

нью, затруднением дыхания, головными болями, слабостью. У девушки, покусанной в области кистей рук и бедер, наблюдали боли в местах укуса по ходу нервных стволов, появление жажды, сухость во рту, водобоязнь. Им своевременно не была оказана антирабическая помощь, исход был смертельный через 36-48 дней после полученных травм. В последующие годы покусанные или ослюенные лица, получившие в больнице своевременную антирабическую помощь, путем введения антирабической вакцины и антиглобулина, выздоравливали.

**Заключение.** Таким образом, бешенство может представлять угрозу как для животных, так и для людей на эпизоотически неблагополучных территориях. Эпизоотический процесс в дикой фауне юго-восточного региона РФ поддерживается лисами и волками, которые в благоприятных экологических условиях для их жизнедеятельности выступают как основной природный резервуар вируса болезни. В связи с этим, с целью предупреждения бешенства представляется необходимым проведение постоянного эпизоотологического и эпидемиологического мониторинга на территориях с природными

очагами болезни, экологический контроль за угрожаемыми территориями.

#### Библиографический список

1. Ботвинкин А. Д. Отчет о результатах обследования территории Закаменского и Джидинского районов Республики Бурятия с целью определения путей заноса вируса бешенства и объема мероприятий, направленных на предотвращение дальнейшего распространения инфекции среди животных /А. Д. Ботвинкин, Д. Б. Вержужский. – Иркутск, 2011. – С. 11-14.

2. Дудников С. А. Особенности проявления бешенства в России /Биолого-эколог. проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии с.-х. животных // Мат-лы междунар. науч.-практ. конф. – Покров: ВНИИВВиМ, 2002. –С. 107-110.

3. Инфекционная патология животных / Под ред. А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьева, Е. А. Непоклонова, Е. С. Воронина. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 1. – С. 299-302.

4. Селезнева С. К. Анализ эпизоотической и эпидемиологической обстановки по бешенству и ее факторов в Республике Тыва /Годовой отчет, 2012. – С.53-64.

5. Стариков П. С. Охотничье-промысловые звери и птицы Бурятии. – Улан-Удэ: Бурят. кн. изд-во, 1978. – С. 14-16.

УДК 619: 616: 981.42

**Т. Г. Попова<sup>1</sup>, А. А. Новицкий<sup>2</sup>, С. К. Димов<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>ГНУ Всероссийский НИИ бруцеллеза и туберкулеза животных Россельхозакадемии, Омск

<sup>2</sup>Институт ветеринарной медицины и биотехнологии «ФГБОУ ВПО Омский ГАУ имени П. А. Столыпина», Омск

<sup>3</sup>ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, Краснообск  
E-mail: vniibtg@rambler.ru

### ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАДИАЛЬНОЙ ИММУНОДИФфуЗИИ В ПОСТВАКЦИНАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, бруцеллез, дифференциальная диагностика, радиальная иммуно-диффузия (РИД), специфическая профилактика, вакцина из штамма *Brucella abortus* 82, химическая противобруцеллезная вакцина.

*Представлены результаты анализа серологических исследований сыворотки крови от коров, многократно иммунизированных вакциной из штамма *Brucella abortus* 82 и хи-*

мической противобруцеллезной вакциной в стадах с различной эпизоотической ситуацией и иммунным фоном в период с 1992 по 2011 г.

В благополучных по бруцеллезу стадах не было выделено реагирующих в РИД ни после многократной реиммунизации вакциной из штамма *B. abortus* 82, ни после многократной реиммунизации химической вакциной, ни после сочетанного применения вакцины из штамма *B. abortus* 82 двукратно с последующей иммунизацией химической вакциной.

На благополучных общественных фермах, находившихся в угрожаемой зоне, при исследовании через 8-12 месяцев после иммунизации вакциной из штамма *B. abortus* 82 было выделено 2,7% животных, реагирующих положительно в РИД. В то же время в личных подворьях на этой же угрожаемой территории у неиммунного поголовья крупного рогатого скота положительные реакции одновременно по 3 тестам (РА+РСК+РИД) были зарегистрированы у 102 коров. РА у 191 и РСК у 161 животного, что свидетельствовало о низкой чувствительности РИД с О-ПС- антигеном.

В оздоравливаемых стадах РИД эффективна только в близкие сроки после вакцинации (штамм 82, химическая вакцина) на фоне достаточно высокого иммунитета по стаду.

