

complication of epizootological situation. In future it is planned the deep study of prevolution of microbes taking into account the exposed changes in pathogenic qualities of infections. For keeping balance in the epizootological situation, strengthening of nature resistance of macroorganisms is needed with purposeful application of immunostimulators.

УДК 619:616.98:616.682-002

КОМПЛЕМЕНТ ФІКСУЮЧИЙ ТЕСТ У ДІАГНОСТИЦІ ІНФЕКЦІЙНОГО ЕПІДИДИМИТУ БАРАНІВ

Бабкін А.Ф., Медвідь О.О., Райко Д.Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

*В Україні не було повідомлень про застосування РЗК в якості скринінгового тесту при інфекційному епідидиміті баранів. Результати порівняльних досліджень гіперімунних бруцеляовісних і 51 проби польових сироваток свідчать, що РЗК з бруцеляовісним антигеном за специфічністю та інформативністю не поступається РТЗК. Трудомісткість, термін постановки реакції й облік результатів дослідження скорочуються на добу, що має особливе значення у разі дослідження невеликих груп тварин, зокрема, баранів. Впровадження РЗК з термоекстрагованим антигеном *B. ovis* у лабораторну діагностику інфекційного епідидиміту баранів поряд з РТЗК, РІД, і ELISA має важливе практичне значення і буде сприяти гармонізації та стандартизації вітчизняних методів діагностики.*

Інфекційний епідидиміт баранів (*Brucella ovis* infection) має поширення серед вівцепоголів'я різних країн світу та спричиняє значних економічних збитків вівчарству. Хвороба реєструється в більшості країн світу, протікає клінічно або субклінічно протягом тривалого часу життя тварин з характерними для даної інфекції ураженнями статевих органів у баранів (епідидиміти, орхіти) і плацентитами у вівцематок, що супроводжується безпліддям, абортами, пренатальною і постнатальною смертністю ягнят [1–3].

Серед лабораторних методів діагностики цієї хвороби важливе місце займають серологічні тести (РЗК, РТЗК, РІД, ІФА) [1–3, 5–8]. В Україні для прижиттєвої діагностики інфекційного епідидиміту баранів чинними є РТЗК та РІД. Розроблено та налагоджено виробництво специфічних і високочутливих діагностиків – «Набір для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів у РТЗК» ТУ У 46.15.059-95 і «Набір для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів у РІД» ТУ У 46.15.127-96., а також «Набір компонентів для серологічної диференціації культур бруцел» ТУ У 24.4-00497087-672-2002, який застосовують і для ідентифікації *B. ovis*. Дейнеш А.А. з позитивним результатом провів експериментальні дослідження щодо застосування непрямого методу ІФА та РІД з метою оздоровлення вівцеферм від бруцеляовісної інфекції [9, 10].

У діагностиці бруцеляовісної інфекції використовують термоекстрагований бруцеляовісний антиген, який має термостабільний поверхневий R-ліпополісахарид *B. ovis*. Постановку РТЗК проводять за методикою, розробленою П.А. Триленко (1976) [4]. У зарубіжних країнах використовують рекомендації МЕБ, щодо постановки комплекмент фіксуемого тесту методом фіксації комплекменту за температури 37 °С.

Реакція зв'язування комплекменту є класичним серологічним тестом, який визначає рівень специфічних антитіл у сироватці крові інфікованих та хворих тварин. Зазначений тест базується на феномені фіксації комплекменту на комплексі антиген-антитіло. Існує декілька варіантів постановки реакції зв'язування комплекменту, зокрема, за феноменом зв'язування комплекту за температури 37 °С або від 4 до 8 °С та лізису еритроцитів у гемсистемі за температури 37 °С і шляхом виявлення неповних антитіл, що не зв'язують комплекмент у непрямому методі фіксації комплекменту (РЗК, РТЗК, РНЗК).

