

На правах рукописи



ДИМОВ Константин Сергеевич

**ПОСТВАКЦИНАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА
БРУЦЕЛЛЕЗА МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ**

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

30 ОКТ 2008



Новосибирск - 2008

Работа выполнена в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Аракелян Петрос Карапетович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Салмаков Константин Михайлович,

доктор ветеринарных наук, профессор
Храмцов Виктор Викторович

Ведущая организация: **ФГУ Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ВГНКИ)**

Защита состоится «20» ноября 2008 г. в «11» часов на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 при ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Краснообск, ГНУ ИЭВСидВ, а/я 8, тел/факс (383) 348-44-62.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО Россельхозакадемии.

Автореферат разослан «8» октября 2008 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Стеблева Г.М.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В системе противобруцеллезных мероприятий у мелкого рогатого скота в нашей стране специфическая профилактика всегда играла решающую роль (П.Ф. Здродовский, 1953; В.А. Николаев, 1954; М.К. Юсковец, 1960; Е.С. Орлов, 1967; П.С. Уласевич с соавт., 1975; О.Ю. Юсупов, 1983; И.А. Косилов с соавт., 2001). Эффективность вакцин обеспечивал создаваемый и поддерживаемый у животных перманентный иммунитет в сочетании с планомерной поотарной заменой неблагополучного маточного поголовья иммунизированными здоровыми ярками. О неблагополучии хозяйств судили по косвенным эпидемиологическим и эпизоотологическим показателям – случаи заболевания людей бруцеллезом в острой форме, заражение производителей и аборты бруцеллезной этиологии (И.А. Косилов с соавт., 1999).

В девяностые годы массовый процесс распада крупных общественных и организация многочисленных территориально разобщенных мелких частных хозяйств (с совместным содержанием всех половозрастных групп животных) привел к экономическим и техническим сложностям эффективного осуществления официально регламентированных противобруцеллезных мероприятий, в частности, планомерной поотарной замены овец и коз. Ежегодные иммунизации животных против бруцеллеза живыми агглютиногенными вакцинами (в частности, вакциной из штамма 19) традиционным подкожным методом, обеспечивавшие противозооотический и противозидемический эффекты, из-за длительно сохраняющихся поствакцинальных реакций, неподдающихся дифференциации, стали практически невозможными (П.К. Аракелян, 1997). В результате, резко возросла заболеваемость людей бруцеллезом в острой форме, главным образом за счет непосредственных контактов с овцами и козами неблагополучных по бруцеллезу отар (В.М. Авилов с соавт., 1999).

Применительно к современным условиям был предложен конъюнктивный метод иммунизации мелкого рогатого скота живыми агглютиногенными вакцинами в уменьшенной дозе, обеспечивающий поствакцинальную диагностику бруцеллеза в более ранние сроки с помощью РА и РСК (П.К. Аракелян с соавт.; 2001; Л.В. Жарова, 2002; А.С. Димова, 2003). Но определение оптимальных сроков поствакцинальных исследований животных, привитых по новым схемам, осталось необходимым.

В последнее время возобновился интерес ученых и практиков к РНГА. Особого внимания заслуживает эритроцитарный диагностикум, разработанный в Прикаспийском НИВИ (С.Г. Хаиров, 2001). При бруцеллезе мелкого рогатого скота в связи с новыми схемами иммунизации его эффективность не изучали.

В дифференциально-диагностическом и противозооотическом отношении у крупного рогатого скота, привитого вакциной из штамма *V. abortus* 82, эффективной оказалась РИД с О-полисахаридным (О-ПС) бруцеллезным антигеном (В.М. Чекишев с соавт., 1993; С.К. Димов, 1993; Г.М. Стеблева, 1998).

Н.А. Морозова (2002) в экспериментальных условиях установила, что РИД с О-ПС антигеном не может быть использована для объективной дифференциальной диагностики бруцеллеза у многократно подкожно иммунизированных овец вакциной из штамма 19 в дозе 40 млрд. м.к. (реакция сохраняется в течение 12 месяцев у 2,0-5,9% здоровых привитых животных). Было выяснено, что изменение дозы вакцины и метода ее введения влияет на сроки сохранения у животных поствакцинальных РИД в плане их быстрейшего угасания. Однако, убедительных доказательств дифференциально-диагностического и противозпизоотического значения этого метода нет.

Известно, что официальный О-полисахаридный антиген для постановки РИД у животных разных видов готовят только из *B.abortus* (В.М. Чекишев с соавт., 1993). Поэтому сравнительное изучение диагностической ценности при бруцеллезе у мелкого рогатого скота РИД с О-ПС антигенами, изготовленными по аналогичной методике из *B.abortus* и *B.melitensis*, представляет научный и практический интерес с позиций возможной видоспецифичности.

Цель исследований – совершенствование поствакцинальной диагностики бруцеллеза мелкого рогатого скота при различных схемах специфической профилактики.

