

УДК / UDC 579.62

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ
ПРИ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ**
COMPARATIVE STUDY OF THE SENSITIVITY OF SEROLOGICAL TESTS
IN THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN ANIMALS

Калядин Д.В.*, старший научный сотрудник
Kalyadin D.V., Senior Researcher

Матович Н.А., главный специалист
Matovich N.A., Chief Specialist

Чаус В.Ю., старший специалист
Chaus V.Y., Senior Specialist

Кленов А.С., младший научный сотрудник
Klenov A.S., Junior Researcher

Вавилова О.В., старший специалист
Vavilova O.V., Senior Specialist

Моторыгин А.В., заместитель заведующего лабораторией, к.в.н.
Motorygin A.V., Deputy Head of the Laboratory, Candidate of Veterinary Sciences

Скляр О.Д., зав. лабораторией, д.в.н.
Sklyarov O.D., Head of the Laboratory, Doctor of Veterinary Sciences

**Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия**
All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed,
Moscow, Russia

*E-mail: odsklyarov@vgnki.ru

АННОТАЦИЯ

Исследование посвящено сравнительному изучению чувствительности основных тестов для серологической диагностики бруцеллеза с использованием выворотки крови от иммунизированного крупного рогатого скота. Установлено, что наиболее выраженной диагностической чувствительностью обладают наборы для ИФА. Существенные различия между полученными результатами побудили вопрос относительно их специфичности и обусловили необходимость продолжения испытания этих препаратов с использованием материала от животных с разным эпизоотическим и иммунным статусом.

ABSTRACT

The study is devoted to a comparative study of the sensitivity of the main tests for the serological diagnosis of brucellosis using blood inversion from immunized cattle. It was found that ELISA kits have the most pronounced diagnostic sensitivity. Significant differences between the results obtained raised the question of their specificity and made it necessary to continue testing these drugs using material from animals with different epizootic and immune status.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Бруцеллез, крупный рогатый скот, вакцинация; серологическая диагностика, иммуноферментный анализ.

KEY WORDS

Brucellosis, cattle, vaccination; serological diagnostics, enzyme immunoassay.

Диагноз на бруцеллез животных в Российской Федерации устанавливается по результатам серологического, бактериологического и молекулярно-генетического исследований с учетом клинических и эпизоотологических данных.

Наиболее широко при диагностике этого актуального зооноза применяются серологические методы исследования, большая часть из которых является подтверждающими диагнозом [1-4].

Сложность серологической диагностики бруцеллеза обусловлена различной диагностической чувствительностью используемых реакций и возможностью получения ложноположительных результатов, что обусловлено антигенным родством липополисахарида бруцелл и других грамотрицательных бактерий, в частности *Yersinia enterocolitica*. Определенные трудности при интерпретации результатов серологического исследования крупного и мелкого рогатого скота, обусловлены поствакцинальными антителами иммунизированного и особенно реиммунизированного, соответственно, слабоагглютиногенными и агглютиногенными бруцеллезными вакцинами.

Целью настоящего исследования является сравнительное определение диагностической чувствительности ряда серологических реакций, применяемых при диагностике бруцеллеза, в том числе и зарубежного производства. Объектом исследований были образцы сыворотки крови от 110 голов крупного рогатого скота, полученных от одного из хозяйств, имеющего статус благополучного по бруцеллезу, но расположенного на территории субъекта РФ неблагополучного по бруцеллезу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе были использованы следующие серологические методы (реакции):

- роз бенгал проба (РБП);
- реакция агглютинации (РА);
- реакция связывания комплемента (РСК);
- реакция иммунодиффузии с ОПС-антигеном (РИД с ОПС-антигеном);
- иммуноферментный анализ, 1 (ИФА 1);
- иммуноферментный анализ, 2 (ИФА 2);
- иммуноферментный анализ, 3 (ИФА 3);

Образцы сыворотки крови были получены в сентябре 2020 года от взрослого маточного поголовья крупного рогатого скота, иммунизированного слабоагглютиногенной вакциной из штамма *Brucella abortus* 82 в октябре 2019 года.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы сыворотки крови от 110 голов крупного рогатого скота иммунизированных вакциной из штамма *B. abortus* 82, из хозяйства благополучного по бруцеллезу, расположенного на территории, имеющей статус «неблагополучный» по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота, были исследованы в РА, РСК, РИД, РБП и методом ИФА, с использованием трех наборов разных производителей, через 11 месяцев после введения вакцины. Исследование было выполнено в рамках реализации плана государственного эпизоотологического мониторинга территорий РФ в соответствии с РФ № 1423 от 25.12.2019 г. «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора в 2020 году для обеспечения выполнения требований Соглашения по применению санитарных и фитосанитарных мер Всемирной торговой организации» (см. Приложения, таблицы 1, 2).