Відомо, що в Україні і країнах СНД для діагностики та скринінгових досліджень на бруцельоз тварин застосовують як РЗК, так і РТЗК, а для інфекційного епідидиміту баранів тільки РТЗК [1–5]. В інших країнах Америки й Європи для діагностики бруцельозу й інфекційного епідидиміту баранів комплемент РЗК є поширеним серологічним методом діагностики бруцельозу [1–3, 9, 10].

Мета роботи — охарактеризувати комплемент фіксуючи тест у серологічній діагностиці інфекційного епідидиміту баранів і провести обґрунтування застосування реакції зв'язування комплементу з використанням термоекстрагованого антигену *B. ovis*.

Матеріали та методи досліджень. У дослідженнях використано термоекстрагований антиген з виробничих штамів *B. ovis* 67/Б і 76/982 шляхом вирощування культур *B. ovis* на м'ясо-пептонному-глюкозо-гліцериновому агарі без сироватки крові великої рогатої худоби та без збільшення кількості CO₂ в атмосфері культивування. Матраси з посівами протягом 4-х діб витримували в термостаті за температури (37 ± 1) °С. Суспензії культур змиті фізрозчином (рН 7,2–7,4) концентрація 90 і 120×10⁹ м.к./см³ бруцел термоекстрагували за температури 100 °С. Антиген консервували 10 %-м розчином фенолу в кінцевій концентрації 0,5 % і використовували в РЗК і РТЗК. У дослідженнях використано термоекстрагований бруцелаовісний антиген у титрі 1:50.

Реакцію зв'язування комплементу ставили за стандартною методикою дослідження на бруцельоз [4, 5], реакцію тривалого зв'язування комплементу — ставили за методикою, розробленою П.А. Триленко (1976) [3].

Досліджено гіперімунні сироватки крові баранів і кролів, проби польових сироваток крові з вівцеферм.

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні в РЗК і РТЗК виготовлені термоекстраговані бруцелаовісні антигени в розведенні 1:10 і позитивні бруцелаовісні та негативні сироватки баранів і кролів у титрі 1:5 не мали гемотоксичних і антикомплементарних властивостей.

В порівняльному дослідженні у РЗК і РТЗК бруцелаовісного антигену з гіперімунними бруцелаовісними сироватками крові баранів і кролів вірогідної різниці між титрами антитіл не було виявлено. Встановлено високу антигенну активність штаму *B. ovis* 156/7807 у порівнянні зі штамми *B. ovis* 67/Б, 76/982. У сироватках крові від барана і кроля найвищий титр бруцелаовісних антитіл виявлено в імунізованих інактивованою суспензією культури штаму *B. ovis* 156/7807 - 1:160 і дещо нижчий у штамів *B. ovis* 67/Б — 1:40–1:80 і 76/982 — 1:10–1:40 (Рис 1.).

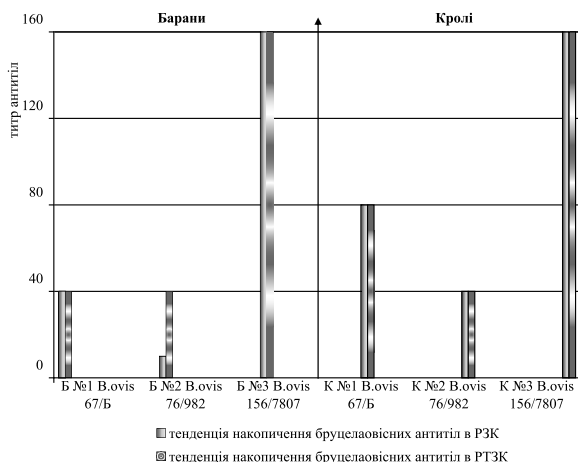


Рис. 1. Результати порівняння тенденції накопичення антитіл у РЗК і РТЗК гіперімунних бруцелаовісних сироваток від баранів і кроликів

