

УДК 619:578.835.1

К ВОПРОСУ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО И МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА

Нургазиев Рысбек Зарылдыкович, Кельдибекова Замира Садыбакасовна (0000-0002-5943-7368)¹, Джетигенов Эльмурат Алсеитович (0000-0001-7690-8849)¹, Турсумбетов Мамбеталы Садывалыевич (0009-0004-7115-4389)², Орозов Жайлообек Чоконович (0009-0001-1958-5753)², Абдылдаева Роза Тынайбековна (0000-0002-9794-9903)¹

¹Кыргызский национальный аграрный университет, г. Бишкек, Кыргызстан

²Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии

Аннотация: целью данной работы является изыскание метода дифференциальной поствакцинальной диагностики бруцеллеза. Как известно, в системе современных мер борьбы с бруцеллёзом решающее значение имеет диагностика. Однако использование живых вакцины *Br. abortus* шт.-19 и *Br. Melitensis* шт. Rev-1 при профилактике бруцеллёза крупного и мелкого рогатого скота может создавать определенные трудности при постановке серологических реакций с дифференциацией у поствакцинальных животных заболевания. В статье приводятся эмпирические данные эффективности дифференциальной диагностики эпизоотического штамма бруцеллёза крупного и мелкого рогатого скота от вакцинного штамма с применением в реакции иммунодиффузии с использованием О-полисахаридного антигена, кольцевой реакции молока и роз бенгал проба с молоком. Проведенные серологические исследования с использованием данных тестов на 90 день после вакцинации показали серонегативность у иммунизированных животных. Данный метод исследования позволяют делать достоверное заключение о благополучии вакцинированных животных по бруцеллёзу.

Ключевые слова: крупный и мелкий рогатый скот, специфическая профилактика, живые вакцины, дифференциальная диагностика, РБП, РА, РСК, РИД с О-ПС антигеном, КРМ, РБПМ

БОДО МАЛДЫН ЖАНА КОЙ-ЭЧКИНИН БРУЦЕЛЛЕЗУНУН ДИФФЕРЕНЦИАЛДЫК ДИАГНОСТИКАСЫНДАГЫ КӨЙГӨЙЛӨР

Нургазиев Рысбек Зарылдыкович, Кельдибекова Замира Садыбакасовна (0000-0002-5943-7368)¹, Джетигенов Эльмурат Алсеитович (0000-0001-7690-8849)¹, Турсумбетов Мамбеталы Садывалыевич (0009-0004-7115-4389)², Орозов Жайлообек Чоконович (0009-0001-1958-5753)², Абдылдаева Роза Тынайбековна (0000-0002-9794-9903)¹

¹Кыргыз улуттук агрардык университети

²Кыргыз ветеринардык илимий-изилдөө институту

Аннотация: бул иштин максаты бруцеллезге каршы эмдөөдөн кийинки дифференциалдык диагностиканын методун табуу болуп саналат. Белгилүү болгондой, бруцеллезге каршы күрөшүү боюнча заманбап чаралар системасында диагностика чечүүчү мааниге ээ. Бирок, тирүү *Br* колдонуу. аборт шт.-19 жана *Br. Melitensis* даана. Бодо малдын жана майда мүйүздүү малдын бруцеллезунун алдын алууда Rev-1 эмдөөдөн кийинки жаныбарлардын ылаңын дифференциациялоо менен

серологиялык изилдөөлөрдү жүргүзүүдө белгилүү кыйынчылыктарды жаратышы мүмкүн. Макалада O-полисахарид антигенин колдонуу менен иммунодиффузия реакциясын, сүттүн шакекче реакциясын жана сүт менен роза бенгал сынамасын колдонуу менен вакцина штаммынан бодо малдын жана майда мүйүздүү малдын бруцеллезунун эпизоотиялык штаммынын дифференциалдык диагностикасынын натыйжалуулугу боюнча эмпирикалык маалыматтар келтирилген. Эмдөөдөн кийин 90-күнү тесттин маалыматтарын колдонуу менен серологиялык изилдөөлөр иммунизацияланган жаныбарларда серонегативдүүлүктү көрсөттү. Бул изилдөө методу бруцеллезго каршы эмделген малдын саламаттыгы жөнүндө ишенимдүү тыянак чыгарууга мүмкүндүк берет.

