическая и теоретическая значимость работы. Выявление больных бруцеллезом собак с помощью разработанной тест-системы имеет важное эпизоотическое и эпидемическое значение. Обоснованные теоретически на основании анализа данных литературы и подтвержденные результатами диагностических исследований технологические подходы к разработке активных и специфичных средств для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*, могут быть учтены или использованы в дальнейшем при совершенствовании диагностики данного заболевания.

Апробация полученных результатов. Основные положения диссертаци-

ции доложены на конференции молодых ученых ФГУ «ВГНКИ» «Лекарственные средства для животных и корма. Современное состояние и перспективы» (Москва, 2007г.) и заседаниях ученого совета ФГУ «ВГНКИ» (Москва, 2006, 2007, 2008гг.).

Положения, выносимые на защиту:

- результаты разработки средств диагностики в РИД и РА бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*;
- результаты определения оптимальных параметров изготовления R-антигена и R-сыворотки для диагностики бруцеллеза собак в реакции иммунодиффузии;
- результаты сравнительного серологического тестирования собак на бруцеллез;
- результаты лабораторных и производственных испытаний разработанных средств диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*;
- результаты идентификации и дифференциации культур бруцелл, выделенных от собак.

Публикация результатов исследований. По теме диссертационной работы опубликовано 3 научные статьи, в том числе 2 – в изданиях, рецензируемых ВАК РФ.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы, приложение. Работа иллюстрирована 17 таблицами, 2 схемами. Список литературы содержит 185 источника, в том числе 152 иностранных.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. 1. Материалы и методы

В работе были использованы: 1) культуры и штаммы бруцелл: референтные штаммы - *B. canis* RM 6/66, *B. melitensis* 16М, *B. suis* 1330 (из коллекции НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалея), производственные штаммы *B. ovis* 424/2,

B. abortus KB 17/100 (из Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве, при ФГУ «ВГНКИ»), а также полевые культуры бруцелл; 2) **сыворотки**: национальная стандартная сыворотка Anti-brucella abortus (ФГУ «ВГНКИ»), негативная сыворотка крупного рогатого скота (ФГУП «Курская биофабрика»), А- и М-монорецепторные сыворотки (ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), гипериммунные сыворотки крови кроликов, полученные на штаммы *B. canis* RM 6/66 и *B. abortus* KB 17/100; 3) **животные**: кролики массой 2,5-3,0 кг – 68 голов; 4) **питательные среды**: агар Альбими, мясопептонный печеночный глюкозоглицериновый агар (МППГГА) и мясопептонный печеночный глюкозоглицериновый бульон (МППГГБ), мясопептонный агар (МПА), мясопеченочный бульон (МПБ), среда Сабуро – агар, среда Китт -Тароцци под вазелиновым маслом, основной агар для бруцелл (M169 Hi-media), основной агар для кампилобактеров (M994 Hi-media), поддерживающая среда для кампилобактеров (M917 Hi-media); 5) **буферные растворы**: фосфатный буферный раствор - ФБР (рН = 6,0; 7,0; 8,2), 0,5% фенолизированный фосфатный буферный раствор (ФБР + 0,5% фенола), карбонатно-бикарбонатный буфер (рН=9,8), М-буфер (рН = 9,1).

Постановку РИД осуществляли в агаровом геле в чашках Петри. Компоненты диагностического набора вносили в лунки, пробитые с помощью штампа. В одну центральную лунку геля агара вносили 20 мм³ антигена, а в шесть периферических – 40 мм³ исследуемых сывороток крови. В каждой чашке ставили контроль антигена с негативной и R-бруцеллезной сывороткой.

Внутрь крышки каждой чашки вкладывали фильтровальную бумагу, вырезанную по размеру ее диаметра, которую увлажняли 0,5%-ным фенолизированным физиологическим раствором. Чашку плотно прикрывали крышкой и оставляли при 18-24 °С.