При дослідженні 51 проби крові з віцеферм, неблагополучних щодо *B. ovis* інфекції, встановлено збіг позитивних, сумнівних і негативних результатів у РЗК і РТЗК, хоч остання була більш чутливіша (табл. 1). З досліджених у РЗК проб сироваток крові овець «позитивно» реагувало 28 (54,9 %) в РТЗК – 37 (72,5 %); «сумнівно» – 8 (15,7 %) проти – 6 (12,8 %) у РТЗК; «негативно» – 15 (29,4 %) проти – 8 (16,0 %) у РТЗК (Табл..1). Титри бруцеляовісних антитіл у РТЗК співпадали, в деяких випадках були вищі ніж у РЗК (табл. 2).

Таблиця 1 – Результати порівняння чутливості РЗК і РТЗК при дослідженні 51 проби польових сироваток від баранів з неблагополучних господарств

Інтерпретація результатів	Результати дослідження	
	РЗК, реагувало гол (%)	РТЗК, реагувало гол (%)
«позитивно»	28 (54,9)	37 (72,5)
«сумнівно»	8 (15,7)	6 (12,8)
«негативно»	15 (29,4)	8 (16,0)

Таблиця 2 – Результати порівняння чутливості РЗК і РТЗК при дослідженні проб польових сироваток від баранів і ярки з неблагополучних господарств

№	Ін. №	Активність бруцеляовісних антитіл в комплементфіксуючих тестах	
		РТЗК	РЗК
1	00440	1:160	1:160
2	00441	1:160	1:160
3	88	1:40	1:80
4	190	1:40	1:20
5	30494	1:10	1:5
6	29043	1:40	1:40
7	ярка	1:10	0

Теоретичні аспекти механізмів виявлення антитіл зазначеними реакціями проявляються у наступному. При постановці РЗК або РТЗК розрізняють дві фази реакції: перша фаза специфічна – формування комплексу антиген-антитіло в присутності комплементу. Специфічна фаза обумовлює відсутність незв'язаного комплементу в дослідній пробі після інкубування за температури 37 °С протягом 20-30 хвилин або за температури 4 °С протягом 16-18 годин. Тоді як у другій фазі при додаванні індикаторної (гемолітичної) системи візуально виявляється відсутність або наявність специфічної реакції за відсотком затримки гемолізу. При відсутності формування специфічного бруцеляовісного комплексу антиген-антитіло комплемент реагує з індикаторною системою та відбувається лізис еритроцитів, що свідчить про негативну реакцію.

Кількість гемолітичної системи у пробірках за РЗК на всіх стадіях стабільна, а змінюється лише розведення комплементу в залежності від його активності за результатами попереднього титрування. Тоді як у РТЗК доза комплементу застосовується завжди дещо вищою, а доза індикаторної системи відтитровується в тест-системі додатково перед постановкою основного досліді. Похибка в результатах досліджень у комплемент фіксуючому тесті залежить від характеристик досліджуваної сироватки, зокрема, антикомплементації, що іноді призводить до псевдопозитивних результатів. Ця погрішність результатів обов'язково контролюється дослідженням сироватки без антигену. При виявленні антикомплементації властивостей досліджуваної сироватки проводять обробку сироватки комплементом з розрахунку 1:1 й інкубуванні за температури 37 °С 30 хвилин або за кімнатної температури 60 хвилин. Стабільна антикомплементація сироватки у повторно взятих пробах крові тварин, це унеможливило дослідження сироватки у РЗК. На якість результатів дослідження впливає також неодноразове заморожування та розморожування, гемоліз або контамінація сироваток бактеріями або наявність у тварин аутоімунних процесів, ревматоїдного фактору або імунних комплексів у сироватці крові [1, 10, 11].

Можливі псевдопозитивні результати серологічних досліджень на інфекційний епідідиміт баранів завдяки перехресним реакціям при інфікуванні тварин іншими мікроорганізмами, зокрема *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus actinomycetenicomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Brucella melitensis* [2, 3].