Өзөктүү сөздөр: бодо мал жана кой-эчки, спецификалык профилактика, тируу вакциналар, дифференциалдык диагностика, РБП, РА, РСК, РИД O-ПС антиген менен, КРМ, РБПМ

TO THE QUESTION OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS CATTLE AND SMALL CATTLE

Nurgaziev Rysbek Zaryldykovich, Keldibekova Zamira Sadybakasovna (0000-0002-5943-7368)¹, Jetigenov Elmurat Alseitovich (0000-0001-7690-8849)¹, Tursumbetov Mambetaly Sadyvalyevich (0009-0004-7115-4389)², Orozov Zhailoobek Choconovich (0009-0001-1958-5753)², Abdyldaeva Roza Tynaibekovna (0000-0002-9794-9903)¹

¹Kyrgyz national agrarian university

²Kyrgyz scientific research institute of veterinary medicine

Annotation. *The purpose of this work is to find a method for differential post-vaccination diagnosis of brucellosis. As you know, in the system of modern measures to combat brucellosis, diagnosis is of decisive importance. However, the use of live Br. abortus pcs.-19 and Br. Melitensis pcs. Rev-1 in the prevention of brucellosis in cattle and small ruminants can create certain difficulties in setting up serological tests with differentiation of the disease in post-vaccination animals. The article provides empirical data on the effectiveness of differential diagnosis of an epizootic strain of brucellosis in cattle and small ruminants from a vaccine strain using an immunodiffusion reaction using an O-polysaccharide antigen, a ring reaction of milk and a rose bengal test with milk. Serological studies using test data on day 90 after vaccination showed seronegativity in immunized animals. This research method allows us to make a reliable conclusion about the well-being of vaccinated animals against brucellosis.*

Key words: *Cattle and small cattle, specific prophylaxis, live vaccines, differential diagnosis, RBT, AR, CBR, FPA with O-PS antigen, MRR, RBTM*

1. Введение

Бруцеллёз сельскохозяйственных животных наносит огромный ущерб животноводству во многих странах и представляет серьёзную опасность для здоровья людей. Сложность борьбы с ним заключается в широкой территориальной

распространенности болезни, в восприимчивости домашних и диких животных.

В системе современных мер борьбы с бруцеллёзом решающее значение имеет диагностика. Выявление очагов инфекции, определение степени распространения

заболевания и организации противобруцеллёзных мероприятий могут быть выполнены только на основе достоверных и оперативных методов диагностики.

От того, насколько своевременно и полно будут выявлены инфицированные бруцеллёзом животные, зависят размеры экономического благополучия владельцев скота, безопасное использование животноводческих продуктов, а также охрана людей от заражения этим опасным заболеванием.

Борьба с бруцеллёзом животных в Кыргызской Республике является одной из актуальных проблем для ветеринарной науки и практики. Являясь широко распространенной инфекцией, бруцеллёз наносит большой экономический ущерб отраслям животноводства, который складывается из массовых аборт и яловости инфицированных животных, снижением жизнеспособности приплода, продуктивности животных, а также издержек на проведение профилактических мероприятий. Наряду с экономическим ущербом бруцеллёз создаёт реальную угрозу здоровью людей. Поэтому борьба с этой инфекцией приобретает большую социальную и медицинскую значимость.

По данным Республиканского центра карантинных и особо опасных инфекций ежегодно регистрируются острые формы бруцеллёза среди людей. При исследовании гемокультуры заболевших людей, установлен тип *Br. Melitensis* – наиболее вирулентный тип возбудителя бруцеллёза.

Исследования отечественных ученых [1, 2] показывают, что в Кыргызстане среди сельскохозяйственных животных имеют распространение возбудители бруцеллеза таких видов как *Br. abortus* и *Br. Melitensis*. В своей работе авторы с использованием молекулярно биологических исследований отмечают, что штамм *Br. Melitensis* биовары 2-3 регистрировались среди животных Нарынской, Иссык-Кульской, Чуйской, Джалал-Абадской областей. В отличие от них штамм *Br. melitensis* биовар 1 и *Br. abortus*

биовар 1 зарегистрированы в единичных случаях. У обоих типов возбудителя биовар 1 оказался редким.

В работе Нургазиева Р.З. [3] приведены сведения о распространении бруцеллеза и среди яков. Отмечается, что типизация бруцелл у инфицированных яков проведена впервые в Кыргызской Республике и основным видом в крови инфицированных яков вид бруцелл *Br. abortus*.

Нургазиев Р.З. в своей работе посвященной идентификации бруцелл при помощи ПЦР [4] отмечает, что впервые в Кыргызстане бруцеллез диагностирован до видовой принадлежности возбудителей бруцеллеза. При исследовании больных бруцеллезом коров, авторами доказано с использованием молекулярно биологических исследований о перекрестном заражении коров возбудителями *Br. Melitensis* и *Br. Ovis*.

