DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-1-5

Эффективность диагностических методов исследования бруцеллеза животных

Федоров А.И.
Fedorov A.I.

Федоров А.И., ведущий научный сотрудник лаборатории хронических инфекций, кандидат биологических наук;

Искандаров М.И., главный научный сотрудник лаборатории хронических инфекций, доктор ветеринарных наук;

Искандарова С.С., старший научный сотрудник лаборатории хронических инфекций
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

Слепцов Е.С., главный научный сотрудник лаборатории оленеводства и традиционных отраслей, доктор ветеринарных наук, профессор;

ФИЦ "Якутский научный центр СО РАН", Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова

Павлова А.И., профессор кафедры физиологии животных, доктор ветеринарных наук;

Корякина Л.П., доцент кафедры физиологии животных, кандидат ветеринарных наук.

Якутская государственная сельскохозяйственная академия

Винокуров Н.В., главный научный сотрудник лаборатории оленеводства и традиционных отраслей, доктор ветеринарных наук;

ФИЦ «Якутский научный центр СО РАН», Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова

Ключевые слова: бруцеллез, диагностика, клиническая, бактериологическая, серологическая, молекулярно-генетическая

Резюме. В статье приводятся данные о мероприятиях по диагностике бруцеллеза животных. В сравнительном аспекте представлена эффективность каждого метода диагностики в отдельности и в комплексе. Аргументирована целесообразность комплексного исследования на бруцеллез, при котором наиболее полно выявляются реагирующие на бруцеллез животных находящиеся в разной стадии заболевания. Многие методы диагностики бруцеллеза предлагались как универсальные, позволяющие обходиться только одной реакцией, результаты которого совпадают с суммарными результатами РА, РСК и РДСК. Так было с РИФ, РБП, ИФА, РНГА, РСКК и др. однако на практике это не оправдалось.

The effectiveness of diagnostic studies of brucellosis in animals

Fedorov A.I.,
Iskandarov M.I.,
Iskandarova S.S.

Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center Skryabin and Kovalenko All-Russia Research Institute of Experimental Veterinary Medicine (VIEV) Russian Academy of Sciences, Moscow, e-mail: m-iskandarov@mail.ru

Sleptsov E.S. Federal Research Center "Yakutsk Research Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Safronov Yakutsk Research Institute of Agriculture

Pavlova A.I. Yakutsk State Agricultural Academy

Koryakina L.P. Yakutsk State Agricultural Academy

Vinokurov N.V. Federal Research Center "Yakutsk Research Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Safronov Yakutsk Research Institute of Agriculture.

Key words: brucellosis; diagnostics, clinical, bacteriological, serological, molecular genetic

Abstract. The article provides the data on diagnostic methods for brucellosis in animals. The effectiveness of each diagnostic method has been compared individually and taken together. The advantages of a complex study of brucellosis has been shown. It provides the most efficient detection rate of animals in different stages of the disease. Different methods to diagnose brucellosis were suggested as universal, i.e. they would allow to do only one test, the results of which would consist with the results of agglutination assay, complement fixation test and prolonged complement fixation test taken together. This was the case with immunofluorescence test, rose bengal test, ELISA, indirect hemagglutination test, conglutination complex binding test, etc. Although in practice this assumption proved to be wrong. The reason of this is the undulating character of brucellosis. The old name of the disease - "undulous fever" reflects this phenomenon. The introduction of the pathogen leads to an acute course of the disease, which is replaced by chronic and latent with periodic exacerbations. The importance of diagnostic methods, both serological and allergic, in different periods of the disease is ambiguous. Immediately after infection in the acute period the serum contains agglutinating antibodies of predominantly IgM- class, which are replaced by complement-binding antibodies of predominantly IgG- class. At the same time as complement-binding antibodies are detected by complement fixation test and prolonged complement fixation test, sick animals develop sensibilisation to homologous antigen, which is detected by an allergic reaction to brucelline. The complement fixation test and the allergic reaction to brucelline are proved to be more stable and persist longer than the agglutination assay, which in the long term of the disease periodically appears and disappears, especially during the period of exacerbation of latent form of brucellosis. The method to trigger the latent brucellosis by the introduction of antigens, including non-agglutinogenic, contributes to a more efficient detection of sick animals. For this reason, all the diagnostic methods stated above are applied in a complex, since different sensitivity and specificity, as well as the stage of the infection lead to each individual diagnostic method identifying different number of positively reacting animals.