Учет результатов реакции проводили визуально в косом проходящем свете с помощью осветителя ОИ-19 или аналогичного через 24 и 48 ч после постановки реакции.

При формировании линии преципитации между лунками с антигеном и исследуемой сывороткой через 24 или 48 ч реакцию оценивали, как положительную.

Сыворотки крови в РА с S- и R- антигенами исследовали в соответствии с Наставлением по диагностике бруцеллеза животных, утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 29 сентября 2003 года. Бруцеллезный R-антиген для РА готовили по технологии, предложенной Калмыковым В.В. и Михайловой Ю.П., в нашей модификации. В частности, вместо *V. canis* при изготовлении предлагаемого ими антигена, нами была использована культура *V. abortus*, а также внесены другие изменения, позволившие повысить его специфичность и в четыре раза увеличить срок годности.

Бактериологическое исследование крови от собак с идентификацией и типированием выделенных культур проводили на базе лаборатории бруцеллеза ГУ "НИИЭМ" им. Н.Ф. Гамалеи. Для идентификации использовали двухсуточные агаровые культуры бруцелл, выращенные на МППГТА, МППГТБ, триптозном агаре и среде Альбими. Тинкториальные, морфологические, культуральные и ферментативные свойства штаммов *V. canis*, выделенных от больных собак, изучали в сравнении с культурами референтных штаммов бруцелл *V. canis* RM 6/66, *V. suis* 1330 и культурой полевого штамма *V. canis* K-01.

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Подбор оптимальной схемы получения диагностической бруцеллезной R-сыворотки для РА и РИД

Согласно результатам предварительного опыта по получению диагностической бруцеллезной R-сыворотки, четырехкратное внутривенное с интервалом 7 дней введение кроликам живой культуры штамма *V. canis* RM 6/66 в дозах 1×10^9 , $2,5 \times 10^9$, 5×10^9 и 1×10^{10} м.к./мл не обеспечивало выраженного синтеза агглютининов в организме животных. Максимальный титр сыворотки в РА с бруцеллезным R-антигеном составлял 1:200.

Это послужило основанием для выполнения исследований с использованием разных схем и способов получения требуемой сыворотки с последующим

сравнительным изучением ее активности и специфичности (табл. 1).

Изготовленные сыворотки взаимодействовали с экспериментальным бруцеллезным R-антигеном в РИД по-разному. В частности, сыворотка, полученная по первой схеме иммунизации, формировала с антигеном тройные диффузные линии преципитации; по второй – двойные диффузные линии преципитации. Кроме того, при такой схеме гипериммунизации в группе из 5 кроликов погибли два; по третьей схеме, заключающейся в четырехкратном внутривенном введении кроликам живой культуры *B. abortus* KB 17/100 в дозах 5×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} и 4×10^{10} м.к./мл, что обеспечивало синтез агглютининов со средним титром 1:400, при максимальном его показателе у отдельных животных 1:800 - четкую одинарную линию преципитата; по четвертой - хорошо выраженные двойные линии преципитата.

С целью определения влияния дозы и кратности введения культуры на активность бруцеллезной R-сыворотки было выполнено следующее исследование. Кроликов гипериммунизировали живой культурой *B. abortus* KB 17/100 в дозах $2,5 \times 10^9$, 5×10^9 , 1×10^{10} и 2×10^{10} четырехкратно (табл. 2). Согласно табличным данным, пик активности бруцеллезной R-сыворотки в РА был зарегистрирован на 21-ый день с начала иммунизации. В РИД с гомологичным антигеном сыворотка формировала четкую одинарную линию преципитации. По истечении следующей недели титр агглютининов у части животных снизился.

