DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-09.36>

**ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПУЛЛОРНОГО ЭРИТРОЦИТАРНОГО
АНТИГЕНА: СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕАКЦИИ**
PECULIARITIES OF THE USE OF A PURULENT ERYTHROCYTE ANTIGEN:
SPECIFICITY OF THE REACTION

Бурлаков С.В.*, начальник отдела
Burlakov S.V., Chief of the Department

**Отдел оценки и анализа рисков, Всероссийский государственный центр
качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов,
Москва, Россия**

Department of Veterinary Risks Assessment and Risk-Based Prediction, All-Russian State
Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russia

Капустин А.В., Лаишевцев А.И., научные сотрудники
Kapustin A.V., Laishevtcev A.I., Researchers

**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я. Р. Коваленко, Москва, Российская Федерация**

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

*E-mail: s.burlakov@crarf.ru

АННОТАЦИЯ

Быстрое и точное диагностирование сальмонеллеза является первым и основным элементом своевременной профилактики и борьбы с данным заболеванием среди сельскохозяйственных животных, в т.ч. птиц. Диагностика сальмонеллёзов животных и птиц подразумевает анализ эпизоотологических данных, клинических признаков и патоморфологических изменений, на основании которых устанавливается предварительный диагноз с последующим обязательным подтверждением его методами лабораторной диагностики. Среди лабораторных тестов для установления диагноза существуют экспресс-методы, позволяющие выявлять антиген или специфические к нему антитела в крови больной птицы: полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), кровякапельная реакция непрямой гемагглютинации с цветным комплексным пуллорным антигеном (ККРНГА) для диагностики пуллороза-тифа кур. Окончательный диагноз ставится на основании лабораторных исследований с выделением возбудителя и его видовой и/или серовариантной идентификации. Для птицефабрик обязательным условием является контроль поголовья на пуллороз, для диагностирования которого используется эритроцитарный пуллорный антиген. Однако, при проведении мониторингов латентных инфекций среди птицепоголовья, в том числе и сальмонеллёзов, нами были выявлены случаи, когда в благополучном по пуллорозу предприятии ККРНГА была положительной при полном отсутствии клинических признаков и отрицательном заключении микробиологического исследования. В ходе проведения бактериологического исследования положительно и сомнительно реагирующих на сальмонеллёз птиц нами был выделен ряд представителей условно-патогенной микрофлоры, которые в последующем были использованы как биологический материал для воспроизведения экспериментальной инфекции у кур с целью выявления возбудителей, вызывающих неспецифическую реакцию с пуллорным антигеном. В качестве дополнительного метода для оценки специфичности ККРНГА эти же сыворотки были проверены на наличие антител к сальмонеллам методом иммуноферментного анализа. В результате проведенного исследования выявлено наличие неспецифических реакций антигена пуллорного эритроцитарного с кровью птицы, экспериментально заражённой несколькими видами бактерий: *Proteus vulgaris*,

Morganella morganii u *Escherichia coli*, при отсутствии положительного результата в ИФА.

ABSTRACT

Rapid and accurate diagnosis of salmonellosis is the first and essential element for timely prevention and combating the disease among farm animals, including poultry. Diagnosis of animals and bird's salmonellosis involves the analysis of epizootic data, clinical signs and pathological changes, on the basis of which a preliminary diagnosis with the subsequent mandatory confirmation of his methods of laboratory diagnostics. Laboratory test for diagnosis there are rapid tests that can identify a specific antigen or antibodies there to in the blood of sick poultry: polymerase chain reaction (PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), blood-drop indirect hem-agglutination reaction with a color complex antigen pullorum for the diagnosis pullorosis-typhoid chickens. The final diagnosis is based on laboratory research with abjection and its species and/or serovariants identification. For poultry farm is obligatory to control livestock on the pullorosis, the diagnosis of which is used pullorosis erythrocyte antigen. However, during the monitoring of latent infections among poultry, including salmonellosis, we have identified cases when successful on pullorosis the company of (blood-drop indirect hem-agglutination reaction with a color complex antigen pullorum) was positive in the absence of clinical signs and negative opinion of microbiological research. During the bacteriological examination is positive and questionably reacting to the salmonellosis of the birds we were allocated a number of representatives of conditionally pathogenic microflora, which were subsequently used as biological material to reproduce experimental infection in chickens with the aim of identifying pathogens that cause nonspecific reaction with the antigen pullorum. As an additional method to assess the specificity of (blood-drop indirect hem-agglutination reaction with a color complex antigen pullorum) the same serum was tested for presence of antibodies to the Salmonella enzyme immunoassay. In the result of the study revealed the presence of nonspecific reactions pullorosis erythrocytic antigen with the blood of birds experimentally infected with multiple species of bacteria: *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* and *Escherichia coli*, in the absence of a positive result in the ELISA.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Сальмонеллёз, пуллороз, диагностика, мониторинг, анализ-рисков, специфичность диагностикумов, эритроцитарный антиген, иммуноферментный метод, безопасность продукции птицеводства.

