

**N.N. SHKIL, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Laboratory Head,
N.A. SHKIL, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Laboratory Head,
V.A. BURMISTROV*, Candidate of Science in Chemistry, Researcher**

*Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East,
Russian Academy of Agricultural Sciences,*

** Vector-Vita NPC Co Ltd
e-mail: nicola07@mail.ru*

SUBCHRONIC TOXICITY TESTING OF THE DRUG ARGOVIT ON LABORATORY ANIMALS

Subchronic toxicity parameters of the silver-containing drug Argovit were determined in laboratory animals. The study was conducted on male and female outbred albino mice ($n = 70$) weighing 18.0–20.0 g, and male and female albino rats ($n = 70$) weighing 180.0–200.0 g. The drug was administered to white rats, and immunobiochemical investigations of their blood serum were conducted in 4th, 8th, 12th, 16th, 20th, 24th and 28th days after drug administration for determining total protein, glucose, cholesterol, total lipids, phosphorus, calcium, globulins (α , β , γ). During 29 days, white mice ($n = 10$) and white rats ($n = 20$) of the control group were orally administered with 0.85% aqueous solution of sodium chloride at a dose equal to administered drug Argovit. In white mice, the cumulation coefficient (Kc) made up 24.15, in white rats 16.1, which allowed attributing the drug tested to non-cumulative ones. Long-term administration of increasing toxic doses of the drug Argovit to white rats did not result in true significant changes in immunobiochemical parameters of their blood serum. During the whole studying period, deaths of laboratory animals, as well as dysfunctions of their gastrointestinal tracts, were not revealed.

Keywords: silver, subchronic toxicity, Argovit, cumulative dose.

УДК 619:616.981:42

**А.С. ДИМОВА, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
А.А. СИЗОВ, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
С.К. ДИМОВ, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией,
Г.М. СТЕБЛЕВА, кандидат ветеринарных наук, ученый секретарь,
Н.И. КУРЕНСКАЯ, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
Д.А. СИЗОВ, младший научный сотрудник,
Д.П. МЕЛЬНИКОВ, соискатель,
П.К. АРАКЕЛЯН*, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией,
А.А. ГРИЦАН**, директор,
И.Н. ЕМЕЛЬЯНОВА**, заведующая отделом**

*ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
Россельхозакадемии,*

**ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза
и туберкулеза животных Россельхозакадемии,*

***Томская областная ветеринарная лаборатория
e-mail: referent@ievsvd.ru*

ЭКСПРЕСС-МЕТОД МАССОВОЙ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Разработана новая тест-система ИФА для диагностики бруцеллеза животных. Представлены результаты исследований, доказывающие, что данная тест-система может быть исполь-

зована у многих видов животных, в том числе крупного и мелкого рогатого скота даже в условиях использования живых слабоагглютиногенных и агглютиногенных противобруцеллезных вакцин. Установлено, что новая тест-система ИФА поглощает показания реакции непрямой гемагглютинации, относящейся к способам экспресс-диагностики, а также официального классического диагностического комплекса – реакции агглютинации (РА) + реакции связывания комплемента (РСК), не уступает им по специфичности и превосходит по диагностической активности. Выявлены преимущества, связанные с сокращением времени на исследования, учет и интерпретацию результатов, упрощением этих процессов, повышением их объективности, воспроизводимости и безопасности. Подтверждено, что внедрение в практику скрининговых исследований на бруцеллез новой тест-системы ИФА значительно упрощает массовую диагностику этой болезни, так как к помощи комплекса РА + РСК и дополнительной дифференциальной поствакцинальной диагностики приходится прибегать лишь в случаях выявления положительных или сомнительных показаний РА + РСК.

Ключевые слова: бруцеллез, крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, вакцинация, диагностика, экспресс-методы, диагностические тест-системы ИФА, диагностическая активность.