2.2.2. Разработка способа получения бруцеллезного R-антигена для диагностики в РИД бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*

R-антиген для диагностики в РИД бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*, получали двумя способами: экстракцией антигена «солевым методом» и путем разрушения бактериальных клеток ультразвуковыми волнами. Для получения антигена были использованы производственные, аттенуированные с известными дифференциально-диагностическими свойствами штаммы *B. ovis* 424/2 и *B. abortus* KB 17/100. При тестировании антигенов, полученных «солевым методом», была исключена возможность их практического применения по причине низкой активности. В частности, гипериммунные R-сыворотки крови

Динамика накопления агглютининов и преципитинов

№ кролика	День с начала иммунизации							
	7-й		14-й		21-й		28-й	
	РА	РИД	РА	РИД (характеристика линии преципитации)	РА	РИД (характеристика линии преципитации)	РА	РИД (характеристика линии преципитации)
1	1/50	следы	1/200	Выраженная	1/400	Выраженная	1/400	Выраженная
2	1/50	-	1/100	Выраженная	1/200	Выраженная	1/200	Выраженная
3	-	-	1/100	Выраженная	1/400	Выраженная	1/400	Выраженная
4	-	-	1/50	Умеренно выраженная, диффузная	1/200	Выраженная	1/200	Выраженная
5	1/50	-	1/100	Выраженная	1/400	Выраженная	1/200	Выраженная, двойная
6	1/50	-	1/100	Выраженная	1/100	Выраженная	1/200	Выраженная
7	-	-	1/50	Умеренно выраженная, диффузная	1/200	Выраженная	1/200	Выраженная, диффузная
8	-	-	1/50	Умеренно выраженная, диффузная	1/200	Выраженная	1/200	Выраженная
9	-	-	1/50	Умеренно выраженная, диффузная	1/400	Выраженная, диффузная	1/400	Выраженная, диффузная
10	-	-	1/50	Умеренно выраженная, диффузная	1/200	Выраженная, диффузная	1/100	Выраженная, диффузная

собак и кроликов, полученные к культурам штаммов *B. canis* RM 6/66 и *B. abortus* KB 17/100, а также сыворотки крови от собак с диагнозом, подтвержденным выделением гемокультуры *B. canis*, в РИД с этими антигенами реагировали отрицательно.

В связи с этим следующий этап работы был посвящен получению антигена путем ультразвуковой обработки живой и убитой культуры бруцелл вида *B. abortus* KB 17/100 с подбором оптимального разбавителя для суспендирования культуры и определением зависимости активности антигенов от показателя концентрации микробных клеток, водородных ионов в суспензии и режима дезинтеграции.

Согласно результатам исследования, наиболее активный и специфичный антиген был получен путем обработки ультразвуком живой культуры *B. abortus* KB 17/100, суспендированной в ФБР (рН = 7,0).

При сравнительном изучении активности антигенов было установлено, что оптимальной для их разведения в сравнении с другими растворами и в том числе ФБР с (рН = 6,1; 7,1 и 8,3) является 0,3 %-ая формалинизированная дистиллированная вода. При этом было также установлено, что активность антигенов, полученных путем ультразвуковой дезинтеграции бруцелл, уменьшается прямо пропорционально снижению концентрации озвучиваемых суспензий. Таким образом, использовать для получения антигенов суспензии бруцелл с концентрацией менее 100 млрд микробных клеток/мл нецелесообразно.

Выбранный в качестве основного для дальнейших исследований антиген, полученный из живой культуры штамма *B. abortus* KB 17/100, суспендированной в фосфатном буфере с рН=7,0 путем ультразвукового дезинтегрирования в течение 60 минут, тестировали в РИД с использованием агаровых гелей с содержанием 0,85 %, 5,0 % и 10,0 % NaCl. Наибольшую активность антиген проявлял в случае использования агара, содержащего 0,85 % NaCl. Увеличение концентрации соли приводило к снижению активности антигена.

Стандартизацию активности антигена в РИД проводили с бруцеллезной R- антисывороткой крови кроликов к культуре штамма *B. abortus* KB 17/100 с

титром агглютининов 1:400, которую приняли в качестве стандартной. Согласно полученным результатам, рабочее разведение антигена составило 1:5. Именно в таком разведении бруцеллезный R-антиген при взаимодействии со стандартной сывороткой в РИД формировал четкую одинарную линию преципитата.