KEY WORDS

Salmonellosis, pullorosis, diagnostics, monitoring, analysis, risks, specificity of antigens, erythrocyte antigens, immunoassay method, the safety of poultry products.

Лабораторная диагностика инфекционных болезней является не только необходимой мерой для своевременного предотвращения падежа животных, но и реальным средством спасения людей от возникновения и развития массовых заболеваний [2, 3, 11]. Поэтому при выборе средств диагностики предпочтение должно отдаваться методам, которые минимизируют получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов [8, 9, 10]. На примере серологической диагностики пуллороза кур можно сравнить два метода, имеющих важную значимость, но различную степень достоверности получаемых результатов:

1. Крове-капельная реакция непрямой гемагглютинации – является легко воспроизводимым, дешёвым методом экспресс диагностирования пуллороза кур непосредственно на территории производства. Постановка реакции осуществляется благодаря использованию коммерческого пуллорного эритроцитарного антигена и может быть воспроизведена любым ветеринарным работником или иным персоналом птицефабрики. Процесс постановки реакции занимает не более 5 минут, вместе с взятием пробы крови.

2. Иммуноферментный анализ является более сложно воспроизводимым, достаточно дорогим (на фоне эритроцитарного диагностикума), требующим достаточно дорогого оборудования и высококвалифицированного оператора. Процесс постановки достигает 4-5 часов с учётом времени необходимого для получения сыворотки крови. Для реализации данного метода исследования птицепоголовья на пуллороз на территории Российской Федерации имеются в продаже апробированные наборы зарубежного производства: *BioChek Ck117*, *Ck 218* и *IDEXX SE Ab Test*, а так же отечественный «Набор для выявления антител к бактериям рода *Salmonella* серогрупп В и D в сыворотках крови кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении», изготавливаемый ВНИИЗЖ [4, 6].

Стоит отметить, что ранее для серологической диагностики сальмонеллёза применялись методы иммунофлюоресценции (РИФ) и реакция латекс агглютинации (РЛА), но в данный момент наборы для ветеринарной практики не производятся. Тем не менее, ввиду того, что РИФ и РЛА нацелены на выявление не антител, а антигенов, существует возможность использования для постановки этих реакций медицинских диагностических средств. Оба приведённых серологических метода востребованы и обладают определённой специфичностью в отношении возбудителя [1, 5, 7].

Цель исследования – определение специфичности пуллорного эритроцитарного антигена в кровяной реакции непрямой гемагглютинации (ККРНГА) при экспериментальных инфекционных болезнях кур в сравнении с ИФА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная часть исследования проводилась на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко», а так же на базе Вышневолоцкого филиала ВИЭВ с опытной базой (о. Лисий). Мониторинг латентных инфекций птиц проводился в частных птицеводческих предприятиях Кировской, Тамбовской и Орловской областях в течение 2016 года.

При проведении микробиологического исследования в рамках выполнения скрининга инфекционных болезней в скрытой форме использованы следующие питательные среды: агар Эндо, МакКонки, агар Сабуро, бульон Сабуро, мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ), *MRS*-агар, колумбия агар – основа для кровяного агара, цитратный агар, висмут-сульфитный агар, *SS*-агар, *XLD*-агар, хромогенный агар см 1007, среда Раджа-Ханса, основа бульона с бромкрезоловым пурпурным *M284 Himedia*. Все используемые среды являются коммерческими, приготовление их производится в полном соответствии с инструкцией производителя, которыми являются «*Oxoid*» и «*Himedia*». Биохимическая идентификация выделенных культур проведена с использованием следующих тестов и наборов: *RapID™ ANA II*, *RapID™ NF Plus*, *RapID™ ONE*, *Microbact 12e*, *API 20E*, *ENTEROtest 24N*, *HiStaph*, набор для биохимической идентификации стафилококков и *HiStrep* Набор для идентификации стрептококков. Для изучения дополнительных сахаролитических свойств использованы среды Гисса с углеводами: адонит, арабиноза, галактоза, D-глюкоза, дульцит, инозит, инулин, ксилоза, мальтоза, маннит, манноза, раффиноза, рамноза, салицит, сорбит, сахароза, трегалоза, фруктоза, целлобиоза. Заражение птиц контрольной группы проведено с использованием музейного штамма *Salmonella pullorum* № 16 из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко.