Согласно табличным данным животных, положительно реагирующих на бруцеллез при серологическом исследовании в РА и РБП выявлено не было. При этом 2 образца сыворотки были исследованы с сомнительным результатом в РА и 16 образцов - в РСК. Между тем, при исследовании образцов сыворотки с помощью иммуноферментного анализа ИФА 1, ИФА 2 и ИФА 3 было зарегистрировано 66, 25 и 80 положительных результатов соответственно. Причем первично сыворотки крови были исследованы в ИФА 2 и по результатам этого тестирования помимо 25 образцов сыворотки крови, давших положительный результат, еще 28 образцов сыворотки крови были исследованы с сомнительным результатом. Согласно инструкции по применению

данного набора, в случае получения положительных результатов исследования у животных из хозяйства благополучного по бруцеллезу, проводится дополнительное исследование таких особей в основных классических реакциях, в том числе в РА, РСК, РИД и РНГА, что в целом и было выполнено. За исключением исследования образцов сыворотки крови в РНГА из-за его отсутствия. Взамен сыворотки исследовали с использованием наборов для ИФА от двух разных производителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования оказались разнородными и противоречивыми. С учетом условий проведения эпизоотологического мониторинга хозяйство, в котором были отобраны образцы сыворотки крови, должно иметь статус благополучного по бруцеллезу. Причем согласно действующим на сегодняшний день документам, регламентирующим диагностику бруцеллеза, сыворотки крови давшие сомнительный результат подлежат дополнительному исследованию в двух-трех серологических тестах, или сыворотки крови от этих животных должны быть отобраны через 30 дней после предыдущего взятия и исследованы в исходной результативной реакции и двух дополнительных тестах, подтверждающих диагноз на бруцеллез. В настоящем опыте в силу невозможности повторного получения образцов сыворотки от этих животных было выполнено первое условие, то есть сыворотки были исследованы дополнительно в РА, РСК, РИД с ОПС-антигеном и с использованием двух тест-систем для иммуноферментного анализа с выявлением в них весьма значительного количества положительно реагирующих животных. Однако факт иммунизации животных против бруцеллеза слабоагглютиногенной вакциной за 11 месяцев до отбора образцов не позволяет однозначно считать эти реакции поствакцинальными или эпизоотическими и подтверждающими диагноз. Также затруднительно говорить о установлении диагноза на бруцеллез по причине отсутствия данных о количестве ревакцинаций, выполненных в отношении исследуемых животных и невозможности проведения повторного серологического исследования этих животных с использованием образцов сыворотки крови, отобранных через 30 дней после первичного кровевзятия.

С учетом вышеизложенного представляется целесообразным рекомендовать проведение подобных комплексных исследований с обязательным учетом полных данных анамнеза используемых животных, в первую очередь их эпизоотического и иммунного статуса, с целью документального установления поствакцинальных сроков, по истечении которых возможно использование иммуноферментного анализа. Полученные при этом результаты позволят установить оптимальные сроки поствакцинального исследования крупного рогатого скота с помощью тест-систем для ИФА разных производителей.

Также следует отметить, что существует ряд диагностических иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления в сыворотках крови животных разных видов специфических антител к липополисахаридному антигену *Brucella spp.* в очень низких титрах. С учетом этого использование таких наборов при исследовании животных, иммунизированных слабоагглютиногенными и агглютиногенными бруцеллезными вакцинами может быть исключено или должно быть взвешенным, в части установления регламентированных поствакцинальных сроков и корреляции с результатами других высокочувствительных тестов.

БИБЛИОГРАФИЯ / REFERENCES

1. Наставление по диагностике бруцеллеза животных, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 29 сентября 2003 г. № 13-0502/0850.
2. «Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления ограничений, направленных на предотвращение возникновения, распространения и ликвидацию очагов

- бруцеллеза животных в российской федерации», утверждены приказом Минсельхоза России от 8 сентября 2020 №533.
3. ГОСТ 34105-2-17. Межгосударственный стандарт животные лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы. Дата введения 2018-07-01.
 4. Димов С.К. Экспресс-диагностика бруцеллеза животных с использованием ИФА/ С.К. Димов, А.С. Димова, А.А. Сизов (и др.). Методическое пособие. - Новосибирск, 2014.