2.2.3. Специфичность антигена для РИД

Проверка специфичности антигена в РИД с использованием набора гипериммунных и полевых сывороток к бактериям разных родов показала, что полученный препарат специфичен (табл. 3).

Таблица 3

Изучение специфичности бруцеллезного R-антигена в РИД

№ п/п	Гипериммунная специфическая сыворотка	РИД
1	Кампилобактериозные моноспецифические агглютинирующие сыворотки подвидов венериалис и бубулюс	Отр.
2	Сыворотка «О» - коли агглютинирующая (серотип О 147)	Отр.
3	Сыворотка «О» - коли агглютинирующая (серотип О 149)	Отр.
4	Сыворотка «О» - коли агглютинирующая (серотипы О 157)	Отр.
5	Сыворотка «О» - коли агглютинирующая поливалентная (группа 1)	Отр.
6	Сыворотка «О» - коли агглютинирующая поливалентная (группа 2)	Отр.
7	Сыворотка «О» - коли агглютинирующая поливалентная (группа 3)	Отр.
8	Сыворотка «О» - коли агглютинирующая поливалентная (группа 4)	Отр.
9	Сыворотка О - агглютинирующая монорецепторная сальмонеллезная (рецептор 8)	Отр.
10	Сыворотка О - агглютинирующая монорецепторная сальмонеллезная (рецептор 7)	Отр.
11	Сыворотка против рожи свиней	Отр.
12	Сыворотка гипериммунная против лептоспироза собак	Отр.
13	Сыворотка гипериммунная к <i>Yersinia enterocolitica</i> серовар 0:9 (S)	Отр.
14	Сыворотка гипериммунная к <i>Yersinia enterocolitica</i> серовар 0:9 (R)	Отр.
15	Сыворотка гипериммунная к <i>Yersinia enterocolitica</i> серовар 0:3	Отр.
16	Бруцеллезная S –сыворотка из «Набора для серологической дифференциации бруцелл» (НИФ «Биоцентр»)	Отр.
17	Национальная стандартная сыворотка Anti-brucella abortus с.5	Отр.
18	Негативная сыворотка крови кролика	Отр.
19	Негативная сыворотка крови крупного рогатого скота	Отр.
20	Негативная сыворотка крови собак	Отр.
21	Сыворотка крови собаки, больной лептоспирозом	Отр.
22	Сыворотка крови собаки, больной вирусным гепатитом	Отр.
23	Сыворотка крови собаки, больной болезнью Лайма	Отр.
24	Бруцеллезная R-сыворотка №1 (<i>B. canis</i> RM 6/66)	Пол.
25	Бруцеллезная R-сыворотка №2 (<i>B. canis</i> RM 6/66)	Пол.
26	Бруцеллезная R- сыворотка (<i>B. abortus</i> KB 17/100)	Пол.

Отрицательные результаты были получены с сыворотками крови собак, больных лептоспирозом, вирусным гепатитом, болезнью Лайма, а также с негативными сыворотками крови собак и крупного рогатого скота.

В контроле наблюдали положительную реакцию антигена с бруцеллезными R-сыворотками крови кроликов и собак, иммунизированных культурой *V. canis* RM 6/66.

2.2.4. Результаты лабораторных испытаний антигена для диагностики в РИД бруцеллеза собак, вызываемого *V. canis*

Часть клинических испытаний разработанных бруцеллезных R-антигенов была выполнена с участием сотрудников «Центра биотехнологии» ФГУ «ВГНКИ», которые проводили молекулярно-генетические исследования проб крови и сыворотки крови собак.

Всего при исследовании 120 собак было выявлено 19 животных, сыворотки крови которых положительно реагировали в РА и РИД с бруцеллезными R-антигенами (табл. 4).