Обоснованием для проведения данного исследования стало то, что при серологическом исследовании в благополучном по сальмонеллезу птицеводческом хозяйстве у вновь введенного поголовья кур-молодок были выявлены случаи, когда клинически здоровая и не имеющая признаков сальмонеллёза птица положительно реагировала в ККРНГА с пуллорным эритроцитарным антигеном. При этом после проведенного в диагностических целях убоя и бактериологического исследования, не

было получено подтверждения наличия сальмонелл в материале. Наиболее часто в патологическом материале обнаруживали следующие виды микроорганизмов: *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus faecalis*, другие виды бактерий выявлялись в единичных случаях. Для выявления бактериального антигена, провоцирующего получение ложного результата ККРНГА, было проведено экспериментальное инфицирование выделенными изолятами бактерий птицы с последующим исследованием её на наличие антител в ККРНГА и ИФА.

В ходе выполнения работы было произведено экспериментальное заражение различными культурами бактерий девяти групп птиц в возрасте 170 дней по 3 головы в каждой. В качестве положительного контроля была инфицирована группа птиц бактериями вида *Salmonella pullorum*, в качестве отрицательного оставлены чистые не инфицированные птицы. Во время проведения опыта вся птица содержалась отдельно. Взятие крови для постановки реакции ККРНГА и получения сыворотки для ИФА проводилось в течение месяца после заражения 6 раз с экспозицией 5 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведение исследования позволило определить, что экспериментальное заражение птицы бактериями видов *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* и *Streptococcus faecalis* не вызывало образования антител, дающих положительную реакцию с пуллорным антигеном в кровякапельной реакции и при исследовании полученных от них сывороток в иммуноферментном анализе в течение всего срока наблюдения (30 дней). При этом антигены *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris* и *Salmonella pullorum* провоцировали проявление положительной и сомнительной реакции с различной степенью в течение всего опыта. Контрольная отрицательная группа демонстрировала негативный результат при воспроизведении обоих серологических методов. Результаты изучения специфичности эритроцитарного пуллорного антигена при экспериментальном воспроизведении инфекции приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты проведения кровякапельной реакции непрямой гемагглютинации при экспериментальном заражении

Срок инф-ия	Реакция	Вид возбудителя											
		<i>Escherichia coli</i>			<i>Morganella morganii</i>			<i>Proteus vulgaris</i>			<i>Salmonella pullorum</i>		
Номер птицы		№1	№2	№3	№1	№2	№3	№1	№2	№3	№1	№2	№3
До инф-ия	ККРНГА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ИФА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 день	ККРНГА	++	++	+	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
	ИФА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	«+»	«+»	«+»
10 день	ККРНГА	+++	+++	++	-	++	++	++	++	++	++++	++++	++++
	ИФА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	«+»	«+»	«+»
15 день	ККРНГА	++	+	+	-	-	+	+	+	-	++++	++++	++++
	ИФА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	«+»	«+»	«+»
20 день	ККРНГА	++	+	+	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
	ИФА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	«+»	«+»	«+»
25 день	ККРНГА	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
	ИФА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	«+»	«+»	«+»
30 день	ККРНГА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	++++
	ИФА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	«+»	«+»	«+»

- отрицательная реакция ККРНГА; + сомнительная реакция ККРНГА; ++ сомнительная реакция ККРНГА; +++ положительная реакция ККРНГА; ++++ положительная реакция ККРНГА; «+» положительная реакция ИФА.

Анализируя полученные данные по специфичности пуллорного антигена при экспериментальной инфекции культурами, не относящимся к роду *Salmonella* spp.

можно утверждать, что перекрёстную реакцию вызывал один из изолятов *E. coli*, отнесенный при серологической идентификации к серогруппе O138. Другие изоляты эшерихий, в том числе широко распространённых и признанных возбудителями эшерихиоза кур серогрупп O2 и O78, не вызывали образования антител, выявляющихся в ККРНГА. После проведенного заражения кур *E. coli* образование антител наблюдалось уже на 5 сутки и сохранялось вплоть до 25 дня с момента инфицирования. Положительная реакция постепенно исчезает к 30 дням. В отношении сомнительной реакции вызванной *Morganella morganii* стоит обратить внимание, что реакция была менее выражена, чем в группе положительного контроля, а также у кур, инфицированных эшерихиями серогруппы O138. При этом нарастание титра антител продолжалось в течение 10 дней, а затем постепенно снижалось и к 20 дню наблюдения у кур, инфицированных *M. morganii* уже не фиксировались даже сомнительные реакции. Аналогичная ситуация наблюдалась и при инфекции, вызванной *Proteus vulgaris*: наибольший титр в кровяной реакции наблюдался уже через 5 дней. При этом положительная реакция на выявление титров антител к сальмонеллам группы D методом ИФА у всех кур, инфицированных эшерихиями, протеом и морганеллами, отсутствовала.