Задачи исследований:

- провести сравнительную оценку возможности использования РА, РСК, РНГА и РИД с официальным О-ПС антигеном в диагностике бруцеллеза у мелкого рогатого скота, иммунизированного вакциной из штамма *B.abortus* 19 по различным схемам;

- определить противозпизоотическое и противозпидемическое значение РИД с официальным О-ПС антигеном в поствакцинальной диагностике бруцеллеза у мелкого рогатого скота;

- изучить в экспериментальных и производственных условиях дифференциально-диагностическую эффективность РИД с О-ПС антигенами, изготовленными по аналогичной методике из штаммов *B.abortus* и *B.melitensis*, при бруцеллезе у мелкого рогатого скота, в том числе после иммунизации вакциной из штамма *B.abortus* 19 по различным схемам.

Научная новизна. Установлена возможность использования у мелкого рогатого скота при бруцеллезе диагностического комплекса (РА, РСК и РНГА с определенными титрами; РИД с официальным О-ПС антигеном) в ранние сроки (4 мес.) после подкожной и конъюнктивальной иммунизаций, а также проведенных на этом фоне неоднократных конъюнктивальных реиммунизаций вакциной из штамма 19.

В ранние сроки даже после однократной подкожной реиммунизации овец на фоне подкожной иммунизации оказалось возможным применение лишь РИД, и то с определенными издержками (выявление более 2% здоровых животных с реакциями вакцинного происхождения).

Подтверждена противозпизоотическая и противозпидемическая эффектив-

ность использования в поствакцинальной диагностике бруцеллеза у мелкого рогатого скота РИД с официальным О-ПС антигеном.

В экспериментальных и производственных условиях при бруцеллезе мелкого рогатого скота доказаны диагностические преимущества РИД с О-ПС антигеном, изготовленным из *B.melitensis* (М-антигеном), по сравнению с официально выпускаемым О-ПС антигеном, изготовленным из *B.abortus* (А-антигеном).

Получены результаты, свидетельствующие об определенной видоспецифичности О-ПС антигенов, изготовленных из *B.abortus* и *B.melitensis* (А- и М-антигенов), обеспечивающей возможность их использования при эпизоотической оценке по бруцеллезу отар овец и коз, иммунизированных вакциной из штамма *B.abortus* 19, в любые сроки после вакцинации.

Получен патент РФ на изобретение № 2303458 «Способ диагностики бруцеллеза мелкого рогатого скота» от 27 июля 2007 г.

Практическая и теоретическая значимость. Широкое внедрение результатов исследований позволит в значительной степени повысить эффективность контроля эпизоотического процесса бруцеллеза мелкого рогатого скота за счет новых схем иммунизации на основе конъюнктивного метода, а также ранней комплексной поствакцинальной диагностики (включая РИД, в том числе с О-ПС антигеном из *B.melitensis*) в целях выявления эпизоотически и эпидемически опасных животных.

Результаты сравнительного изучения О-ПС А- и М- антигенов являются основой для дальнейшего совершенствования схем дифференциальной поствакцинальной диагностики бруцеллеза животных.

Апробация полученных результатов. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 6-й международной научно-практической конференции «Аграрная наука Сибири, Монголии, Казахстана и Башкортостана сельскому хозяйству» (Новосибирск, 2003), международной научно-практической конференции «Современные проблемы эпизоотологии» (Новосибирск, 2004), Сибирском международном ветеринарном конгрессе «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2005), 9-й международной научно-практической конференции «Научное обеспечение агропромышленного комплекса азиатских территорий» (Алматы, 2006), 3-й международной конференции «Состояние и перспективы развития производства ветеринарных биопрепаратов (Алматы, 2006), 6-й межрегиональной научно-практической конференции «Проблемы патологии человека и животных в условиях Сибири» (Омск, 2007).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе две статьи - в журнале, рекомендованном ВАК Минобразования РФ («Ветеринария»).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 118 страницах и включает разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список

литературы, приложение. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 7 рисунками. Список литературы содержит 193 источника, в том числе 32 работы иностранных авторов.

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований использованы для разработки методических рекомендаций «Концепция оптимальной системы контроля эпизоотического процесса бруцеллеза мелкого рогатого скота в новых условиях овцеводства» (протокол № 3 от 14 сентября 2006 г.) и «Система противобруцеллезных мероприятий у мелкого рогатого скота в условиях Республики Тыва» (протокол № 2 от 30 июня 2008 г.), утвержденных подсекцией «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» секции инфекционной патологии отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии.

Основные положения, выносимые на защиту:

- сравнительная оценка возможности использования РА, РСК, РНГА и РИД с официальным О-ПС антигеном в диагностике бруцеллеза у мелкого рогатого скота после иммунизации вакциной из штамма 19 по различным схемам;

- противозпизоотическое и противозпидемическое значение РИД с официальным О-ПС антигеном в поствакцинальной диагностике бруцеллеза мелкого рогатого скота;

- экспериментальные и производственные данные о дифференциально-диагностической эффективности РИД с О-ПС антигенами, изготовленными по аналогичной методике из штаммов *B.abortus* и *B.melitensis*, при бруцеллезе у мелкого рогатого скота, в том числе иммунизированного вакциной из штамма *B.abortus* 19 по различным схемам.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в 2002-2008 годах в ГНУ ИЭВСидВ и ГНУ ВНИИБТЖ СО Россельхозакадемии, в хозяйствах и госветучреждениях Республики Тыва и других регионов Сибири.