Таблица 4

Результаты лабораторного испытания бруцеллезного R-антигена в РИД

№ п/п	№№ сыворотки	R-антиген		Бакисследование	S - антиген	
		РА	РИД		РА	РСК
1	Трезн	1/100 ++	пол.	+	отр	отр
2	Тайшера	1/100 ++	пол.	+	отр	отр
3	Дезира	1/100 ++	пол.	+	отр	отр
4	Макс	1/50 ++	отр	отр	отр	отр
5	Зюдей	1/200 ++	пол	+	отр	отр
6	Саура	1/100+++	пол	+	отр	отр
7	№ 10	1/200 ++	пол	отр	отр	отр
8	№ 11	1/400++	пол	-	отр	отр
9	№ 12	1/100 +++	отр	отр	отр	отр
10	№ 13	1/100+++	пол	-	отр	отр
11	№ 14	1/50 ++	отр	-	отр	отр
12	№ 15	1/400 ++	пол.	-	отр	отр
13	№ 16	1/400++	пол	-	отр	отр
14	№ 17	1/50 +++	отр	-	отр	отр
15	№ 18	1/800 ++	пол.	-	отр	отр
16	№ 19	1/50 ++	отр.	-	отр	отр
17	№ 20	1/200 ++	пол	-	отр	отр
18	№ 21	1/200 ++++	пол	-	отр	отр
19	№ 22	1/100 ++	отр	отр	отр	отр

Как видно из материалов таблицы, из 19 проб сыворотки крови, реагирующих в РА, 4 пробы реагировали в титре 1:50, 7 проб – 1:100, 4 пробы - 1:200, 3 пробы - 1:400 и 1 проба - 1:800.

Всего в РИД с положительным результатом были исследованы пробы сыворотки крови от 12 собак. При бактериологическом исследовании 9 проб крови от этих животных было выделено 5 культур бруцелл, идентифицированных как *B. canis*, что совпадало с результатами исследования этих проб в ПЦР.

2.2.5. Производственные испытания антигенов для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*

На основании результатов клинического испытания бруцеллезных R-антигенов для диагностики бруцеллеза собак в РИД были изготовлены экспериментальные серии «Тест-системы для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *Brucella canis*, в реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД)».

Производственные испытания тест-системы были выполнены с нашим участием в городских ветеринарных лабораториях Москвы и Санкт-Петербурга и ветеринарных лабораториях Ленинградской и Волгоградской областей в период с октября 2006 г. по декабрь 2008 г.

Всего в РА и РИД с разработанными диагностикумами были исследованы 1370 проб сыворотки крови собак, из них в Москве 162 пробы, в Санкт-Петербурге - 892 пробы, в Ленинградской области - 120 проб, в Волгоградской области – 196 проб (табл. 5).

В городской ветеринарной лаборатории Санкт-Петербурга и Ленинградской областной ветеринарной лаборатории при исследовании сыворотки крови с бруцеллезными R-антигенами было выявлено 87 собак, признанных больными. При этом в РА с бруцеллезным R-антигеном 24 пробы сыворотки крови собак реагировали в титре 1:100, 30 проб - 1:200, 32 пробы - 1:400 и 1 проба – 1:800.

В РИД с положительным результатом были исследованы 23 пробы сыворотки крови собак. При бактериологическом исследовании проб крови от 11 животных с положительными результатами исследования в РИД от 9 была выделена культура, идентифицированная как *B. canis*. Результаты бактериологического и молекулярно-генетического исследований совпали.