Одним из эффективных мер борьбы с бруцеллёзом для создания иммунного статуса среди здоровых животных является специфическая вакцинопрофилактика. Из вакцинных препаратов в нашей республике широкое применение получили вакцины из штаммов *Br. abortus* шт.-19 и *Br. Melitensis* шт. Rev-1.

Вместе с тем широкое использование вакцин создало значительные сложности в интерпретации результатов диагностических исследований. Иммунизация животных вызвало проблему в распознавании больных бруцеллёзом животных от вакцинированных, что создает проблему объективной оценки эпизоотической обстановки в стаде.

Цель исследований - изыскать метод дифференциальной поствакцинальной диагностики бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота.

2. Материалы и методы исследования

Проведены общепринятые эпизоотологические и серологические методы исследований, с использованием лабораторного оборудования кафедры

инфекционных и инвазионных болезней животных ФВБ КНАУ.

Для дифференциации поствакцинальных антител от инфицированных сывороток крови крупного и мелкого рогатого скота был использован О-ПС (О-полисахаридный) антиген, в реакции иммунной диффузии (РИД). Активность РИД, КРМ (кольцевой реакции молока) и разработанной нами РБПМ (розбенгал пробы с молоком) изучили на 2 группах животных, вакцинированных шт.19 подкожно полной дозой и Рев-1 конъюнктивально малой дозой.

3. Результаты исследования

Проведенные исследования крови в опытных группах животных показали, что у вакцинированных животных шт.19 через 60 дней после вакцинации, при которой была использована реакция иммунодиффузии с О-полисахаридным антигеном (РИД О-ПС), в сыворотке крови антитела на бруцеллезный вакцинный антиген отсутствовали (см. таб.№1). В таблице №1 представлена разница показателей результатов серологических реакций иммунодиффузии (помечено синим цветом)

и классического метода в реакциях розбенгал пробы (РБП), реакции агглютинации (РА) и реакции связывания комплемента (РСК). В то время как общепринятые классические методы диагностики бруцеллёза, как РБП, РА, РСК дают положительные результаты до 5-6 месяца. При классическом методе исследования снижение титра антител наблюдается с третьего месяца вакцинации и на шестой месяц антитела обнаруживаются в единичных случаях с низкими титрами.

Проведенные исследования сыворотки крови мелкого рогатого скота, вакцинированных вакциной шт.Br. Melitensis Rev-1, спустя 60 дней после вакцинации, с использованием РИД О-ПС антигеном, показали отсутствие бруцеллезного антигена. В то время, как общепринятые классические методы диагностики бруцеллёза дают положительные реакции на вакцинный антиген и через 60,90,120, 150 дней (таблица 2).

Проведенные исследования показывают что, РИД О-полисахаридный антиген более эффективен для дифференциальной диагностики вакцинного и эпизоотического штаммов в реакции иммунной диффузии после двух

Таблица 1. Результаты диагностических исследований вакцинированных телят с применением РИД с О-ПС антигеном в сравнение с РБП, РА, РСК.

Сроки исследования (дней после вакцинации)	Иммунизированные вакциной штамм 19											
	РИД			РБП			РА			РСК		
	иссл.п.роб	#	%	иссл.	#	%	иссл.	#	%	иссл.	#	%
60	35	-	0	35	35	100	35	35	100	35	35	100
90	35	-	0	35	35	100	35	28	80	35	30	86
120	35	-	0	35	25	71	35	26	74	35	26	74
150	35	-	0	35	18	51	35	20	57	35	17	49
180	35	-	0	35	5	14	35	3	9	35	2	6

Источник: Составлено авторами

Таблица 2. Результаты диагностических исследований вакцинированных Рев-1 животных с применением РИД с О-ПС антигеном в сравнение с РБП, РА, РСК.

Сроки исслед. дни	Вакцинированных Рев-1											
	РИД			РБП			РА			РСК		
	иссл.	#	%	иссл.	пол ож	%	иссл.	пол ож	%	иссл.	пол ож	%
60	35	-	0	35	33	94	35	30		35	33	94
90	35	-	0	35	26	74	35	22	63	35	22	63
120	35	-	0	35	20	57	35	20	57	35	19	54
150	35	-	0	35	9	26	35	8	23	35	5	14
180	35	-	0	35	2	6	35	-	0	35	-	0

Источник: Составлено авторами

Таблица 3. Исследование молока коров, иммунизированных вакциной штамм 19.

Сроки исслед, дней	КРМ		РБПМ	
	иссл.	#	иссл.	#
90	28	3	28	2
120	28	-	28	-
150	28	-	28	-

Источник: Составлено авторами

месяцев вакцинации.