Часть исследований проведена совместно с сотрудниками ИЭВСидВ и ВНИИБТЖ при практическом содействии ветспециалистов регионов.

Возможность использования в диагностике бруцеллеза мелкого рогатого скота, иммунизированного живой вакциной из агглютиногенного штамма *B.abortus* 19 по различным схемам, РА, РСК, РНГА, РИД с О-ПС антигеном (изготовленным из *B.abortus*) изучали как на здоровом, так и на естественно инфицированном поголовье (1008 гол.), подвергавшемся иммунизации (подкожно - доза 40 млрд. м.к., конъюнктивально - доза 4 млрд. м.к.).

От животных брали кровь до вакцинации и в различные сроки после нее. Серологические исследования сывороток крови в выше указанных реакциях

проводили согласно официально утвержденным наставлениям.

Противозпизоотическое и противоэпидемическое значение РИД с официальным О-ПС антигеном в поствакцинальной диагностике бруцеллеза у мелкого рогатого скота определяли по результатам анализа эпизоотической и эпидемической ситуации бруцеллеза в Республике Тыва во взаимосвязи с проводимыми противобруцеллезными мероприятиями, регламентированными соответствующими нормативными и директивными документами (диагностические исследования, вакцинации и др.). Основой для таких исследований явились статистические, отчетные и аналитические данные Департамента ветеринарии, Министерств здравоохранения и сельского хозяйства Республики Тыва, других республиканских и кожуунных (районных) ветеринарных и медицинских учреждений, а также материалы комплексных эпизоотолого-эпидемиологических обследований отдельных кожуунов Республики Тыва с поголовьем более 100 тыс. гол. мелкого рогатого скота.

Диагностическую эффективность при бруцеллезе РИД с О-ПС антигенами, изготовленными по аналогичной методике из штаммов *B.abortus* и *B.melitensis*, на первом этапе изучали при комплексном исследовании сывороток крови 49 гол. искусственно инфицированного вирулентными бруцеллами вида *melitensis* мелкого рогатого скота, иммунизированного вакциной из штамма *B.abortus* 19 по различным схемам.

Сравнительную диагностическую эффективность указанных двух О-ПС антигенов в дальнейшем изучали по результатам комплексных серологических исследований сывороток крови овец (4170 проб), а также крупного рогатого скота (368 проб), в том числе иммунизированных против бруцеллеза по различным схемам, из неблагополучных и благополучных по бруцеллезу хозяйств.

Подробнее методы и методики решения отдельных конкретных задач изложены в соответствующих разделах диссертации.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Сравнительная оценка возможности использования РА, РСК, РНГА и РИД с официальным О-ПС антигеном в диагностике бруцеллеза у мелкого рогатого скота после иммунизации вакциной из штамма 19 по различным схемам

Анализ результатов исследований на бруцеллез 100 гол. мелкого рогатого скота, привитого подкожно (40 млрд. м.к.) и 203 гол. - конъюнктивально (4 млрд. м.к.), показал, что через 4 месяца после прививки среди животных, привитых подкожно, всего реагировало в различных серологических реакциях 74%, в том числе в РА 100 МЕ и выше 3%, РСК 1:10 и выше – 23%, РНГА 1:100 и выше – 16%, РИД – 4%; среди животных, привитых конъюнктивально - соответственно 30,4%, 0,0% , 0,0% , 1,9% и 0,0%. Таким образом, в этот срок после

иммунизации можно исследовать комплексом методов (РА, РСК, РНГА и РИД) только сыворотки крови животных, привитых конъюнктивально.

Из 278 исследованных проб сывороток крови овец через один год после первичной подкожной иммунизации вакциной из штамма 19 РИД с официальным О-ПС антигеном (изготовленным из *B.abortus*) была отрицательной во всех пробах. Выявлено 106 проб (38,1%), реагирующих с различной степенью интенсивности в РА, РСК и РНГА. Из общего числа исследованных в РА выявлено всего 69 проб (24,8%) в титре не выше 50 МЕ; в РСК-S -22 (7,9%), в том числе в титре 1:10 и выше – 7 (2,5%); в РСК-R -5 (1,8%), в т.ч. в титре 1:10 и выше 1 (0,36%); в РНГА – 73 (26,3%), в том числе в титре 1:100 и выше – 6 (2,2%). Следует отметить, что из шести проб, реагировавших в РНГА в титре 1:100, РА не выше титра 50 МЕ отмечали в двух, РСК- S в титре 1:5 – в одной, в титре 1:10 и выше – трех. Таким образом, очевидна возможность проведения исследований овец на бруцеллез с использованием всего комплекса реакций через 1 год после первичной подкожной иммунизации.

Далее изучили характер реакций у мелкого рогатого скота через 4 месяца после подкожной и конъюнктивальной реиммунизации на фоне первичной подкожной иммунизации.