В Российской Федерации до настоящего времени официально признанным обязательным диагностическим комплексом при бруцеллезе животных являются реакция агглютинации (РА) и реакция связывания комплемента (РСК) с единым бруцеллезным диагностикумом, изготовленным из типичных бруцелл в S-форме. Однако данный комплекс не обладает свойствами способа экспресс-диагностики, так как на его постановку уходит более суток. Кроме того, он имеет такие существенные недостатки, как большая трудоемкость, субъективная оценка результатов диагностики, невозможность стандартизации проведения диагностики. Известны и другие диагностические тесты. Например, к способам экспресс-диагностики бруцеллеза животных относят РБП (роз бенгал проба – пластинчатая цветная реакция агглютинации) и РНГА (реакция непрямой гемагглютинации) [1–4]. На постановку РБП уходит несколько минут, однако с ее помощью нет гарантированной возможности количественно оценить наличие антител [2]. Показания РНГА, регламентированной в РФ в качестве способа экспресс-диагностики бруцеллеза животных, практически полностью поглощают показания РА и РСК [3, 4]. Однако у данного способа большая трудоемкость, достаточно большое время (6 ч) для первичной постановки реакции, субъективная оценка результатов, отсутствие стандартизации и автоматизации проведения диагностики.

Давно известен наиболее чувствительный и обеспечивающий автоматизированную постановку и учет реакций способ диагностики бруцеллеза животных на основе различных вариантов иммуноферментного анализа (ИФА) [5, 6]. Однако в связи с использованием у животных противобруцеллезных вакцин и из-за высокой диагностической чувствительности он до сих пор не нашел в нашей стране широкого применения. Кроме того, в большинстве предлагаемых на его основе диагностических тест-систем существует ряд других проблем, связанных, в частности, с изготовлением антигена, сложностью и длительностью постановки реакции, отсутствием универсального ферментного конъюгата для исследования сывороток крови разных видов животных и др.

Цель исследований – разработать диагностическую скрининговую тест-систему ИФА, пригодную для практического использования в качестве массового экспресс-метода диагностики бруцеллеза у животных, в том числе иммунизированных против указанной болезни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В процессе реализации цели исследований испытано много различных вариантов диагностической тест-системы ИФА, отличающихся использованием различных антигенов, конъюгатов, техникой постановки реакции и др. В результате выбор остановили на оптимальном из них, который был подвергнут дальнейшему изучению. Учет реакций осуществлялся автоматизированно с использованием оборудования, официально аттестованного для применения в Российской Федерации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанную тест-систему ИФА испытали на крупном и мелком рогатом скоте. Исследовали на бруцеллез сыворотки крови от крупного рогатого скота благополучных стад как подвергавшегося, так и не подвергавшегося иммунизации против указанной болезни вакциной из слабоагглютиногенного штамма *B. abortus* 82. В регламентированные сроки после иммунизации (6 мес) все исследованные пробы (по 100 проб в каждой категории) показали отрицательный результат как по комплексу серологических реакций (РНГА, РА + РСК), так и в ИФА.

При исследовании на бруцеллез сывороток крови от крупного рогатого скота неблагополучных стад, не подвергавшегося вакцинации, в РНГА из 5 исследуемых проб реагировали все 5 в титрах 50–200 МЕ, в комплексе РА + РСК – лишь 4 (РА – 3 с титрами 50–100 МЕ; РСК – 1 с титром 1 : 5). В ИФА из 5 исследуемых сывороток крови показали положительный результат все 5 проб (показатели оптической плотности 1,362–2,063), что свидетельствует о полном соответствии показаний ИФА показаниям РНГА и диагностического комплекса РА + РСК, а также о большей диагностической чувствительности ИФА по сравнению с указанными реакциями в отношении выявления антител к бруцеллам (в данном случае «полевым»).