Кроме исследования крови были проведены исследования молока у вакцинированных противобруцеллезной вакциной шт.19 животных. При исследовании молока на наличие бруцелл использовали общепринятую методику КРМ и РБПМ собственной разработки. Результаты исследований представлены в таблице №3. При этом РБПМ представляет собой реакцию для прижизненной диагностики бруцеллёза среди лактирующих животных, где объектом исследования служит цельное молоко, которое в смеси с равным количеством 6,8%-ного раствора гидрокарбоната

натрия и антигена для РБП, при наличии бруцеллёзных антител даёт положительную реакцию. Из таблицы 3 видно, что в молоке иммунизированных коров антитела на бруцеллезную вакцину исчезают на третий месяц после вакцинации.

Полученные данные говорят о том, для дифференциальной диагностики вакцинного штамма от эпизоотического бруцеллёза можно использовать КРМ и РБПМ.

4. Дискуссия

Использование живых вакцин Br. abortus шт.-19 и Br. Melitensis шт. Rev-1 в профилактике бруцеллёза

крупного и мелкого рогатого скота, создает определенные проблемы с дифференциацией результатов поствакцинальных реакций при серологических исследованиях. Использование таких вакцин не позволяет отличать больных бруцеллёзом животных от иммунизированных и дать объективную оценку эпизоотической обстановки.

К настоящему времени в вопросах, связанных с диагностикой бруцеллёза, мировая наука добилась значительных успехов. В научных трудах многих авторов К.В.Шумилова, В.И.Кима, П.К.Аракелян, Т.Сайдулдина и др.) освещены вопросы диагностики и дифференциальной диагностики бруцеллёза.

Широко применяются классические методы серологической диагностики бруцеллеза, такие как РСК, РПБ и ИФА, имеют место применения РА, КРМ, РИД и РНГ. Однако в литературных источниках имеются сведения о неэффективности РИД в диагностике бруцеллеза. Так по данным Новицкого А.С. (2016) РИД эффективна только в близкие сроки после вакцинации на фоне достаточно высокого иммунитета по стаду. В стадах неиммунного скота, где регистрировали истинно больных бруцеллезом животных, эта реакция не позволяла выявить всех зараженных животных, являясь лишь индикатором наличия этой инфекции в стаде.

Имеются также сообщения о проблемах дифференциальной диагностики, так канадские ученые [14] отмечают, что обнаружение антител к О-полисахариду (О-ПС) клеточной стенки бактерий бруцелл, используется в диагностике этого заболевания, и эта же молекула обеспечивает важную защитную эффективность применяемых в настоящее время ветеринарных цельноклеточных вакцин. Это создало парадокс: хотя *Brucella* О-ПС придает вакцинам защитную эффективность, его присутствие приводит к схожим профилям антител у инфицированных и вакцинированных животных.

В тоже время многие исследователи утверждают о значимости РИД в диагностике бруцеллеза [6,7]. В работе Морозова Н. А. (2002) доказана эффективность РИД с О-ПС антигеном в качестве теста для диагностики бруцеллеза овец в условиях применения специфической профилактики.

Также Бондарев Е.Г.(2017) провел испытание тестов РИД, РБП, РНГА, РА и РСК на большом поголовье мелкого и крупного рогатого скота при этом утверждает ведущую роль РИД в качестве индикатора степени эпизоотической опасности животных (как при естественном бруцеллезе, так и на фоне их иммунизации различными противобруцеллезными вакцинами).

Ситуацию с реакцией иммунодиффузии в диагностике Чекишев В.М. с соавторами (2010) объясняет тем, что у животных зараженных вирулентными штаммами бруцелл происходит синтез основных преципитирующих антител (выявляемых в РИД), а при сенсibilизации слабовирулентными штаммами (включая вакцинные) – нет. Следовательно, данный метод (РИД) вполне приемлем для дифференциальной диагностики вакцинного и эпизоотического штамма.

В связи с этим многие исследователи приходят к выводу [8] что, одной из главных задач поствакцинального мониторинга бруцеллёза и обеспечения эпизоотического и эпидемиологического благополучия касательно данной инфекции остаётся разработка средств и методов дифференциации вакцинированного от инфицированного. В связи с этим в настоящее время актуальны вопросы по усовершенствованию поствакцинальной диагностики бруцеллёза, и разработке систем профилактических и оздоровительных мероприятий от бруцеллёза крупного и мелкого рогатого скота.