Из 81 исследованной пробы сывороток крови животных через 4 месяца после подкожной реиммунизации РИД с О-ПС антигеном (изготовленным из *B.abortus*) была положительной в двух пробах (2,5%). Выявлено 69 проб (85,2%), реагирующих с различной степенью интенсивности в РА, РСК и РНГА. В РА выявлена всего 61 проба (75,3%), в т.ч. в титре не выше 50 МЕ - 57, в титре 100 МЕ – 4 (4,9%); в РСК- S –55 (67,9%), в том числе в титре 1:10 и выше – 22 (27,2%); в РСК- R – 8 (9,8), в т.ч. в титре 1:10 и выше - 1 (1,2%); в РНГА – 53 (65,4%), в том числе в титре 1:100 и выше – 31 (38,3%). Следует отметить, что из 31 пробы, реагировавшей в РНГА в титре 1:100 и выше, РА в титре 100 МЕ и выше и/или РСК в титре 1:10 и выше отмечены в 19 (61,3%) пробах.

Из 125 исследованных проб сывороток крови животных через 4 месяца после конъюнктивальной реиммунизации РИД с О-ПС антигеном (изготовленным из *B.abortus*) была отрицательной во всех пробах. Выявлено 75 проб (60%), реагирующих с различной степенью интенсивности в РА, РСК и РНГА. В РА выявлено всего 25 проб (20%), в т.ч. все в титре не выше 50 МЕ; в РСК-S – 32 (25,6%), в том числе в титре 1:10 и выше – 1 (0,8%); в РСК-R – 8 (6,4%), в т.ч. в титре 1:10 и выше 1 (0,8%); в РНГА – 49 (39,2%), в том числе в титре 1:100 и выше – 3 (2,4%). Следует отметить, что из 3 проб, реагировавших в РНГА в титре 1:100 и выше, во всех отмечали РА и/или РСК в титрах не выше 50 МЕ и 1:5 соответственно.

Таким образом, очевидна возможность проведения с незначительными издержками поствакцинальных исследований с использованием комплекса реакций через 4 месяца после конъюнктивальной реиммунизации на фоне первичной подкожной иммунизации. Использовать указанный диагностический ком-

плекс у мелкого рогатого скота в этот же срок после подкожной реиммунизации на фоне первичной подкожной иммунизации, как показывают полученные результаты исследований, не представляется возможным. РИД с О-ПС антигеном имеет при этом минимальные издержки, выявляя 2,5% животных с поствакцинальными реакциями.

Поствакцинальные реакции у здоровых овец, привитых первично вакциной из штамма 19 конъюнктивально в уменьшенной дозе, а затем реиммунизированных на указанном фоне этим же методом, изучали в двух благополучных по бруцеллезу хозяйствах на поголовье 200 гол.

До иммунизации и через 1 год после первичной иммунизации у животных РА, РСК, РНГА и РИД с О-ПС антигеном были отрицательными.

После трехкратной конъюнктивальной реиммунизации у животных через 2,5 месяца РИД и РА отсутствовали, а РСК в титре не выше 1:5 и/или РНГА в титре не выше 1:50 были у 3% исследованных животных.

Таким образом, доказана возможность использования комплекса диагностических реакций для серологических исследований на бруцеллез овец через 3 месяца после многократных иммунизаций вакциной из штамма 19 конъюнктивальным методом.

2.2.2. Противозпизоотическое и противозпидемическое значение РИД с официальным О-ПС антигеном в поствакцинальной диагностике бруцеллеза мелкого рогатого скота

Противозпизоотическое и противозпидемическое значение РИД с официальным О-ПС антигеном (изготовленным из *B.abortus*) в поствакцинальной диагностике бруцеллеза мелкого рогатого скота особенно демонстративно проявилось в Барун-Хемчикском кожууне Республики Тыва.

В 1998 году из-за резко обострившейся эпидемической ситуации (заболеваемость людей бруцеллезом на 100 тыс. населения в 1998 году составила 124,1 - при среднем показателе за 1992-97 годы 28,9) уровень вакцинации овец и коз, и, прежде всего, в частном секторе, возрос до 90,2% (при среднем уровне вакцинации в 1992-97 годах 38,1%). Уровень реагирования исследованного вакцинированного поголовья в РИД в 1998 году составил 5,8%. Затем он стал неуклонно снижаться - до 0,9% в 2001 году. Однако уже в 2002 году он вновь значительно возрос - до 3,6% (зарегистрировано 15 новых острых эпизоотических очагов; в них отмечена и основная заболеваемость бруцеллезом людей). Животных неблагополучных отар в этих очагах в течение последних лет вакцинации против бруцеллеза в большинстве случаев не подвергали. Уровень иммунизации поголовья овец и коз в целом по кожууну снизился с 90,2% в 1998 году до 57,7% в 2002 году.

В 2002 году в связи с чрезвычайной эпидемической ситуацией все поголо-

вые эпизоотических очагов было подвергнуто иммунизации вакциной из штамма 19 с полным охватом. Диагностические исследования и реиммунизации неблагополучного поголовья активно действующих эпизоотических очагов проведены и в 2003-2004 годах. В этот период из 15 активно действующих эпизоотических очагов 10 были купированы.