При исследовании на бруцеллез сывороток крови от крупного рогатого скота благополучных стад, иммунизированного живой слабоагглютиногенной вакциной из штамма 82, через 6 мес после иммунизации в РНГА из 14 исследуемых проб реагировало 10 в титрах 50–1600 МЕ (все 10 проб реагировали и в диагностическом комплексе РА + РСК: титры 6400 МЕ и 1 : 5–1 : 80 соответственно). В ИФА из 14 исследуемых сывороток крови показали положительный результат 10 проб с показателями оптической плотности 1,147–1,995 (все совпали с результатами РНГА и РА + РСК), сомнительный – 3 пробы с показателями оптической плотности 0,688–0,802 (в РНГА и РА + РСК они были отрицательными). Это свидетельствует о полном соответствии показаний ИФА показаниям РНГА и диагностического комплекса РА + РСК, а также о большей диагностической чувствительности ИФА по сравнению с указанными реакциями в отношении выявления антител к бруцеллам.

При исследовании на бруцеллез сывороток крови от мелкого рогатого скота благополучных стад, подвергавшегося и не подвергавшего иммунизации против указанной болезни вакциной *B. abortus* 19 конъюнктивно в дозе 4 млрд м.к., в регламентированные сроки после нее (4 мес) все исследованные пробы (по 50 в каждой категории) показали отрицательный

результат как по комплексу официальных серологических реакций (РНГА, РА + РСК), так и в ИФА.

При исследовании на бруцеллез сывороток крови от мелкого рогатого скота неблагополучных стад, не подвергавшегося вакцинации, в РНГА из 5 исследуемых проб реагировали все 5 в титрах 100–800 МЕ (все совпали с показаниями комплекса РА + РСК с титрами 25–400 МЕ и 1 : 5–1 : 10 соответственно). В ИФА с новой тест-системой из 5 исследуемых сывороток крови показали положительный результат все 5 с показателями оптической плотности 2,488–2,719. Это свидетельствует о полном соответствии показаний ИФА показаниям РНГА и диагностического комплекса РА + РСК и о большей диагностической чувствительности ИФА по сравнению с указанными реакциями в отношении выявления антител к бруцеллам (в данном случае «полевым»).

При исследовании на бруцеллез сывороток крови от мелкого рогатого скота неблагополучных стад, иммунизированного живой агглютиногенной вакциной из штамма 19 конъюнктивально в дозе 4 млрд м.к., в регламентированные сроки после нее в РНГА из 6 исследуемых проб реагировали все 6 в титрах 100–800 МЕ (все совпали с показаниями комплекса РА + РСК с титрами 50–400 МЕ и 1 : 5–1 : 80 соответственно). В ИФА с новой тест-системой из 6 исследуемых сывороток крови показали положительный результат все 6 с показателями оптической плотности 1,151–2,427. Это свидетельствует о полном соответствии показаний ИФА показаниям РНГА и диагностического комплекса РА + РСК и о большей диагностической чувствительности ИФА по сравнению с указанными реакциями в отношении выявления антител к бруцеллам.

При исследовании 20 проб сывороток крови крупного рогатого скота параллельно с РА, РСК, РНГА, в новой тест-системе ИФА в сравнении с тест-системой производства ФГУП «Курская биофабрика – фирма Биок» получены следующие результаты. Из 10 исследованных проб сывороток крови животных благополучных стад при использовании тест-системы ФГУП «Курская биофабрика – фирма Биок» положительно реагирующих не выявлено. Сомнительно реагировало 2 пробы (в том числе из числа невакцинированных – 0, вакцинированных – 2). При использовании предлагаемой нами тест-системы из этих же 10 исследованных проб сывороток крови животных благополучных стад все пробы реагировали отрицательно. Результаты РА, РСК и РНГА во всех случаях были отрицательными.