Для цитирования / For citation

Эффективность диагностических методов исследования бруцеллеза животных /Федоров А.И. [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2020. - № 1. – С. 21-23

The effectiveness of diagnostic studies of brucellosis in animals /Fedorov A.I. [et al.]// Veterinaria i kormlenie . – 2020. - № 1. – Р.21-23

Происходит это потому, что патогенез бруцеллеза характеризуется волнообразным течением. Старое название болезни "ундулирующая лихорадка" отражает это явление. После внедрения возбудителя развивается острое течение болезни, которое сменяется хроническим и латентным с периодическими обострениями. Значимость диагностических методов, как серологических, так и аллергических в разные периоды болезни неоднозначна. Сразу после заражения в острый период в сыворотке крови появляются агглютинирующие антитела преимущественно IgM- класса, которые сменяются комплементсвязывающими антителами преимущественно IgG- класса. Примерно одновременно с комплементсвязывающими антителами, выявляемыми в РСК и РДСК, у больных животных развивается сенсibilизация к гомологичному антигену, выявляемая в аллергической реакции на бруцеллин. Установлено что РСК и аллергическая реакция на бруцеллин более стабильны и сохраняются дольше РА, которая в отдаленные сроки заболевания периодически появляются и исчезают, особенно в период обострения латентной формы бруцеллеза. Метод провокации латентного бруцеллеза введением антигенов, в том числе неагглютиногенных, способствует более полному выявлению больных животных.

По этой причине все предложенные методы диагностики применяются в комплексе, так как в связи с различной чувствительностью и специфичностью, а также стадией инфекционного процесса каждый конкретный метод в отдельности выявляет разное количество положительно реагирующих животных.

В системе противобруцеллезных мероприятий ведущую роль играет диагностика. Не случайно в истории изучения бруцеллеза вопросу диагностики уделяли и уделяют особое внимание. И это оправдано, так как выявление очагов инфекции, их локализация, оздоровление неблагополучных хозяйств, отбор здоровых животных при пополнении или формировании новых стад, определение степени распространения инфекции возможно только на основе полноценных методов диагностики. Своевременное выявление больного животного может прекратить дальнейшее распространение инфекции и, наоборот, несвоевременный или неправильный диагноз, приводит к распространению бруцеллеза.

За прошедшие годы в экспериментальных и производственных условиях подробно изучены сроки развития и угасания иммунобиологических реакций и их диагностическое значение у различных видов животных. Разработаны и продолжают разрабатываться новые диагностические методы. Многие из них нашли широкое применение в практике, другие, после всестороннего изучения и апробации в практических условиях не используются.

В настоящее время для диагностики бруцеллеза применяют клинические, бактериологические, серологические и аллергические методы. Для выявления ДНК бруцелл в

биологическом материале применяется молекулярно-генетическая диагностика.

Клиническая диагностика имеет только вспомогательное значение. Наиболее характерные признаки, такие, как массовые аборты у крупного и мелкого рогатого скота, орхиты и эпидидимиты у баранов, хромота и бурситы у коров, воспаления и абсцессы холки у лошадей, и другие клинические признаки, наиболее часто встречающиеся при бруцеллезе, дают основания лишь к подозрению на бруцеллез, так как подобные признаки могут быть вызваны и другими причинами. Весьма серьезной сигнализацией о неблагополучии по бруцеллезу крупного и, особенно мелкого рогатого скота являются случаи заболевания бруцеллезом среди людей, обслуживающих животных.

Бактериологической диагностике подлежат патматериал от животных, у которых по клиническим признакам возникает подозрение на наличие бруцеллезной инфекции. Результат исследования предполагает индикацию и идентификацию возбудителя, которые воспроизводятся бактериоскопическим, бактериологическим и биологическим методами исследования.

Бактериоскопическое исследование применяется для обнаружения бруцелл в содержимом желудка и других органах абортированного плода, некротических участках плацент, в вагинальных истечениях и в содержимом абсцессов, вымени, бурситов и других материалов. Мазки окрашиваются по Граму, Стампу, Козловскому или Шуляку-Шин. Этот метод особенно может быть полезен при исследовании абортированного плода или плаценты, когда требуется, как можно, быстрее поставить диагноз, а также при поступлении обеззараженного или разложившегося материала, не пригодного для бактериологического исследования.

Выделение культуры бруцелл при бактериологическом исследовании является самым объективным методом для подтверждения бруцеллеза у животного и в ряде случаев является единственным способом решения вопроса об этиологии патологического процесса. Вместе с тем отсутствие культуры бруцелл в бактериологических посевах не означает отсутствие самого заболевания, так как на результаты бактериологических исследований влияют объективные и субъективные факторы, в частности свежесть и загрязнение патматериала, контаминация посторонней микрофлорой, качество питательных сред и даже квалификация специалиста, выполняющего бактериологические исследования.