Таблица 5

Результаты производственных испытаний Тест-системы для диагностики в РИД бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*

Регионы РФ	Кол-во исслед. проб	Положительно реагировали с R-бруцеллезными антигенами		Положительно реагировали с S-руцеллезным антигеном		Выявлено больных (гол.)	Бакисследование (кол-во исслед./выделено куль-)
		РА	РИД	РА	РСК		
Москва	162	0	0	0	0	0	0
Санкт-Петербург	892	1-1:800 29-1:400 28-1:200 22-1:100 2-1:50	23	0	0	80	11/9
Ленинградская область	120	3-1:400 2-1:200 2-1:100 11-1:50	0	0	0	7	0
Волгоград и Волгоградская область	196	0	0	4-1:25	1-1:20	0	0
Всего	1370	100	23	4-1:25	1-1:20	87	11/9

Всего в ходе диагностических исследований по теме диссертационной работы было выявлено 106 собак больных бруцеллезом, вызванным *B. canis*. Специфичность R-антигена для РИД подтверждена отрицательными результатами исследования 358 проб сывороток крови собак в городской ветеринарной лаборатории Москвы и Волгоградской областной ветеринарной лаборатории. Отрицательные результаты были получены при исследовании сывороток крови собак, больных лептоспирозом, вирусным гепатитом, боррелиозом, стафилококкозом, микоплазмозом и «классическим» бруцеллезом.

Следует отметить установленный факт снижения титра R-агглютининов при повторном исследовании через 15 и 30 дней проб сыворот-

ки крови собак, которые при первичном тестировании с этим же антигеном реагировали в титре 1:25 - 1:50, при отрицательных результатах исследования в РИД. Это явилось основанием для исключения инфицирования данных животных бруцеллами (табл. 6).

Таблица 6

Данные тестирования в РИД проб сыворотки крови собак, исследованных в РА с сомнительным и положительным результатами

№ пп	Сыворотки	Результаты серологического исследования с R-антигенами					
		РА			РИД		
		1-е исслед.	Через 15 дн.	Через 30 дн.	1-е исслед.	Через 15 дн.	Через 30 дн.
1	№ 40845	1/50 +++	1/50 ++	-	-	-	-
2	№ 42504	1/50 ++	1/50 ++	-	-	-	-
3	№ 41513	1/50 ++	-	-	-	-	-
4	№ 41518	1/50 ++	1/25 ++	-	-	-	-
5	№ 47608	1/50 ++	1/50 ++	-	-	-	-
6	№ 572	1/50 ++	-	-	-	-	-
7	№ 813	1/50 +++	-				
8	№ 41085	1/50 ++	1/50 ++	1/25 ++	-	-	-
9	№ 10880	1/50 ++	1/100 ++	1/200 ++++	+	+	+
10	№ 42539	1/50 ++++	1/100 ++	1/100 +++	+	+	+
11	№ 6281	1/50 ++	1/50 ++	1/100 +++	+	+	+
12	№ 101	1/50 +++	1/100 ++	1/200 +++	+	+	+

Кроме того, нами были также зарегистрированы результаты исследования проб сыворотки крови от собак, титр R-агглютининов в которых не превышал 1/50, но они были исследованы с положительным результатом в РИД с R-антигеном. При повторном исследовании этих животных через 15 и 30 дней наблюдали увеличение титра агглютининов при положительных результатах в РИД и выделении культуры *B.canis*.

С учетом этих данных мы считаем целесообразным проведение комплексной серологической диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*, предусматривающей одновременное тестирование в РА и РИД с R-антигенами и предлагаем для практического применения «Набор компонентов для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis* в РА и РИД».

При бактериологическом исследовании крови собак, положительно реагирующих при серологическом исследовании с R-бруцеллезными антигенами, было выделено четырнадцать культур бруцелл, которые идентифицировали на базе лаборатории бруцеллеза НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Типирование выделенных культур проводили в сравнении с культурами референтных штаммов *B. canis* RM 6/66, *B. suis* 1330 и *B. canis* К-01, выделенной из абортрованного плода стаффордширского терьера в 1994 году в г. Волгограде (табл.7).

Согласно полученным результатам, типлируемые культуры были представлены грамтрицательными овоидной или в виде коротких палочек бактериями, расположенными одиночно, парно и в виде скоплений и не требующих для роста повышенного содержания CO_2 при инкубировании.