В группе птиц положительного контроля, инфицированных штаммом *S. pullorum*, титры антител были зафиксированы в течение всего периода наблюдения с 5 по 30 день после инфицирования с высокой оценкой. Также у птиц этой группы наблюдалось проявление расстройство функции кишечника, синюшность гребня, потеря аппетита, угнетенное состояние, постепенно нарастающее истощение.

Наличие неспецифической реакции пуллорного антигена с кровью кур, не инфицированных сальмонеллами, можно считать следствием наличия близких антигенов у энтеробактерий, в частности *E. coli*, *M. morganii*, *P. vulgaris* и *S. pullorum*, что подтверждается филогенетической связью между ними.

При проведении периодических обследований поголовья птиц в подопытных хозяйствах установлено, что неспецифические реакции с пуллорным антигеном в большинстве случаев происходят только у птиц, вновь введенных в стадо (как правило, это куры-молодки, ежегодно сменяющие часть выбывающей переедой птицы). У птицы, находящейся в стаде более месяца наличие неспецифических реакции не наблюдалось. Это можно объяснить тем, что введенная в поголовье птица продуцирует антитела к возбудителям, циркулирующим на территории хозяйства. Ввиду того, что возбудители являются условно-патогенными, развитие клинических признаков и проявление патологического процесса не наблюдается.

Кроме того, как видно из таблицы №1 имеются особи, не проявляющие положительный результат в кровяной реакции. Такую ситуацию мы наблюдаем у птицы №1 инфицированную *M. morganii*, что в свою очередь говорит об индивидуальной чувствительности птицы.

Заключение. В соответствии с действующей инструкцией по применению эритроцитарного антигена для диагностики пуллороза-тифа птиц по кровяной реакции непрямой гемагглютинации, положительно и сомнительно реагирующая птица изолируется и отправляется на убой. В случаях, если реакция оказывается неспецифической, это приводит к необоснованной выбраковке здоровой, не представляющей опасность для заражения людей, птицы, что влечет серьезные экономические потери. Потому, при получении достаточно большого количества выявляемой методом ККРНГА положительно реагирующей птицы, а также подтверждении отсутствия циркуляции в хозяйстве у птицепоголовья сальмонеллезной инфекции, целесообразно проводить исследование методом ИФА. Это позволит обезопасить потребителей от риска заражения сальмонеллами, а также предотвратит экономические потери у производителей птицеводческой продукции. Так же нецелесообразно использовать пуллорный эритроцитарный антиген для диагностики в хозяйствах, где подтверждена циркуляция бактерий видов *M. morganii*, *P. vulgaris* и *E. coli* серогруппы O138.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Belimenko V.V. Prospects for the use of geographic information systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans.//Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 56. № 8. С. 22-25.
2. Burlakov S.V. Tasks of veterinary service to ensure the biological safety of poultry products in the Russian federation: analysis and assessment of risks.// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 59. № 11. С. 181-185.
3. Laishevtcev A.I. Microbial profile of the digestive canal of budgerigars (*Melopsittacus Undulatus*)//Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences, 2016; 5(53):76-82.
4. Pimenov N.V. Perfection of means and methods of combating salmonellosis of birds//Veterinary and feeding, 2012. 4:32-34.
5. Tatarenko Y.S. The study of pathogenic properties of enterobacterial flora of clinically healthy quails for possible detection of bacteriocarrier.// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 56. № 8. С. 67-73.
6. Гулюкин М.И. Методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности.// Ветеринарный консультант. 2007. № 21-22. С. 9-15.
7. Найманов А.Х. Практическое пособие по мониторингу бруцеллеза, туберкулеза, паратуберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота: организационно-хозяйственные, ветеринарно-санитарные и зоогигиенические аспекты профилактики и ликвидации этих инфекций.// ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко, Москва, 2014.
8. Татаренко Я.С. Выявление бактерионосительства перепелов частного сектора в Московской, Тульской и Рязанской областях.// Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. № 9. С. 48-52.
9. Шабейкин А.А. Эпизоотологические геоинформационные системы. Возможности и перспективы.// Ветеринария. 2016. № 7. С. 21-24.
10. Юров К.П. Методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности.// Ветеринарный консультант. 2007. № 21-22. С. 9-15.
11. Шорохов В.В., Ленев С.В., Капустин А.В. Пуллорный эритроцитарный антиген-диагностикум для пуллороза-тифа птиц // В книге: Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных средств для животных и их применения в ветеринарной практике Всероссийская научно-практическая конференция: тезисы докладов. 2000. С. 18-19.

© 2017 by the authors. Licensee RJOAS, Orel, Russia. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>