**T. Popova<sup>1</sup>, A. Novitsky<sup>2</sup>, S. Dimov<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of animal brucellosis and tuberculosis of Russian Academy of Agricultural Sciences, Omsk

<sup>2</sup>Institute of veterinary medicine and biotechnology of FSBEI HPT «Omsk State Agrarian University named after P. Stolypin», Omsk

<sup>3</sup>Institute of experimental veterinary of Siberia and Far East, Novosibirsk

## THEORETICAL BASIS AND PRACTICAL VALUE OF RADIAL IMMUNODIFFUSION USING IN POSTVACTINAL DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS

**Key words:** Cattle, brucellosis, differential diagnosis, the radial immunodiffusion (RID), specific prophylaxis, the vaccine strain of *B. abortus* 82, chemical antibrucellosis vaccine.

Results of the analysis of serologicheskoy researches of serum of blood from cows, repeatedly immunizirovanny by a vaccine from piece of *Brucella abortus* 82 and a chemical protivobrutselezny vaccine in herds with a various epizooticheskoy situation and an immune background during the period from 1992 to 2011 are presented.

In safe herds on a brucellosis it was not allocated reacting in READ after a repeated reimmunizatsiya with a vaccine from *B. abortus* 82, neither after a repeated reimmunizatsiya a chemical vaccine, nor after sochetanny application of a vaccine from piece 82 on telka twice with the subsequent immunization by a chemical vaccine.

On the safe public farms which were in a threatened zone, at research in 8-12 months after immunization by a vaccine from piece 82- 2,7 % of the animals reacting positively in READ were allocated. At the same time in personal farmsteads in the same threatened territory at not immune number of cattle positive reactions at the same time according to the 3rd tests (РА+РСК+РИД) were registered at 102 cows. RA at 191 and RSK at 161 animal that testified to low sensitivity READ with About - PS - an anti-genome.

In revitalized herds READ it is effective only in close terms after vaccination (piece 82, a chemical vaccine) against rather high immunity on herd. So in close terms (1-3 months) 8,4 % of sick cattle, against 1,0 % in the remote terms (6-12 months) were allocated.

**Введение.** Смена двадцатилетнего периода использования в специфической профилактике бруцеллеза агглютиногенного штамма *Brucella abortus* 19 на слабоагглютиногенный штамм *Brucella abortus* 82 сыграла исключительную роль в оздоровления Российской Федерации от

бруцеллеза крупного рогатого скота. Этому во многом способствовала появившаяся возможность осуществлять раннюю поствакцинальную диагностику бруцеллеза в фазе достаточного выраженного иммунитета (не менее 50% иммунных).

Однако при проведении оздорови-

тельных мероприятий возникла проблема, связанная с экономическим ущербом от убоя здоровых животных, реагирующих на вакцину, что требовало совершенствования методов дифференциальной диагностики бруцеллеза.

Санитарными и ветеринарными правилами (1996) была предусмотрена дифференциация больного и вакцинированного скота путем постановки реакции радиальной диффузии с О-полисахаридным антигеном.

Несмотря на официальное признание этого метода, многие вопросы, связанные с практическим его применением в разных эпизоотических условиях, требовали от ученых некоторого осмысления и более глубокого изучения.

Впервые Diaz R., Garatea P., Jones L.M., Morigon J. [7] был выделен поли-В антиген, с помощью которого представлялась возможность дифференцировать животных, реагирующих на вакцину из штамма 19 от реагирующих на естественное заражение.

Chernogrodzky J.W., Nielsen K.H. (1988) [6] из *B. abortus* 1119-3 выделили О-полисахаридный антиген, который функционально не отличался от поли-В антигена и мог быть использован для дифференциации вакцинированных и больных бруцеллезом животных.

Другими исследователями Чекишев В. М., Файзрахманов Ш.Р. и др. [3] с помощью мягкого гидролиза и очистки бактериальной массы штамма *B. abortus* 19 был получен О-ПС антиген, который апробировали в РИД в геле агара. Было установлено, что РИД с О-ПС антигеном была отрицательной во всех случаях с сывороткой крови вакцинированных (штаммы 19, 82 и 104 М) животных через 1,5 месяца и далее после иммунизации [4].

Понять сущность такого феномена можно при более детальном рассмотрении химической структуры грамотрицательной микрофлоры вообще и бруцелл в частности. Клеточные стенки бруцелл представлены гидрофобными макромолекулами липополисахаридов, содержащих специфические О-полисахариды, свя-

занные с ядерной коровой частью и липидом А гетерополисахаридами. О-полисахарид, отщепленный с помощью мягкого кислотного гидролиза от коровой части и липида А, оказался различным по молекулярной массе у слобовирулентных и у вирулентных штаммов бруцелл. У вакцинированных штаммов бруцелл О-ПС из-за низкой массы (около 10 КДН) ведет себя как гаптен. Однако исследователи и авторы предложенного антигена указывают на его недостатки, которые связаны с тем, что при введении вакцины из шт. *B. abortus* (19 и 82) в больших дозах или при использовании адъювантов положительные показатели РИД с О-ПС антигеном у отдельных животных могут регистрироваться через 1,5-2 месяца после иммунизации. Однако при использовании предусмотренных инструкцией по борьбе с бруцеллезом доз вакцин это не имеет практического значения [5].