По Уайту-Вилсону колонии бруцелл, выросшие на плотной питательной среде в чашках Петри после посева суспензий выделенных культур и последующего инкубирования при 37 °С в течение 4 суток, окрашивались в синий цвет с тонкими радиальными искривленными трещинами желтого цвета у части из них.

В пластинчатой РА двухсуточные агаровые культуры агглютинировались кроличьей R-сывороткой к *B. canis* с оценкой на 4 креста и не взаимодействовали с бруцеллезной S-сывороткой.

В пробирочной РА живые культуры в виде 2-х миллиардной взвеси в физиологическом растворе агглютинировались бруцеллезной R-сывороткой в титре 1:800 и не агглютинировались бруцеллезной S-сывороткой.

Все выделенные культуры давали положительный результат с оценкой на 4 креста в пробе с акрифлавином и отрицательный - в пробирочной РА с А-

Результаты изучения и идентификации культур бруцелл, выделенных от собак

№№ п/п	Наименование штамма	Форма колоний	Рост на срезах с добавлением					Продукция H ₂ S	Фаг «Гв»	Агглютинация сыворотками			
			Фуксин 1:50000	Трионин 1:100000	Пенициллин					S	R*	A	M
					5 ЕД/мл	2,5 ЕД/мл	0,5 ЕД/мл						
1	№ 77	R	3+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	+	4+	+ (пити)	-
2	№ 839	R	3+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	+/-	4+	- (пити)	-
3	№ 837	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	+/-	4+	-	-
4	№ 838	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	+/-	4+	-	-
5	№ 881	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
6	№ 885	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
7	№ 886	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
8	№ 1- ПЛ	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
9	№ 2- ПЛ	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
10	№ 3-ПЛ	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
11	№ 4-ПЛ	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
12	№ 5-ПЛ	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
13	№ 6-ПЛ	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	-	-	4+	-	-
14	№ 7-ПЛ	R	4+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	-	+	-	4+	-	-
15	<i>B. canis</i> K-01	R	3+	4+	4+/4+	4+/4+	4+/4+	- (следы)	-	-	4+	-	-
16	<i>B. canis</i> 6/66	R	-	4+	-/-	+/+	4+/4+	- (следы)	-	+/-	4+	-	-
17	<i>B. suis</i> 1330	S	-	4+	-/-	-/-	4+/4+	6 мм	-	4+	-	3+	-

Примечание: (-) – отрицательный результат, (+, 3+, 4+) – положительный результат (оценка интенсивности реакции в крестах); * кроличья сыворотка *B. canis* (R-форма) с титром 1:800

и М-монорецепторными сыворотками

Все культуры не продуцировали H_2S и, в отличие от культур референтных штаммов *B. canis* 6/66 и *B. suis* 1330, оказались нечувствительными к фуксину в концентрации 1:50000. Однако все они, в том числе и референтные штаммы *B. canis* 6/66 и *B. suis* 1330 и штамм *B. canis* К-01, были чувствительны к тионину в разведении 1:50000 и росли на питательной среде, содержащей краситель в концентрации 1:100000.

Все выделенные культуры бруцелл росли на питательной среде с содержанием натриевой соли бензилпенициллина в концентрации 0,5, 2,5 и 5 ЕД/мл и не отличались по этому свойству от штамма *B. canis* К-01, тогда как культуры референтных штаммов *B. canis* RM 6/66 и *B. suis* 1330 росли только на среде, содержащей антибиотик в количестве, не превышающем 0,5 ЕД/мл.

Таким образом, согласно результатам дифференциации, все культуры бруцелл, выделенные от собак в ходе выполнения настоящей работы, были идентифицированы, как *B. canis* и отнесены ко «второму биовару» данного вида, как и штамм *B. canis* К-01.

3. Выводы

1. Культура штамма *B. abortus* КВ 17/100 может быть использована для получения высокоактивных и специфичных R-антигенов для диагностики в РА и РИД бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*.