При этом важно отметить, что в указанные годы в кожууне с нашим участием иммунизация (реиммунизация) всего неблагополучного поголовья мелкого рогатого скота вакциной из штамма 19 была проведена конъюнктивальным методом в дозе 4 млрд. м.к., что практически сняло проблему выявления РИД поствакцинального характера. Этим же методом иммунизацию мелкого рогатого скота против бруцеллеза в кожууне осуществляли и в 2005-2006 годах.

Уровень иммунизации животных указанным методом составил в 2003-2006 годах 54,2; 57,4; 44,4 и 45% соответственно.

Уровень же реагирования в РИД по результатам серологических исследований иммунизированных животных составил в 2003 году 0,9% от числа исследованных (в 2002 году – 3,6%), а в 2004-2006 годах – соответственно 1,6%; 6,4%; 2,9%. Следует отметить, что в указанные годы исследованиям подвергали практически лишь поголовье острых эпизоотических очагов (из-за отсутствия технических и финансовых возможностей).

Случаев заболевания людей острой формой бруцеллеза было выявлено в 2002 году – 32, в 2003 – 19, в 2004 – 15, в 2005 – 7, в 2006 году – 9.

Итак, очевидны противоэпизоотический и противоэпидемический эффекты, связанные с проведением на фоне иммунизаций поголовья овец и коз вакциной из штамма 19 как подкожно в дозе 40 млрд. м.к., так и, начиная с 2003 года, конъюнктивально в дозе 4 млрд. м.к., его диагностических исследований до очередной иммунизации, или после нее (используя провоцирующие свойства вакцины) с помощью РИД и убоя реагирующих. Возможные издержки, связанные с поствакцинальным происхождением реакций у животных, привитых подкожным методом, при ранней поствакцинальной диагностике с помощью РИД (уже через 3 месяца после прививки), не столь уж значительны и несопоставимы с положительным эффектом от купирования эпизоотических очагов, как источников заражения и заболевания людей.

2.2.3. Дифференциально-диагностическая эффективность РИД с О-ПС антигенами, изготовленными по аналогичной методике из штаммов *B.abortus* и *B.melitensis*, при бруцеллезе у мелкого рогатого скота, в том числе иммунизированного вакциной из штамма *B.abortus* 19 по различным схемам

В.М. Чекишевым, автором официального О-ПС бруцеллезного антигена, получаемого из *B.abortus*, был изготовлен по идентичной технологии антиген из

вакцинного штамма *B. melitensis* Rev-1. Официальный антиген условно обозначили как А - антиген (*abortus*), опытный – М - антиген (*melitensis*).

Диагностическую активность А- и М-антигенов в РИД предварительно проверили при исследовании сывороток крови 49 гол. искусственно инфицированного вирулентными бруцеллами вида *melitensis* мелкого рогатого скота, иммунизированного вакциной из штамма 19 по различным схемам (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты сравнительного изучения активности О-ПС А- и М- бруцеллезных антигенов в РИД на овцах, иммунизированных вакциной из штамма 19, в экспериментальных условиях

Схема иммунизации	Исследовано животных	Реагировало в РИД							
		до заражения (х)				после заражения (хх)			
		всего	в т.ч. с антигенами			всего	в т.ч. с антигенами		
			А+М	А	М		А+М	А	М
подкожно + конъюнктивально 40+4 млрд. м.к.	9	1	-	1	-	7	2	-	5
подкожно + подкожно 40+40 млрд. м. к.	9	6	-	6	-	5	3	1	1
конъюнктивально+конъюнктивально 4+4 млрд. м.к.	9	-	-	-	-	7	2	-	5
подкожно 40 млрд. м.к.	9	-	-	-	-	3	2	-	1
конъюнктивально 4 млрд. м.к.	8	-	-	-	-	6	5	-	1
итого (подопытные животные, <i>abortus+ melitensis</i>)	44	7	-	7	-	28	14	1	13
Контроль (<i>melitensis</i>)	5	-	-	-	-	3	2	-	1

Примечание: А-антиген - изготовлен из штамма *B. abortus* 19

М-антиген - изготовлен из штамма *B. melitensis* Rev-1

х- на 50-й день после ревакцинации шт. *B. abortus* 19

хх- на 30-й день после заражения шт. *B. melitensis*

Интактные животные шестой группы (5 овцематок) служили контролем. Их одновременно с подопытными (первой, второй и третьей групп - через 50 дней после ревакцинации, а четвертой и пятой групп - по истечению 13 месяцев после первичной вакцинации) заражали культурой вирулентного штамма *B. melitensis* Н-102 в десятикратной инфицирующей дозе (1 млн. м.к.).

Через 50 дней после конъюнктивальной реиммунизации животных вакциной из штамма в малой дозе положительные показания с А-антигеном были у меньшего в 6 раз количества животных, чем в этот же срок после подкожной в полной дозе.

РИД была отрицательной во всех случаях через 50 дней после двукратной конъюнктивальной иммунизации в малой дозе, а также через 13 месяцев после первичной как подкожной, так и конъюнктивальной иммунизации.