Известно, что *Brucella abortus* экспрессирует преимущественно наработку А антигена, а *Brucella melitensis* – М антигена, однако эти различия носят количественный, а не качественный характер. Исключение составляют бруцеллы в стабильной R- форме (*B. ovis*), которые не экспрессируют синтез О-полисахаридов (О-ПС), хотя бруцеллы других видов в R- форме определенное количество О-ПС синтезируют [5]. Вершилова П. А. [1] отмечает «...отсутствие в клетках *Br. ovis* липополисахаридного эндотоксина, характерного для S-форм бруцелл. В ряде серологических тестов: реакции агглютинации с адсорбированными сыворотками, реакции пассивной гемагглютинации, а также преципитации в геле, было установлено сходство *Br. ovis* и R- форм *B. melitensis*, а также небольшое антигенное родство с S- формой *B. melitensis*».

Анализируя литературные данные, можно отметить, что для диагностики было взято основное свойство предложенного антигена, которое связано с тем, что вирулентные (эпизоотические) и слобовирулентные (вакцинные) бруцеллы отличаются между собой по иммунохимической структуре. При этом дифференци-

рующим эпитопом является О-цепь полисахарида S-форм бруцелл (О-ПС), присутствующая высокой молекулярной массе вирулентных штаммов, на которую в организме вырабатываются адекватные антитела. У слабовирулентных и диссоциированных форм бруцелл этот антиген отсутствует [4].

Улучшение эпизоотической ситуации по бруцеллезу в стране ведет к пересмотру системы борьбы с бруцеллезом, в частности необходимости жесткого антигенного прессинга с использованием живых вакцин, замена их на менее реактогенные – убитые.

Цель исследования – проследить закономерности проявления реакции преципитации у коров, многократно иммунизированных живой противобруцеллезной вакциной из штамма *Brucella abortus* 82 и химической противобруцеллезной вакциной в стадах с различной эпизоотической ситуацией.

**Материал и методы.** Анализу подвергнуты материалы серологических исследований сыворотки крови от коров в период с 1992 по 2011 г. в стадах с различным иммунологическим и эпизоотическим фоном.

**Результаты исследований.** В благополучных по бруцеллезу крупного рогатого скота стадах, реиммунизированных вакциной из штамма *B. abortus* 82, некоторые здоровые иммунизированные животные длительно реагируют в РА и РСК в низких титрах. В связи с этим, для проверки эпизоотической ситуации в таких стадах нами было рекомендовано исследовать сыворотку крови от коров, реиммунизированных вакциной из штамма *B. abortus* 82, в РИД с О-ПС антигеном, через 2 месяца после последней вакцинации. При проверке 10 тысяч 324 проб сыворотки крови от коров 26 хозяйств Шадринского района Курганской области не было выделено ни одного положительно реагирующего животного в РИД с О-ПС антигеном, что подтвердило благополучие хозяйств по бруцеллезу [2].

Получив данные о специфичности ре-

акции в благополучных по бруцеллезу стадах, мы накапливали материал с 1992 по 1996 г. в хозяйствах, считавшихся официально благополучными по бруцеллезу крупного рогатого скота.

**Благополучные по бруцеллезу стада, реиммунизированные вакциной из штамма *B. abortus* 82., находившиеся в угрожаемой по бруцеллезу зоне.**

На 15 официально благополучных общественных фермах, находившихся в угрожаемой зоне, при исследовании 20601 пробы через 8-12 месяцев после иммунизации вакциной из шт. 82 было выделено 557 (2,7%) животных, реагирующих положительно в РИД. В то же время в личных подворьях на этой же угрожаемой территории у неиммунного поголовья крупного рогатого скота при исследовании 1436 проб на бруцеллез положительные реакции одновременно по 3 тестам (РА+РСК+РИД) были зарегистрированы у 102 коров. РА у 191 и РСК у 161 животного, что свидетельствует о наличии бруцеллезной инфекции, затяжного характера и низкой чувствительности РИД с О-ПС- антигеном.