ПРИЛОЖЕНИЯ / ATTACHMENTS

Таблица 1 – Результаты сравнительного серологического исследования на бруцеллез половозрелого маточного поголовья крупного рогатого скота

№ п/п	№ пробы	Результаты исследований									
		Титр		РИД	РБП	ИФА 1		ИФА 2		ИФА 3	
		РА, МЕ/см ³	РСК			ОП	результат	ОП	результат	ОП	результат
1.	40	отр.	отр.	отр.	отр.	0.248	отр.	0.315	сомн.	1.049	пол.
2.	84	отр.	отр.	отр.	отр.	1.763	пол.	0.735	сомн.	0.718	пол.
3.	60	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.208	отр.	0.948	пол.	1.157	пол.
4.	19	отр.	отр.	отр.	отр.	1.619	пол.	0.737	сомн.	0.685	пол.
5.	39	отр.	отр.	отр.	отр.	1.092	пол.	0.692	сомн.	0.420	пол.
6.	66	отр.	отр.	отр.	отр.	1.546	пол.	0.293	отр.	0.200	пол.
7.	34	отр.	отр.	отр.	отр.	0.524	пол.	0.174	отр.	1.140	пол.
8.	29	отр.	отр.	отр.	отр.	0.151	отр.	0.299	отр.	1.345	отр.
9.	74	отр.	отр.	отр.	отр.	0.171	отр.	0.253	отр.	1.326	отр.
10.	50	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.270	отр.	0.946	пол.	0.609	пол.
11.	49	отр.	отр.	отр.	отр.	0.223	отр.	0.196	отр.	0.242	пол.
12.	25	отр.	отр.	отр.	отр.	0.243	отр.	0.224	отр.	1.406	отр.
13.	62	отр.	отр.	отр.	отр.	0.640	пол.	0.260	отр.	0.880	пол.
14.	110	отр.	отр.	отр.	отр.	0.376	пол.	0.200	отр.	1.185	отр.
15.	22	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.351	пол.	1.773	пол.	1.103	пол.
16.	43	отр.	1/5 ++	отр.	отр.	1.698	пол.	2.842	пол.	0.060	пол.
17.	18	отр.	отр.	отр.	отр.	0.934	пол.	0.217	отр.	1.380	отр.
18.	54	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.150	отр.	0.926	пол.	0.451	пол.
19.	61	отр.	отр.	отр.	отр.	0.759	пол.	0.229	отр.	0.866	пол.
20.	26	отр.	отр.	отр.	отр.	0.121	отр.	0.104	отр.	1.431	отр.
21.	76	отр.	отр.	отр.	отр.	0.279	отр.	0.177	отр.	0.896	пол.
22.	35	отр.	отр.	отр.	отр.	1.974	пол.	0.534	сомн.	0.545	пол.
23.	109	отр.	отр.	отр.	отр.	0.538	пол.	0.152	отр.	1.124	пол.
24.	46	отр.	1/5 +	отр.	отр.	1.322	пол.	1.025	пол.	0.160	пол.
25.	28	отр.	отр.	отр.	отр.	1.064	пол.	0.207	отр.	1.105	пол.
26.	78	отр.	отр.	отр.	отр.	0.852	пол.	0.299	отр.	1.136	пол.
27.	48	отр.	отр.	отр.	отр.	0.218	отр.	0.133	отр.	0.848	пол.
28.	52	отр.	отр.	отр.	отр.	0.836	пол.	0.347	сомн.	0.536	пол.
29.	73	отр.	отр.	отр.	отр.	0.124	отр.	0.302	сомн.	1.207	отр.
30.	17	отр.	отр.	отр.	отр.	0.214	отр.	0.146	отр.	1.269	отр.
31.	13	отр.	отр.	отр.	отр.	0.613	пол.	2.023	пол.	0.069	пол.
32.	63	отр.	отр.	отр.	отр.	0.173	отр.	0.249	отр.	0.653	пол.
33.	82	отр.	отр.	отр.	отр.	0.319	пол.	0.170	отр.	1.600	отр.
34.	89	отр.	отр.	отр.	отр.	0.395	пол.	0.232	отр.	1.668	отр.
35.	65	отр.	отр.	отр.	отр.	0.225	отр.	0.469	сомн.	0.773	пол.
36.	27	отр.	1/5 +	отр.	отр.	1.073	пол.	1.893	пол.	0.062	пол.
37.	23	отр.	отр.	отр.	отр.	0.376	пол.	0.907	пол.	0.273	пол.
38.	95	отр.	отр.	отр.	отр.	0.258	отр.	0.169	отр.	0.309	пол.
39.	42	отр.	отр.	отр.	отр.	0.598	пол.	0.519	сомн.	0.412	пол.
40.	93	отр.	отр.	отр.	отр.	0.359	пол.	0.355	сомн.	0.722	пол.
41.	102	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.375	пол.	1.882	пол.	0.082	пол.
42.	59	отр.	отр.	отр.	отр.	0.805	пол.	1.116	пол.	0.513	пол.
43.	87	отр.	отр.	отр.	отр.	0.377	пол.	1.358	пол.	0.118	пол.
44.	98	отр.	отр.	отр.	отр.	0.459	пол.	1.203	пол.	0.415	пол.
45.	58	отр.	отр.	отр.	отр.	0.202	отр.	0.323	сомн.	0.307	пол.
46.	47	отр.	отр.	отр.	отр.	0.373	пол.	0.079	отр.	1.492	отр.
47.	55	отр.	отр.	отр.	отр.	0.833	пол.	0.177	отр.	0.887	пол.
48.	51	отр.	отр.	отр.	отр.	0.139	отр.	0.234	отр.	0.367	пол.
49.	6	отр.	отр.	отр.	отр.	0.302	пол.	0.737	сомн.	0.884	пол.
50.	7	отр.	отр.	отр.	отр.	0.385	пол.	0.340	сомн.	0.540	пол.
51.	8	отр.	отр.	отр.	отр.	0.311	пол.	0.225	пол.	0.984	пол.
52.	67	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.401	пол.	1.443	пол.	0.859	пол.