Из 10 исследованных проб сывороток крови животных неблагополучных стад при использовании тест-системы ФГУП «Курская биофабрика – фирма Биок» положительно реагировало 7 проб (в том числе из числа невакцинированных – 4, вакцинированных – 3), сомнительно – 1 (1/0 соответственно), отрицательно – 2 (0/2 соответственно). При использовании предлагаемой нами тест-системы из этих же 10 исследованных проб сывороток крови животных неблагополучных стад положительно реагировало 9 (в том числе из числа невакцинированных – 5, вакцинированных – 4), сомнительно – 0, отрицательно – 1 (из числа вакцинированных). В этих же 9 пробах получены положительные и сомнительные результаты РА, РСК и РНГА в разных сочетаниях. Отрицательный результат ИФА в одной пробе совпал с отрицательными результатами РА, РСК и РНГА.

Таким образом, предложенная нами тест-система по специфичности показаний и диагностической эффективности при бруцеллезе крупного рогатого скота не уступила тест-системе производства ФГУП «Курская биофабрика – фирма Биок», имея при этом преимущества в чувствительности, простоте постановки, учете и интерпретации реакций, а также во времени, затрачиваемом на исследования и учет реакций.

В условиях Томской областной ветеринарной лаборатории были проведены комплексные серологические исследования на бруцеллез (РА и РСК с официальным диагностикумом, ИФА – с разработанной тест-системой) 502 проб сывороток крови крупного рогатого скота, иммунизированного против бруцеллеза живыми вакцинами из штаммов 75/79-АВ и 82, из благополучных по бруцеллезу хозяйств различных районов области. При этом с положительными и сомнительными реакциями с помощью комплекса РА + РСК выявлено 58 проб (11,5 % из числа исследованных), с помощью ИФА – 68 (13,5 %). Показания ИФА полностью совпали с показаниями РА + РСК; дополнительно к РА + РСК выявлено 10 проб (2 % из числа исследованных). Во всех 68 пробах с положительными и сомнительными реакциями в РА + РСК и/или ИФА получен отрицательный результат в РИД с О-ПС антигеном, что свидетельствует об отсутствии в обследуемых стадах эпизоотически опасных в отношении бруцеллеза животных. Поствакцинальную природу реакций подтвердили положительные результаты РСК с R-антигеном, превосходящие по титрам РСК с S-антигеном.

Полученные результаты позволили внедрить в практику скрининговых исследований на бруцеллез новую тест-систему в областной и семи районных ветеринарных лабораториях, что в значительной мере упростило массовую диагностику этой болезни в масштабах области, так как к помощи громоздкого комплекса РА-РСК и дополнительных дифференциальных методов приходится прибегать лишь в случаях выявления положительных или сомнительных показаний ИФА.

Для диагностики бруцеллеза мелкого рогатого скота тест-система производства Курской биофабрики официально не предназначена. В связи с этим испытание на мелком рогатом скоте предложенной нами тест-системы показало ее преимущество по специфичности показаний в сравнении с тест-системой производства Курской биофабрики.

Таким образом, новая тест-система ИФА позволяет осуществлять диагностику бруцеллеза многих видов животных, в том числе крупного и мелкого рогатого скота даже в условиях использования живых слабоагглютиногенных и агглютиногенных противобруцеллезных вакцин. При этом она поглощает показания РНГА, относящейся к способам экспресс-диагностики, а также официального классического диагностического комплекса РА + РСК, не уступает им по специфичности, и превосходит их по диагностической активности. В настоящее время данная тест-система официально утверждена в РФ для диагностики бруцеллеза у крупного рогатого скота. Ведутся исследования, направленные на возможность ее регистрации для диагностики бруцеллеза у других видов животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная тест-система ИФА перспективна для применения в качестве скрининговой при массовых исследованиях животных на бруцел-

лез, обеспечивая возможность прибегать к классическим методам исследований – РА и РСК – лишь при переисследовании проб сывороток крови животных с положительными и сомнительными результатами ИФА.