Через 30 дней после заражения животных бруцеллами вида *melitensis* положительные показания РИД зарегистрировали во всех группах, включая контрольную. Однако закономерности реагирования были иными, чем до заражения. Преимущество было явно за М-антигеном. Так, в подопытных группах всего реагировало положительно с обоими антигенами 28 проб, из них только с М-антигеном – 13, а только с А-антигеном лишь одна проба (вторая группа - схема «подкожно+подкожно»). Остальные 14 проб реагировали с обоими антигенами. В контрольной группе положительная РИД была отмечена только у 3 животных (60%), причем только с М-антигеном – у одного. У двух животных положительную РИД зарегистрировали как с М-, так и с А-антигеном.

Из 18-и животных, зараженных *B. melitensis* как на интактном фоне, так и на фоне иммунизации вакциной из штамма *B. abortus* 19, с подтвержденным бруцеллоносительством (таблица 2) в РИД реагировало 13 (72,2%). Из них только с А-антигеном реагировало одно животное (7,6%), только с М-антигеном – 4 (30,8%), а с обоими антигенами – 8 (61,6%).

Таблица 2 – Результаты сравнительного изучения активности О-ПС А- и М-бруцеллезных антигенов в РИД на овцах, иммунизированных вакциной из штамма 19, с подтвержденным бруцеллоносительством после искусственного заражения *B. melitensis*

Характеристика групп	Количество исследованных животных	Реагировало положительно в РИД							
		общее число реагирующих		в т.ч. с антигенами					
		кол-во	% к числу исследованных	А+М		А		М	
				кол-во	% к общему числу реагирующих	кол-во	% к общему числу реагирующих	кол-во	% к общему числу реагирующих
вакцинированные и ревакцинированные	13	10	76,9	6	60,0	1	10,0	3	30,0
неиммунизированные	5	3	60,0	2	66,6	-	-	1	33,4
ИТОГО	18	13	72,2	8	61,5	1	7,7	4	30,8

Экспериментально установленная роль определенной видоспецифичности бруцеллезных А- и М-антигенов была подтверждена и в производственных условиях как на здоровых животных, иммунизированных вакцинами из штаммов *B. abortus* и *B. melitensis* (таблица 3), так и на овцах и крупном рогатом скоте из неблагополучных по бруцеллезу хозяйств с естественным течением инфекции (таблица 4). Кроме того, доказано явное преимущество по чувствительности у

овец М-антигена. Причем, из 3 убитых овец, реагировавших только на М-антиген, в двух случаях выделен возбудитель бруцеллеза *B. melitensis*. Реагирование крупного рогатого скота только на М-антиген можно объяснить реально возможными контактами данного стада с неблагополучными по бруцеллезу (возбудитель – *B. melitensis*) отарами овец.

Таблица 3 - Результаты сравнительного изучения активности О-ПС бруцеллезных А- и М-антигенов в РИД при исследовании сывороток крови здоровых овец, иммунизированных вакцинами из штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*, в благополучных по бруцеллезу хозяйствах

Схема иммунизации (вакцинный штамм)	Количество исследованных животных	Реагировало положительно в РИД							
		общее число реагирующих		в т.ч. с антигенами					
				А+М		А		М	
		кол-во	% к числу исследованных	кол-во	% к числу реагирующих	кол-во	% к числу реагирующих	кол-во	% к числу реагирующих
Рев-1+Рев-1 (<i>B. melitensis</i>)	200	12	6,0	3	25,0	1	8,3	8	66,6
19+19 (<i>B. abortus</i>)	98	6	6,1	5	83,3	1	16,6	-	-

Таблица 4 – Результаты исследования сывороток крови от животных с естественным течением бруцеллеза в РИД с разными антигенами

Вид животных	Количество исследованных сывороток	Реагировало положительно						
		общее число реагирующих	в том числе с антигенами					% к числу реагирующих
			А+М	% к числу реагирующих	А	% к числу реагирующих	М	
овцы	21	18	4	22,2	-	-	14	77,8
крупный рогатый скот	50	41	36	87,8	3	7,3	2	4,9

При исследовании 104 проб сывороток крови овец неблагополучной по бруцеллезу отары с естественным течением инфекции, вызванной *B. melitensis* (без вакцинации) выявленные преимущества М-антигена были еще раз подтверждены: РИД с О-ПС антигенами была положительной в 28 пробах (26,9% от числа исследованных), в том числе с обоими антигенами (А и М) – в 20 про-

бах (19,2%) и только с М-антигеном – в 8 пробах (7,7%).

При комплексном серологическом исследовании 409 проб сывороток крови мелкого рогатого скота неблагополучной по бруцеллезу отары через 1 год после последней иммунизации вакциной из штамма *B.abortus* 19 подкожно в дозе 40 млрд м.к. РИД с О-ПС антигенами была положительной в 23 пробах (5,6% от числа исследованных), в том числе с обоими антигенами (А- и М-) – в 15 пробах (3,7%) и только с антигеном М – в 8 пробах (1,9%).

Из 15 проб сыворотки крови с положительной РИД с обоими антигенами РНГА с бруцеллезным эритроцитарным диагностикумом в титре 1:200 и выше была в 11 пробах (73,3%). Из их числа РСК в титре 1:20 и выше была в 8 пробах (72,7%). В остальных трех пробах РСК была в титре не выше 1:10, РА – не выше 25 МЕ.