**Благополучные по бруцеллезу стада, реиммунизированные химической вакциной трехкратно - схема № 1; иммунизированные однократно химической вакциной по фону вакцины из шт. 82 - схема № 2.**

Введение химической противобруцеллезной вакцины по схеме 1 стимулирует выработку агглютининов отдельными животными в разных титрах. Так, в пробирочной РА на 21 сутки антитела выявлены у 61,6 % животных. При этом у 5,5 % коров титры РА были 200 МЕ и выше, которые угасли к 4 мес. Комплементсвязывающие вещества, улавливаемые в РСК на 21-е сутки составляли 11,7%, (в основном 1:5), которые также угасли к 4 мес. Сочетанное применение живой вакцины из штамма 82 на телках двукратно с последующей реиммунизацией химической противобруцеллезной вакциной стимулировало выработку агглютининов, улавливаемых в РА на 21 сутки у 58,0 % при отсутствии реагирующих РА 200 МЕ и выше.

Через 1,5 мес. в РА регистрируется увеличение титров агглютининов – РА 200 МЕ – 2,7 % с угасанием к 3- 4 мес. Комплементсвязывающие вещества, улавливаемые в РСК, регистрировали на 21-е сутки в 47,2 % (в титрах– 1:10 –6,2 %),

через 1,5 мес. 11,0 % (в титрах 1:10-0,7%); и угасают к 4 мес. –11,4 % (только 1:5). Не были выявлены антитела, регистрируемые в РИД с сывороткой крови и КР с молоком (таблица 1).

**Таблица 1** – Показатели РИД с О-ПС антигеном на бруцеллез в близкие сроки после реиммунизации ХВ и сочетанного использования вакцины из шт. 82 и ХВ в благополучных по бруцеллезу стадах

Эпизоотическая ситуация	Иммунный фон	Сроки после реиммунизации	Кол-во проб	Результаты исследований (количество реагирующих, %)				
				РА, МЕ, %		РСК, титры		РИД
				50/100	200	1:5	1:10	Положит.
Благополучные	Схема № 1 ХВ +ХВ+ ХВ ежегодно	21 сутки	162	56,1	5,5	11,7	-	0
		1,5 мес.	274	23,4	4,1	12,7	-	0
		2 мес.	481	22,8	-	1,8	-	0
		4 мес.	393	22,1	0,2	2,5	-	0
	Схема № 2 82+82+ХВ ежегодно	21 сут.	239	58,0	-	41,0	6,2	0
		1,5 мес.	145	42,3	2,7	10,3	0,7	0
		3,5 мес.	140	29,4	-	11,4	-	0
			1384					
			1834					

**Благополучные по бруцеллезу стада, реиммунизированные химической вакциной, находившиеся в угрожаемой по бруцеллезу зоне.**

При проведении фоновых исследований сыворотки крови от всех возрастных групп крупного рогатого скота: телят, телок, нетелей и коров 3 гуртов был получен следующий результат: перед иммунизацией (в отдаленные сроки – 7 мес.) было выявлено: в РА – 50 МЕ -8,2%; 100 МЕ – 4,8%; 200 МЕ – 0,7%; 400 МЕ- 1,0% реагирующего на бруцеллеза скота, РСК 1/5 – 10,3%; 1:10- 3,0%; 1:20 – 2,4%; 1:20 – 2,4 процента. В то время как в РИД с

О-ПС антигеном только 1,0 % больного скота. Эти данные показывают, что показатели РИД с О-ПС антигеном не отражают объективную ситуацию по бруцеллезу и отстают по чувствительности от показателей реакции агглютинации и реакции связывания комплемента.

**Эпизоотическая ситуация по бруцеллезу (коровы).** В близкие сроки после использования химической вакцины было исследовано 1237 проб сыворотки крови и максимальное выделение больного скота было зарегистрировано через 14 суток – 12 голов (4,4%), через 21 сутки – 9 голов (2,7%) (табл. 2).

**Таблица 2** – Эпизоотическая ситуация по бруцеллезу (коровы)

Группа	Количество	Срок исследования	Результаты серологических реакций в %						
			РИД	РА, МЕ			РСК титры		
				50	100	200	5	10	20
Коровы	291	7 мес.	1,0	8,2	4,8	0,7/1,0	10,3	3,0	2,4/2,4
Иммунизация ХВ 28.04. 11 г.									
Коровы	86	7 сут	0	8,1	5,8	1,1	17,4	3,4	0
Коровы	267	14 сут.	4,4	21,7	38,5	17,2/1,1	25,0	11,9	8,6/1,4
Коровы	332	21 сут.	2,7	24,3	2,2	28,3/2,4	14,7	6,9	4,5/0,6
К+т	499	1,5-2 м	0,8	17,4	9,8	0	5,8	1,8	0,6
Коровы	344	4-5 мес	0,5	18,3	6,9	0	1,5	4,0	0
<b>Итого</b>		<b>1528</b>							

**Эпизоотическая ситуация по бруцеллезу (телки).** В отдаленные сроки (7-8 мес.) после иммунизации было исследовано 218 голов и выявлено 3 головы (2,8%). В короткие сроки исследования не проводились, первое исследование проведено через 3 месяца после иммунизации ХВ и выявлено 12 (11,4%) больных телок перед осеменением. Через 4 месяца еще регистрировали животных, реагирующих в РИД, 2,0%.