2. Продолжительность ультразвуковой дезинтеграции, концентрация бруцелл и водородных ионов в обрабатываемой взвеси являются факторами, определяющими активность и специфичность бруцеллезного R-антигена для диагностики в РИД бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*.

3. Супернатант, полученный в результате ультразвуковой в течение 60 мин дезинтеграции живой культуры штамма *B. abortus* КВ 17/100, суспендированной в фосфатном буфере с $pH=7,0$ с последующим центрифугированием при 15000 об/мин в течение 60 мин, является активным и специфичным антигеном, для диагностики в РИД бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*, с содержанием в агаровом геле 0,85 % NaCl.

4. Критерием оценки бруцеллезной R-сыворотки для РИД, применяемой в качестве положительного контроля антигена, служит положительный результат, проявляющийся формированием четкой одинарной линии преципитации, а не высокий уровень титра гомологичных агглютининов.

5. Собак считают больными бруцеллезом, вызываемым *B. canis*, при титре R-антител в РА не ниже 1:100 с оценкой 2 креста и выше и (или) при положительной реакции иммунодиффузии в агаровом геле с R-антигеном и (или) при положительном результате бактериологического исследования.

При положительной РА в титре 1:50 собак считают сомнительно реагирующими на бруцеллез и исследуют повторно через 2-4 недели в РА и РИД с бруцеллезными R-антигенами и бактериологически.

В случае получения двух подряд сомнительных результатов при исследовании в РА с интервалом не менее 4 недель при отрицательных результатах тестирования в РИД и бактериологического исследования, заболевание животных исключают.

6. Положительный результат исследования сыворотки крови собак в РИД с R-антигеном свидетельствует о бактериемии у животных *B. canis*.

7. Выявление в Москве и Санкт-Петербурге собак, положительно реагирующих при серологическом исследовании с бруцеллезными R-антигенами и бактериологическом - с выделением культуры идентифицированной, как *B. canis*, с использованием репрезентативной выборки животных, свидетельствует о достаточно широком распространении данного заболевания в РФ и подтверждает актуальность внедрения в ветеринарную лабораторную практику средств его диагностики.

4. Практические предложения

Разработаны:

- технология изготовления активного и специфичного бруцеллезного R-антигена и оптимальная схема получения гомологичной ему сыворотки для диагностики в РИД бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*;
- «Набор компонентов для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого

B. canis, в реакции агглютинации и реакции иммунодиффузии в агаровом геле и нормативные документы на него. Регламент изготовления и контроля набора утвержден директором ФГУ «ВГНКИ», академиком РАСХН А.Н. Паниным 8 октября 2009г., Стандарт организации на набор (СТО 00494189-0039-2009) и инструкция по его применению (представлены для утверждения в соответствии с Правилами государственной регистрации лекарственных средств);

- «Методические рекомендации по диагностике бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*», утверждены директором ФГУ «ВГНКИ», академиком РАСХН А.Н. Паниным 8 октября 2009г.

5. Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Зинова А.А. Диагностика бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*. // Ветеринарная патология. - Москва, 2006, № 3 (18) – С. 11-14.

2. Скляров О.Д., Климанов А.И., Шумилов К.В., Желудков М.М, Толмачева Т.А., Зинова А.А., Ульянова М.В. Выделение и идентификация культур *B. canis*. // Сборник научных трудов ФГУ «ВГНКИ». – М., 2007. – Т.68. – С.125-126.

3. Яшин А.В., Кузина Т.Б., Климанов А.И., Шумилов К.В., Скляров О.Д., Зинова А.А. Бруцеллез собак, вызываемый *B. canis* – ретроспективный анализ встречаемости по С.-Петербургу за 2006-2007г. // Ветеринарная практика. - Санкт-Петербург, 2007, № 4 – С. 23-26

ГНУ ВНИИВСГЭ, 123022, Москва, Звенигородское ш., 5

Заказ 332/2

Тираж 100 экз.