Биологическое исследование (биопроба) проводят в необходимых случаях из материала, загрязненного посторонней микрофлорой, а также при незначительной концентрации в нем возбудителя. Результат считается положительным, если зараженные патматериалом лабораторные животные начинают реагировать серологически на бруцеллез с титром антител 1:10 и выше. В случае необходимости получения культуры возбудителя органы и лимфоузлы от них исследуются бактериологически.

Для серологического исследования сельскохозяйственных животных применяют реакцию агглютинации в пробирках (РА), реакцию связывания комплемента (РСК), или реакцию длительного связывания комплемента (РДСК), реакцию иммунодиффузии с О - полисахаридным антигеном (РИД), пластинчатую реакцию агглютинации с роз бенгал антигеном – роз бенгал пробу (РБП), кольцевую реакцию с молоком (КР) и другие реакции. Большая работа была выполнена в свое время сотрудниками

Таблица 1 – Результаты диагностических исследований у телок 5-6 месячного возраста в разные сроки после иммунизации вакциной из штамма 19

Table 1 - The results of diagnostic studies in heifers 5-6 months of age at different times after immunization with a vaccine from strain 19

Сроки после иммунизации	Кол-во животных	Количество реагирующих (в %)						Всего
		РА	РСК	РБП	РНГА	ИФА	ГЗТ	
7 дней	16	100	0	100	92	100	0	100
15 дней	16	100	100	100	100	100	0	100
30 дней	16	100	100	100	100	100	75	100
46 дней	13	92	100	100	100	100	92	100
61 дней	13	69	100	92	100	69	100	100
92 дней	10	50	90	90	90	60	100	100
122 дней	10	60	50	90	90	60	100	100
158 дней	10	0	30	30	50	30	90	100
180 дней	10	0	10	0	0	30	50	60
212 дней	10	0	0	30	10	10	30	40

ВИЭВ по разработке компонентного состава, оптимальной дозировке ингредиентов, апробации и внедрению Единого антигена для РА, РСК и РДСК при диагностике бруцеллеза, РБП, ИФА, КР, также РНГА и РНАт.

Аллергический метод диагностики бруцеллеза основан на выявлении специфических изменений реактивности организма к возбудителю. У больных овец показания аллергических реакций отличаются постоянством и сохраняются дольше, чем серологические реакции. Все это позволяет считать эффективным комплексное применение аллергического и серологических методов диагностики бруцеллеза.

В 1969–1970 гг. широко испытывался аллергический метод диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота с применением бруцеллина ВИЭВ. Специфичность и высокая чувствительность аллергического метода при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота позволила внедрить этот метод в практику.

Для аллергической диагностики бруцеллеза свиней в настоящее время применяется бруцеллин ВИЭВ, изготавливаемый из штамма *B. abortus* B-1, находящегося в RS-форме. Бруцеллин вызывает аллергическую реакцию у животных, инфицированных как типичными, так и измененными формами бруцелл.

В ветеринарной практике используется реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) для диагностики бруцеллеза. По данным многих авторов применение метода радиальной иммунодиффузии с растворимым поли-В антигеном позволяет дифференцировать больных от привитых животных, а также от других болезней, вызываемых возбудителями, имеющими антигенное родство с бруцеллами.

В настоящее время в ветеринарной практике для диагностики бруцеллеза начинают использовать молекулярно-генетический метод (полимеразная цепная реакция - ПЦР), позволяющий выявлять в биологическом материале ДНК бруцелл. ПЦР – это высокочувствительный, специфичный и быстрый, в плане получения результата, метод. Благодаря высокой чувствительности, специфичности и универсальности, ПЦР все чаще применяют для диагностики инфекционных болезней. ПЦР выявляет ДНК из патматериала, содержащего менее 100 клеток бруцелл.

Молекулярно-генетическая идентификация ДНК разных видов бруцелл, в значительной степени разрешает проблему диагностики бруцеллеза, в том числе и прижизненную.

Многие методы диагностики бруцеллеза не оправдали себя в качестве универсального метода, позволяющего обходиться только одной реакцией, результаты которой коррелировали бы с суммарными результатами РА, РСК и РДСК. Так было с РИФ, РБП, ИФА, РНГА, РСКК и др. однако на практике это не оправдалось.

По этой причине все предложенные методы диагностики применяют в комплексе, так как в связи с различной чувствительностью и специфичностью, а также стадией инфекционного процесса каждый конкретный метод в отдельности выявляет разное количество положительно реагирующих животных.

Это положение весьма наглядно продемонстрировано в таблице 1. Где на примере поствакцинальных реакций показана зависимость положительных результатов от сроков исследования после вакцинации и метода исследования.

Как видно из таблицы, разные методы серологических и аллергического исследования выявляют разное количество животных, с поствакцинальными реакциями.