Через наявність псевдопозитивних реакцій за одноразовим дослідженням окремої проби сироватки крові не має підстав стверджувати про статус інфікування тварин. Дослідження парних проб парних сироваток з інтервалом 10–20 діб і виявлення збереження або підвищення титрів антитіл свідчить більш достовірно про наявність інфекції, що потребує проведення подальшого уточнення діагнозу за групою тварин [1, 5, 11].

За чинною «Інструкцією про заходи з профілактики та боротьби з бруцельозом тварин» (2000 р.) РТЗК з *B. ovis* антигеном забезпечує діагностування інфекційного епідідиміту баранів у різних статевих-вікових групах [9, 10]. Слід урахувати, що серопозитивних тварин вважають хворими та вибраковують. У деяких випадках процес тривалого 16–18-годинного витримання першої фази зв'язування комплексу за температури $6 \pm 2^\circ\text{C}$ в РТЗК, призводить до негативного впливу на результат другої гемолітичної фази реакції, що супроводжується затримкою гемолізу за рахунок чого можуть бути неспецифічні реакції. За спостереженнями П.А. Триленко при порівняльному вивченні РЗК і РТЗК для діагностики бруцельозу ВРХ при витриманні на холоді першої фази реакції руйнується частина комплексу. Частково цей недолік долається шляхом відтитрування дози гемолітичної системи перед постановкою основного дослідження РТЗК, але тільки за умови чіткої контрольної реакції з позитивною та негативною бруцельозною сироватками й антигеном. Слід урахувати, що при недостатній інактивації, (нижче $62-64^\circ\text{C}$) можлива реверсія антикомплементарних властивостей дослідних і контрольних сироваток в умовах холодильнику [4]. Специфічність показників серологічних досліджень повинна завжди пов'язуватися з клінічними ознаками та бактеріологічним дослідженнями. Важливе значення у підвищенні ефективності оздоровлюючих заходів мають сучасні методи, контролювання еякуляту баранів-плідників на збудника *B. ovis* бактеріологічно або ПЛР [2, 3].

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Специфічність показників серологічних досліджень у РТЗК на інфекційний епідідиміт баранів повинна завжди підтверджуватися іншими тестами та пов'язуватися з клінічними ознаками та бактеріологічним дослідженнями.

2. Впровадження РЗК з термоекстрагованим антигеном *B. ovis* у лабораторну діагностику інфекційного епідідиміту баранів поряд з РТЗК, РІД, і ELISA має важливе практичне значення і буде сприяти гармонізації та стандартизації вітчизняних методів діагностики.

Список літератури

1. Бусол, В.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / Бусол В.А., Бабкин А.Ф., Жованик П.Н. — К. : Урожай, 1991. — 176 с. 2. Chapter 2.4.1 [Text] // OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). — 5th ed. — Paris, 2004. — Vol. 1. — P 245–250. 3. Chapter 2.4.1 [Text] // OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). — 6th ed. — Paris, 2004. — Vol. 1. — P 257–263. 4. Триленко, П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных [Текст] / Триленко П.А. — М. : Колос, 1976. — 280 с. 5. Руденко, А.Ф. Исследования по усовершенствованию метода массовых диагностики инфекционного эпидидимита баранов [Текст] / Руденко А.Ф. : дис. ... канд. вет. наук. — Х., 1977. — 224 с. 6. Дейнеш, А.А. Эпизоотология усовершенствования диагностики и мер борьбы и инфекционным эпидидимитом баранов в условиях Закарпатья [Текст] / Дейнеш, А.А. : дис. ... канд. вет. наук. — Х., 1992. — 157 с. 7. Орлов, С.Н. Иммуногенность и антигенность инактивированных эмульсин-вакцин против инфекционного эпидидимита баранов из штаммов *Brucella abortus* и *Brucella ovis* [Текст] / Орлов С.Н. : дис. ... канд. вет. наук. — Х., 2004. — 171 с. 8. Медвідь, О.О. Розробка засобів специфічної профілактики бруцеллової та хламідійної інфекцій [Текст] / Медвідь О.О. : дис. ... канд. вет. наук. — Х., 2006. — 159 с. 9. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з бруцельозом варин [Текст] : затв. Держ. департ. вет. медицини МАП України 25.01.2000, № 4. — К., 2000. — 20 с. 10. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин [Текст] : затв. МінАПК України 10.02.1998, № 15-14/55. — К., 1998. — 58 с. 11. Working instruction for reagents of the complement fixation test (CFT). CE 0197. V7. 05/07-1. — July 1989. — 16 pp.