53.	12	отр.	отр.	отр.	отр.	0.373	пол.	0.190	отр.	0.104	пол.
54.	94	отр.	отр.	отр.	отр.	0.310	пол.	0.157	отр.	0.625	пол.
55.	21	отр.	отр.	отр.	отр.	0.394	пол.	0.673	сомн.	1.163	отр.
56.	5	отр.	отр.	отр.	отр.	0.155	отр.	0.307	сомн.	1.054	пол.
57.	83	отр.	отр.	отр.	отр.	1.732	пол.	0.729	сомн.	0.601	пол.
58.	64	отр.	отр.	отр.	отр.	0.167	отр.	0.299	отр.	0.366	пол.
59.	68	отр.	отр.	отр.	отр.	0.282	отр.	0.245	отр.	0.967	пол.
60.	14	отр.	отр.	отр.	отр.	0.360	пол.	0.204	отр.	1.641	отр.
61.	44	отр.	1/5 +	отр.	отр.	1.351	пол.	1.779	пол.	0.070	пол.
62.	24	отр.	отр.	отр.	отр.	0.186	отр.	0.328	сомн.	0.568	пол.
63.	106	отр.	отр.	отр.	отр.	2.013	пол.	0.332	сомн.	1.196	отр.
64.	101	отр.	отр.	отр.	отр.	0.201	отр.	0.459	сомн.	0.714	пол.
65.	1	50	отр.	отр.	отр.	1.531	пол.	0.215	отр.	0.631	пол.
66.	9	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.456	пол.	1.366	пол.	0.435	пол.
67.	57	отр.	отр.	отр.	отр.	1.530	пол.	0.409	сомн.	0.430	пол.
68.	3	отр.	отр.	отр.	отр.	0.172	отр.	0.269	отр.	0.803	пол.
69.	38	отр.	отр.	отр.	отр.	0.248	отр.	0.223	отр.	1.274	отр.
70.	33	отр.	отр.	отр.	отр.	0.479	пол.	0.213	отр.	0.987	пол.
71.	80	отр.	отр.	отр.	отр.	0.181	отр.	0.153	отр.	1.321	отр.
72.	99	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.260	отр.	1.031	пол.	0.591	пол.
73.	2	отр.	отр.	отр.	отр.	0.320	пол.	0.295	отр.	1.454	отр.
74.	108	отр.	1/5 ++	отр.	отр.	0.300	пол.	0.275	отр.	1.258	отр.
75.	16	отр.	отр.	отр.	отр.	0.414	пол.	0.306	сомн.	1.175	отр.
76.	31	отр.	отр.	отр.	отр.	0.305	пол.	0.238	отр.	0.899	пол.
77.	11	отр.	отр.	отр.	отр.	1.759	пол.	0.154	отр.	1.256	отр.
78.	53	отр.	отр.	отр.	отр.	1.190	пол.	0.218	отр.	0.804	пол.
79.	36	отр.	отр.	отр.	отр.	2.109	пол.	0.337	сомн.	1.105	пол.
80.	105	отр.	отр.	отр.	отр.	1.749	пол.	0.939	пол.	0.261	пол.
81.	20	отр.	отр.	отр.	отр.	0.345	пол.	0.299	отр.	0.487	пол.
82.	30	отр.	1/5 +	отр.	отр.	0.519	пол.	2.132	пол.	0.074	пол.
83.	79	отр.	отр.	отр.	отр.	0.583	пол.	0.234	отр.	1.095	пол.
84.	4	отр.	отр.	отр.	отр.	0.148	отр.	0.280	отр.	0.494	пол.