В 4 пробах с положительной РИД с обоими антигенами РНГА была в титре не выше титра 1:100 (РСК в двух пробах была в титре 1:5, в двух – 1:40; РА в трех пробах была отрицательной в одной – в титре 1:25)

Из 8 проб сывороток крови с положительной РИД только с М-антигеном РНГА с бруцеллезным эритроцитарным диагностикумом в титре 1:200 и выше была в 6 пробах (75%). Из их числа РСК в титре 1:20 и выше была в 5 пробах (83,3%). В одной пробе РСК была в титре 1:10, РА – в титре 50 МЕ.

В двух пробах с положительной РИД только с М-антигеном РНГА была в титре 1:100 (РСК – в обеих пробах в титре 1:40, РА – в титре не выше 50 МЕ).

При комплексном серологическом исследовании 221 пробы сывороток крови мелкого рогатого скота неблагополучной по бруцеллезу отары через 1 год после последней иммунизации вакциной из штамма *B.abortus* 19 конъюнктивально в дозе 4 млрд м.к. РИД была положительной в 14 пробах (6,3% от числа исследованных), в том числе только с М-антигеном во всех 14 пробах.

Из 14 проб сывороток крови с положительной РИД только с М-антигеном РНГА с бруцеллезным эритроцитарным диагностикумом в титре 1:200 и выше была в 9 пробах (64,3%). Из их числа РСК в титре 1:20 и выше была во всех пробах, РА не превышала титр 50 МЕ.

В 5 пробах с положительной РИД только с М-антигеном РНГА была в титре 1:100 (РСК во всех пробах была в титре 1:20 и выше, РА – в титре не выше 50 МЕ).

Аналогичные результаты получены в ряде других отар.

Так, при исследовании 2302 проб сывороток крови мелкого рогатого скота, иммунизированного вакциной из штамма 19 по различным схемам, из 8 неблагополучных по бруцеллезу отар, в РИД всего с М- и А-антигенами реагировало 130 проб (5,6% от общего числа исследованных, в отдельных отарах от 3,9 до 22,5% от числа исследованных). От общего числа реагирующих на оба антигена реагировало 38, или 29,3% , только на М-антиген – 90 (69,2%), только на А-антиген – 2 (1,5%).

При исследовании же 480 проб сывороток крови иммунизированного вакциной из штамма 19 мелкого рогатого скота из трех благополучных по бруцел-

лезу отар, в РИД всего с М- и А-антигенами реагировало 3 пробы (0,6% от общего числа исследованных, в отдельных отарах от 0 до 2,1% от числа исследованных). От общего числа реагирующих на оба антигена реагировали все три пробы, соответственно только на М-антиген и только на А-антиген реагирующих не выявлено.

Из полученных результатов очевидны перспективы повышения уровня эффективности поствакцинальной диагностики бруцеллеза у мелкого рогатого скота за счет внедрения в широкую ветеринарную практику РИД с новым О-ПС антигеном, изготовленным по той же методике, что и официальный (из *B.abortus*), но из *B.melitensis*. Кроме того, очевидна дифференциально-диагностическая роль обоих антигенов при использовании их в схемах эпизотической оценки по бруцеллезу стад вакцинированных животных.

3. ВЫВОДЫ

1. После первичной подкожной иммунизации мелкого рогатого скота вакциной из штамма *B.abortus* 19 диагностические исследования животных оказалось возможным проводить не ранее, чем через 4 месяца только с помощью РИД с официальным О-ПС антигеном (из *B.abortus*), а через год – с помощью всего изученного диагностического комплекса (включая РИД) с диагностическими титрами РА выше 100 МЕ, РНГА выше 1:100, РСК-S - выше 1:10.

2. После подкожной однократной реиммунизации животных вакциной из штамма *B.abortus* 19 на фоне первичной подкожной иммунизации этой же вакциной проводить диагностические исследования с помощью изученного диагностического комплекса оказалось невозможным. Наименьшими издержками обладала РИД с официальным О-ПС антигеном (более 2% здоровых животных с реакциями вакцинного происхождения).

3. Поствакцинальная диагностика после первичной конъюнктивальной иммунизации, а также конъюнктивальных реиммунизаций на фоне первичной конъюнктивальной, и даже подкожной иммунизации вакциной из штамма *B.abortus* 19 оказалась возможной с использованием всего диагностического комплекса через 3-4 месяца. На фоне первичной подкожной иммунизации установлена целесообразность учитывать в качестве диагностических титры РА выше 100 МЕ, РНГА – выше 1:100, РСК-S – выше 1:10, а на фоне первичной конъюнктивальной иммунизации – 100 МЕ и 1:100 и выше, 1:10 и выше соответственно.

4. Диагностические исследования мелкого рогатого скота на бруцеллез неблагополучных по этой болезни отарах с помощью РИД с официальным О-ПС антигеном на фоне иммунизации животных вакциной из штамма 19, как подкожно в дозе 40 млрд. м.к., так и конъюнктивально в дозе 4 млрд. м.к., с убоем реагирующих, обеспечивают повышение уровня эффективности проти-

вобруцеллезных мероприятий. Так, в одной из неблагополучных территорий в течение четырех лет за счет этого удалось снизить число активно действующих эпизоотических очагов с 15 до 4 (в 3,7 раза), а число случаев заболевания людей бруцеллезом в острой форме - с 32 до 9 (в 3,5 раза).