COMPLEMENT FIXATION TEST IN DIAGNOSTICS OF RAM INFECTIOUS EPIDIDYMITIS

Babkin A.F., Medvid' O.A., Rayko D.Yu.

National scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»,
Kharkiv

Complement fixation test is used in Ukraine as screening test at ram infectious epididymitis. Results of presented comparative investigations of hyperimmune Brucella ovis and 51 samples of field sera show, that complement fixation test does not yield to prolonged complement fixation test by specificity. Term of reaction is shortened for one day. It is very important at investigation of small groups of animals, including rams. Regulation of complement fixation test with thermoextracted B. ovis antigen for laboratory diagnostics of infectious epididymitis has significant practical importance.

УДК 619:615.9:631.81.095.377

ТОКСИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СЕЛЕНІДУ (ДМДПС)

Балим Ю.П.

Управління ветеринарної медицини в Харківській області

У статті наводяться результати досліджень щодо токсичних властивостей диметилдипіразоліселеніду.

Селен впливає на організм тварин, забезпечуючи нормальну діяльність печінки, антиоксидантної, імунної і детоксируючої систем організму. Дефіцит селену в раціоні тварин викликає порушення обміну речовин, морфофункціонального стану печінки та зниження продуктивності тварин. Добре відомі такі прояви дефіциту селену, як погіршення росту, дегенеративні зміни м'язової тканини, печінки, кардіоміопатії, а також репродуктивні порушення, ексудативний діатез і енцефаломаліяція в птиці. Нехватка селену в організмі веде до порушення цілісності клітинних мембран, зниження активності ферментів, накопичення кальцію в середині клітин, порушення метаболізму амінокислот і кетокислот, зниження енерго-продукуючих процесів й багато інших розладів [1–3].

У ветеринарній практиці поширене профілактичне й терапевтичне використання селеніту натрію, часто в комбінації з вітаміном Е. Однак, використовуваний у тваринництві селеніт натрію, має високу токсичність (LD_{50} – 10 мг/кг маси тіла) і швидко виводиться з організму. В останні роки розроблені й запропоновані для практичного застосування менш токсичні органічні сполуки селену. Із цих препаратів селекор є найменш токсичним (LD_{50} – 8100 мг/кг маси тіла). В окремих публікаціях наводяться результати досліджень, проведені на малочисельних групах тварин. У цих дослідках встановлено, що селекор позитивно впливає на прирости ваги поросят, телят, при захворюваннях нирок, при профілактиці післяпологових хвороб корів.

Однак, даних щодо токсикологічних параметрів диметилдипіразоліселеніда (ДМДПС) – субстанції селекора (селеданта), впливу селеданта на гомеостаз, продуктивність, якість продукції, ріст і розвиток тварин, для профілактики захворювань у літературних джерелах немає. Відсутня і нормативна документація на селедант, створений на основі ДМДПС – органічний, високоефективний і безпечний препарат селену для тваринництва та ветеринарії.

З огляду на перспективність застосування органічних препаратів селену в сільському господарстві, особливо у ветеринарії, нами проведені комплексні дослідження із з'ясування фармакологічних і токсикологічних властивостей ДМДПС та з метою впровадження препарату на його основі (селеданта) в практику.

Матеріали й методи. Токсичні властивості препарату оцінювали методом визначення гострої та хронічної токсичності відповідно до «Методичних вказівок по