5. Вывод

1. Проведенные исследования показывают, что РИД с О-ПС антигеном обладает специфичностью к бруцеллезному

антигену и эффективен в дифференциальной диагностике вакцинного от эпизоотического штамма. При данном методе реакция на преципитирующие антитела не срабатывают в связи с его отсутствием. В связи с этим РИД с О-ПС антигеном рекомендуем использовать в дифференциальной диагностике вакцинированных животных (крупный и мелкий рогатый скот) от зараженных бруцеллезом животных.

2. Для дифференциальной диагностики вакцинного штамма от эпизоотического бруцеллёза среди молочного скота рекомендуем использовать КРМ и РБПМ. При данном методе исследования молока у лактирующих коров на третий месяц после вакцинации отсутствовала реакция на вакцинный антиген, что является показателем благополучия.

6. Использованная литература

1. Чегиров С.Б., Нургазиев Р.З., Келдибекова З.С., Турсумбетов М.С.. Типизация *Brucella Melitensis* и *Abortus* до видовой принадлежности с применением видоспецифических праймеров. 2014. <https://elibrary.ru/contents.asp?id=34171865>
2. Нургазиев Р.З., Чегиров С.Б., Джетигенов Э.А.. Выявление бруцелла вида *abortus* с применением видоспецифических праймеров. Вестник КНАУ 2018 № 3 стр. 61-61. ISSN: 1694-6286
3. Турсумбетов М.С., Нургазиев Р.З., Чегиров С.Б., Келдибекова З.С.. Определение вида бруцелл среди яков методом полимеразной цепной реакции. 2019. <https://elibrary.ru/contents.asp?id=41040132>
4. Нургазиев Р.З., Чегиров С.Б., Келдибекова З.С., Турсумбетов М.С. Идентификация бруцелл до вида при помощи классической пцр. Вестник КНАУ 2018 № 5. <https://elibrary.ru/contents.asp?id=48504285>
5. Аракелян П.К., Барабанова Е.Б., Димов С.К., Димов А.С. и др. Проблемы специфической профилактики бруцеллёза крупного рогатого скота с использованием

живых слабоагглютиногенных вакцин. Ветеринария, 2012.

6. Аракелян П.К., Янченко Т.А., Разницына Г.В. и др. Поиск рациональных схем специфической профилактики бруцеллёза крупного рогатого скота. Ветеринария, 2016.

7. А.А. Новицкий, В.И. Околелов. Роль реакции иммунодиффузии с о-полисахаридным антигеном в поствакцинальной диагностике бруцеллеза. Вестник ОмГАУ № 4 (24) 2016

8. Чекишев В.М., Колганова О.А. Средства и методы дифференциальной поствакцинальной серологической диагностики бруцеллёза животных. Новосибирск, 2010.

9. Аракелян П.К., Димова А.С., Руденко А.В. и др. Роль О-полисахаридного антигена, изготовленного из *Br. Melitensis* в дифференциальной диагностике бруцеллёза мелкого рогатого скота. Ветеринария и кормление, 2021.

10. Морозова Н. А. Значение РИД с О-полисахаридным антигеном при поствакцинальной диагностике бруцеллеза овец, Дисс. на сосик. к.в.н. Омск 2002.

11. Бондарев, Евгений Геннадьевич. Сравнительное изучение диагностической эффективности О-ПС антигенов, изготовленных из штаммов различных видов бруцелл, в РИД при бруцеллезе животных. Дис.на соиск. к.в.н. г.Омск 2017.

12. В. А. Коршенко, И. А. Щипелева, О.Ф.Кретенчук, Е.И.Марковская. Прошлое, настоящее, перспективы и проблемы совершенствования специфической профилактики бруцеллёза. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2021-12-3-12-21>

13. Свод инструкций по борьбе с особо опасными и социально значимыми болезнями животных. / Раимбеков Д., Нургазиев Р.З., Узакбаев К.Т. и др. – Б. «Алтын Принт», 2013.

14. БРУЦЕЛЛЕЗ. Число новых случаев заболеваний инфекционными и

паразитарными болезнями. Национальный статистический комитет Кыргызской Республики. 2019. stat.kg/ru/statistics/download/dynamic/581/.

15. *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East. / FAO technical meeting in collaboration with WHO and OIE/ Rome. 2009 .

16. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). OIE. 2019.

17. Методика дифференциации поствакцинальных антител бруцеллеза <https://www.activestudy.info/metodika-differenciacii-postvakcinalnyx-antitel-brucelleza-u-krupnogo-rogatogo-skota/>

18. Бруцеллез. <http://www.vetdoctor.info/content/category/8/23/84/>

19. David R. Bundle* and John McGiven. Brucellosis: Improved Diagnostics and Vaccine Insights from Synthetic Glycans. <https://doi.org/10.1021%2Facs.accounts.7b00445>