**Выводы.** Проведенные исследования по изучению диагностической эффективности О-полисахаридного антигена в стадах, многократно иммунизированных живой противобруцеллезной вакциной из штамма *B. abortus* 82 и химической противобруцеллезной вакцины ВНИИБТЖ, с учетом различного иммунного фона (благополучные и неблагополучные) позволили сделать следующие выводы:

1. Через 2 месяца после многократной реиммунизации вакциной из штамма *B. abortus* 82 у коров, в благополучных по бруцеллезу стадах, положительные показатели РИД с О-ПС антигеном не регистрируются (исследовано одномоментно 10324 проб сыворотки крови).

2. В благополучных по бруцеллезу стадах, реиммунизированных химической вакциной трехкратно - схема № 1; иммунизированных однократно химической вакциной по фону вакцины из штамма 82 - схема № 2, не наблюдается последующая стимуляция синтеза антител, улавливаемых РИД, начиная с 21 суток.

3. Положительные показатели РИД с О-ПС антигеном совпадают с высокими титрами РА и РСК, но не выявляют дополнительно реагирующих животных только в одной РИД и по чувствительности отстают от показателей РА и РСК в отдельности.

4. В оздоравливаемых стадах РИД эффективна только в близкие сроки (1-3 месяца) после вакцинации (шт.82, химическая вакцина) на фоне достаточно высокого иммунитета по стаду после провокации скрытого течения бруцеллеза. В отдаленные сроки (6-12 месяцев) при

выявлении больных бруцеллезом животных достаточно пользоваться результатами РА и РСК, как более чувствительными методами.

#### Библиографический список

1. Бруцеллез /Под редакцией академичка АМН СССР П. А. Вершиловой. – Москва: Медицина, 1972. – 439 с.

2. Попова Т. Г. Оценка эпизоотической ситуации в стадах с помощью О-ПС антигена в радиальной иммунодиффузии (РИД) / Т. Г. Попова, А. А. Новицкий, В. С. Бронников, С. В. Савицкий / Актуальные проблемы инфекционных, паразитарных и незаразных болезней домашних животных и меры борьбы с ними: Матер. юбил. научн.-произв. конф. сотрудников и аспирантов ОмГАУ. – Омск, 1998. – С. 268-272.

3. Пат. № 2035188., 6А61К 39/10. Способ получения антигена для дифференциальной диагностики вакцинированных и больных бруцеллезом животных / Авторы: Филиппенко М.Л., Киселев Е.А., Чекишев В.М., Файзрахманов Ш.Р. // Открытия. Изобретения. – 1995. - № 14.

4. Чекишев В. М Дифференциация вакцинированных и больных бруцеллезом животных / В. М. Чекишев, Ш. Р. Файзрахманов, Б. А. Киселев, М. Л. Филлипенко, О. А. Колганова, А. Г. Хлыстунов, С. К. Димов, В. В. Якомов, А. А. Новицкий, Т. Г. Попова, В. А. Циммерман // Ветеринария. – 1993. – № 8. – С.25-32.

5. Чекишев В. М. Проблемы серологической диагностики бруцеллеза животных / В. М. Чекишев //Актуальные проблемы ветеринарной медицины в России: Сб. науч. тр., посвящ. 100-летию вет. науки в России и 30-летию СО РАСХН / РАССХН. Сиб. отделение. – Новосибирск, 1998. – С. 273-282.

6. Cherwonogrodzky, J.W. Brucella abortus 1119-3 O-chain polysaccharide to differentiate sera from *B.abortus* S-19 – Vaccinated and fieldstrain infected cattle by agar gel immunodiffusion / J. W. Cherwonogrodzky, K.H. Nielsen // J. Clin. Microb. – 1988. – V. 26, № 6. – P. 1120 – 1123.

7. Radial immunodiffusion test with a Brucella polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle / R. Diaz, P. Garatea, L.M Jones, J. Moriyon // J. Clin. Microbiol. – 1979. – V. 10. – P. 37 – 41.