Известно, что иммунологические реакции при бруцеллезе животных (особенно серологические), являются показателями, главным образом, иммунологической реактивности организма, и не отражают степени его невосприимчивости. Исходя из этого, все перечисленные методики не могут быть использованы для изучения напряженности и длительности иммунитета, особенно в связи с тенденцией разработки слабоагглютинирующих и неагглютинирующих вакцин.

Бруцеллез, пожалуй, одно из немногих заболеваний с таким богатым арсеналом диагностических подходов, который предназначен для выявления инфицированных животных. Однако, при выявлении больных животных и оздоровлении неблагополучного пункта, практика часто сталкивается с несовпадением интересов ветеринарных и хозяйственных служб.

Не способствует повышению энтузиазма специалистов в вопросе выявления больных животных и разнообразие диагностических методов, которые периодически внедряются и отменяются. Так, например, аллергический метод диагностики, применявшийся раньше практически на всех видах животных, сейчас используется только у свиней. Аналогичная ситуация происходит и с РБП. Все это снижает доверие ветеринарных специалистов на местах к предлагаемым методикам, осложняет толкование результатов диагностических исследований, особенно на фоне использования агглютиногенных вакцин.

Таким образом, существующая на сегодняшний день система мероприятий и методов диагностики бруцеллеза животных не в полной мере устраивает ветеринарных специалистов. Поэтому разработка эффективного, высокоспецифичного и унифицированного метода диагностики бруцеллеза остается актуальной задачей.

Литература/References

1. Анализ эффективности мероприятий против бруцеллеза сельскохозяйственных животных / Гулюкин М. И. [и др.] // Ветеринария. 2019. № 11. С. 20-25.
1. Analysis of the effectiveness of measures against brucellosis in farm animals/Gulyukin M. I. [et al.] // Veterinary medicine. 2019. № 11. p. 20-25.
2. Бруцеллез животных в России /Искандаров М.И. [и др.] // Новосибирск: Издво: АНС «СибАК», 2017. – 286 с.
2. Animal brucellosis in Russia/Iskandarov M.I. [et al.] // Novosibirsk: Publishing house: ANS "SibAK", 2017. 286 p.
3. Искандаров, М.И. Диагностика бруцеллеза /Искандаров М.И., Федоров А.И., Альбертян М.П. // Животноводство России. 2007. № 5. С. 59-60.
3. Iskandarov, M.I. Diagnostics of brucellosis /Iskandarov M.I., Fedorov A.I., Albertyan M.P. // Animal husbandry of Russia. 2007. № 5. p. 59-60.
4. Диагностика бруцеллеза северных оленей в условиях Крайнего Севера Российской Федерации /Винокуров Н.В. [и др.] // Новосибирск: Изд-во: АНС «СибАК», 2017. – 184 с.
4. Diagnostics of brucellosis in reindeer in the Far North of the Russian Federation/Vinokurov N.V. [et al.] Novosibirsk: Publishing house: ANS "SibAK", 2017. 184 p.
5. Конструирование слабоагглютинирующих вакцин против бруцеллеза /Гулюкин М.И. [и др.] // В книге: Бруцеллез - пограничная инфекция животных и человека, требующая общих усилий разных стран". 2008. С. 15-16.
5. Design of low-agglutinating vaccines against brucellosis /Gulyukin M.I. [et al.] // In the book: Brucellosis as a border infection of animals and humans, which requires common efforts of different countries." 2008. p. 15-16.
6. Молекулярно-генетическая диагностика бруцеллеза у экспериментально зараженных животных /Искандаров М.И. [и др.] // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 2018. Т. 80. № 1. С. 212-222.
6. Molecular genetic diagnostics of brucellosis in experimentally infected animals/Iskandarov M.I. [et al.] // Proceedings of the Kovalenko All-Russia Research Institute of Experimental Veterinary Medicine (VIEV). 2018. VOL. 80 NO. 1. p. 212-222.
7. Профилактические, диагностические, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов бруцеллеза /Гулюкин М.И. [и др.] // Научно-обоснованная система противозооотических мероприятий, и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных (Практическое руководство). - Новосибирск: Изд-во: АНС «СибАК», 2019. – С. 258-290
7. Preventive, diagnostic, restrictive and other measures, establishment and abolition of quarantine and other restrictions to prevent the spread and eliminate the foci of brucellosis/ Gulyukin M.I. [et al.] // Scientifically grounded system of antiepidemic measures, and modern methods of diagnostics, specific prevention and treatment of infectious diseases of domesticated animals (Practical guide). - Novosibirsk: Publishing house: ANS "SibAK", 2019. — p. 258-290