5. У мелкого рогатого скота, иммунизированного вакциной из штамма *B.abortus* 19 по разным схемам, с искусственным и естественным инфицированием бруцеллами вида *melitensis*, при использовании О-ПС М-антигена (из *B.melitensis*), по сравнению с официальным О-ПС А-антигеном (из *B.abortus*), дополнительно выявляли в среднем в 2,25 раза больше инфицированных животных. Эпизоотическая опасность таких животных доказана наличием у них высоких титров РНГА и РСК (1:200 и выше и 1:20 и выше соответственно), а также результатами бактериологических исследований (положительная биопроба, выделение культур).

6. У искусственно и естественно инфицированных бруцеллами вида *melitensis* овец, иммунизированных вакциной из штамма *B.abortus* 19 подкожно в дозе 40 млрд. м.к. превалирует регистрация РИД с обоими О-ПС антигенами, а после иммунизации этой же вакциной конъюнктивально в дозе 4 млрд. м.к. - только с О-ПС М-антигеном.

7. У здоровых овец положительную РИД только с О-ПС М-антигеном после иммунизации вакциной из штамма *B.abortus* 19 не наблюдали, а после иммунизации вакциной из штамма *B.melitensis* Рев-1 регистрировали в 66,6% случаев из общего числа реагировавших на оба антигена. Полученные результаты свидетельствуют об определенной видоспецифичности антигенов, изготовленных из *B.abortus* и *B.melitensis*.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Использовать в системе противобруцеллезных мероприятий у мелкого рогатого скота в целях повышения уровня ее эффективности:

- конъюнктивальный метод иммунизации овец и коз вакциной из штамма 19, обеспечивающий специфическую защиту, а также выявление в ранние сроки после вакцинации инфицированных животных с помощью РА, РСК, РНГА и РИД;
- РИД с новым О-ПС антигеном, изготовленным из *B.melitensis*, позволяющим выявлять значительно большее количество инфицированных животных;
- РИД с О-ПС антигенами из *B.abortus* и *B.melitensis* для использования в схемах эпизоотической оценки по бруцеллезу вакцинированных животных.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Технологичность живой вакцины из штамма 19 на овцах для иммунизации и реиммунизации в уменьшенной дозе при конъюнктивальном методе введения / Соавт.: С.М. Достай, А.С. Димова, П.К. Аракелян и др. // Аграрная наука Сибири, Монголии, Казахстана и Башкортостана сельскому хозяйству: матер. 6-й междунар. науч.-практ. конф. - Новосибирск, 2003. - С. 117-120.

2. Практическая реализация концепции оптимизации противобруцеллезных мероприятий у мелкого рогатого скота в Сибири / Соавт.: С.М. Достай, П.К. Аракелян, И.А. Косилов и др. // Современные проблемы эпизоотологии: матер. междунар. науч.-практ. конф. - Новосибирск, 2004. - С. 20-23.

3. Современные проблемы эпизоотологического надзора при бруцеллезе в Сибири / Соавт.: А.С. Донченко, С.К. Димов, И.А. Косилов и др. // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: матер. Сиб. междунар. ветеринар. конгр.-Новосибирск, 2005. - С.112-113.

4. Практический опыт оптимизации системы противобруцеллезных мероприятий у мелкого рогатого скота в экстремальных эпизоотических, эпидемических и социально-экономических условиях / Соавт.: С.К. Димов, П.К. Аракелян, С.М. Достай и др. // Вестник с.-х. науки Казахстана. - 2006. - №6. - С.40-41.

5. Усовершенствование диагностики бруцеллеза у овец / Соавт. П.К. Аракелян, С.К. Димов, О.В. Бондарева // Современное состояние и перспективы развития производства ветеринарных биопрепаратов: матер. 3-й междунар. конф. - Алматы, 2006. - С.124-127.

6. Эффективность конъюнктивального метода применения вакцины из штамма *B. abortus* 19 при бруцеллезе мелкого рогатого скота / Соавт.: П.К. Аракелян, И.А. Косилов, С.К. Димов и др. // Ветеринария. - 2006.- № 8. - С. 22-27.

7. РИД с О-ПС антигеном из *B. melitensis* для диагностики бруцеллеза у овец / Соавт.: П.К. Аракелян, И.А. Косилов, В.М. Чекишев и др. // Ветеринария. - 2007. - № 3. - С. 23-28.

8. Патент РФ 2303458 от 27.07. 2007 г. Способ диагностики бруцеллеза мелкого рогатого скота / Соавт.: П.К. Аракелян, И.А. Косилов, Е.Б. Барабанова и др. // заявители и патентообладатели ГНУ ВНИИБТЖ и ГНУ ИЭВСИДВ по заявке № 2005122218/13 от 13.07.2005.- Бюл. № 21.

Подписано в печать 07.10.2008г. Формат 60x84/16
Объем 1 п.л. Тираж 100 экз. Заказ № 194

Отпечатано в ООО ИПФ «Агрос»
630501, Новосибирская обл., пос Краснообск