85.	90	отр.	отр.	отр.	отр.	0.194	отр.	0.248	отр.	1.227	отр.
86.	72	отр.	1/5 ++	отр.	отр.	1.705	пол.	2.299	пол.	0.067	пол.
87.	71	отр.	отр.	отр.	отр.	0.848	пол.	0.212	отр.	1.358	отр.
88.	100	отр.	отр.	отр.	отр.	1.452	пол.	0.366	сомн.	0.635	пол.
89.	56	отр.	отр.	отр.	отр.	0.163	отр.	0.202	отр.	1.701	отр.
90.	92	отр.	отр.	отр.	отр.	0.235	отр.	0.286	отр.	1.474	отр.
91.	107	отр.	отр.	отр.	отр.	0.592	пол.	0.187	отр.	1.736	отр.
92.	10	отр.	отр.	отр.	отр.	0.127	отр.	0.174	отр.	0.884	пол.
93.	91	отр.	отр.	отр.	отр.	0.799	пол.	0.653	сомн.	0.376	пол.
94.	45	отр.	отр.	отр.	отр.	0.196	отр.	0.524	сомн.	0.291	пол.
95.	37	отр.	отр.	отр.	отр.	0.895	пол.	0.227	отр.	1.731	отр.
96.	69	отр.	отр.	отр.	отр.	0.093	отр.	0.218	отр.	1.418	отр.
97.	85	отр.	отр.	отр.	отр.	0.357	пол.	0.397	сомн.	0.699	пол.
98.	75	отр.	отр.	отр.	отр.	0.809	пол.	1.803	пол.	0.069	пол.
99.	41	отр.	отр.	отр.	отр.	0.097	отр.	0.154	отр.	0.834	пол.
100.	96	отр.	отр.	отр.	отр.	0.233	отр.	0.257	отр.	0.243	пол.
101.	104	50	отр.	отр.	отр.	0.352	пол.	0.861	сомн.	0.181	пол.
102.	88	отр.	отр.	отр.	отр.	0.288	отр.	1.490	пол.	0.088	пол.
103.	15	отр.	отр.	отр.	отр.	0.219	отр.	0.301	сомн.	1.234	отр.
104.	32	отр.	1/5 +++	отр.	отр.	1.658	пол.	2.092	пол.	0.074	пол.
105.	77	отр.	отр.	отр.	отр.	0.528	пол.	1.731	пол.	0.072	пол.
106.	81	отр.	отр.	отр.	отр.	0.167	отр.	0.260	отр.	1.641	отр.
107.	103	отр.	отр.	отр.	отр.	0.327	пол.	0.154	отр.	1.068	пол.
108.	86	отр.	отр.	отр.	отр.	0.175	отр.	0.254	отр.	1.376	отр.
109.	70	отр.	отр.	отр.	отр.	0.113	отр.	0.270	отр.	1.036	пол.
110.	97	отр.	отр.	отр.	отр.	0.350	пол.	1.271	пол.	0.369	пол.
КОНТРОЛИ РЕАКЦИЙ											
NS	-	отр.	отр.	отр.	отр.	0.119	отр.	0.063	отр.	1.934	отр.
PS	-	1/100 ++++	1/80 ++++	пол.	пол.	2.004	пол.	2.686	пол.	0.118	пол.

Таблица 2 – Свод результатов сравнительного серологического исследования на бруцеллез половозрелого маточного поголовья крупного рогатого скота

Оценка, метода (реакции)	Результаты исследований						
	РА	РСК	РИД	РБП	ИФА 1	ИФА 2	ИФА 3
отр.	108	94	110	110	44	57	30
сомн.	2	16	-	-	-	28	-
пол.	-	-	-	-	66	25	80