Ее использование позволяет значительно сэкономить время, затрачиваемое на проведение исследований, учет и интерпретацию полученных результатов, упростить и повысить объективность и воспроизводимость этих процессов за счет их инструментального обеспечения, а также обеспечить высокую безопасность (за счет исключения прямого контакта с антигеном, автоматического пипетирования проб и др.).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Косилов И.А., Аракелян П.К., Димов С.К., Хлыстунов А.Г. Бруцеллез сельскохозяйственных животных / под ред. И.А. Косилова. – Новосибирск, 1999. – 344 с.
2. Каликин И.Н., Дегтяренко Л.В., Карлова М.Ю., Скляр О.Д. Усовершенствование серологической экспресс-диагностики бруцеллеза животных // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2012. – № 1. – С. 93–98.
3. Хаиров С.Г. РНГА в диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота / Вестн. ветеринарии. – 2005. – Т. 32. – С. 18–26.
4. Ромахов Б.Н., Малышева Л.А., Руденко В.П. Испытание РНГА с эритроцитарным антигеном для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота и овец // Вет. патология. – 2008. – № 1. – С. 73–76.
5. Пат. № 2152035 от 27.06.2000 г. (Российская Федерация). Способ диагностики бруцеллеза / З.Ф. Богаутдинов, Е.С. Вылегжанина, В.Б. Кузьмина, Т.С. Астахова, У.Э. Ниязов, К.В.Шумилов. – Номер заявки 99117990/13; заявл. 18.08. 1999; опубл. 27.06.2000; Бюл. № 18.
6. Пат. № 2203499 от 27.04.2003 г. (Российская Федерация). Способ постановки диагностической реакции при бруцеллезе / П.Е. Игнатов, А.И.Федоров, Л.П. Мельниченко. – Номер заявки 2001124871/13; заявл. 12.09. 2001; опубл. 27. 04. 2003.; Бюл. № 12.

Поступила в редакцию 12.05.2014

**A.S. DIMOVA, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher,
A.A. SIZOV, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher,
S.K. DIMOV, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Laboratory Head,
G.M. STEBLEVA, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Scientific Secretary,
N.I. KURENSKAYA, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher,
D.A. SIZOV, Junior Researcher,
D.P.MELNIKOV, Applicant,
P.K. ARAKELIAN*, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Laboratory Head,
A.A. GRITSAN**, Director,
I.N. EMELYANOVA**, Department Head**

*Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East,
Russian Academy of Agricultural Sciences,*

** All-Russian Research Institute of Brucellosis and Tuberculosis in Animals,
Russian Academy of Agricultural Sciences,*

***Tomsk Regional Veterinary Laboratory*

e-mail: referent@ievsvd.ru

THE RAPID METHOD FOR MASS DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN ANIMALS BASED ON ELISA

A new ELISA test system for diagnosis of brucellosis in animals has been developed. Results obtained from studies demonstrate that this test system can be employed in many animal species,

including sheep and cattle, even when used live vaccines against brucellosis derived from weakly agglutinogenic and agglutinogenic strains. It has been found that the new ELISA test system absorbs readings of the indirect agglutination test, relating to rapid methods, as well as of formal classical diagnostic complex (agglutination test, AT, + complement fixation test, CFT), is not inferior to them in specificity and superior to them in diagnostic activity. Advantages have been revealed associated with reducing time for research, recording and interpretation of results, with simplifying these processes and increasing their objectivity, reproducibility and safety. Introduction of the new test system to practice of screening tests for brucellosis was proved to greatly simplify mass diagnosis of this disease, since the AT+CFT complex and additional differential postvaccinal diagnosis should be employed only in a case of detecting positive or doubtful readings.

Keywords: brucellosis, cattle, sheep and goats, vaccination, diagnosis, rapid tests, diagnostic ELISA test systems, diagnostic activity.

УДК 636.32:619:576.8:618.19

Б.Н. ГОМБОЕВ, кандидат ветеринарных наук, заведующий отделом,
Р.З. СИРАЗИЕВ, доктор биологических наук, заместитель директора

*ГНУ Научно-исследовательский институт ветеринарии Восточной Сибири
Россельхозакадемии
e-mail: vetinst@mail.ru*

РОЛЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ ПРИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ МАСТИТАХ ОВЦЕМАТОК

Представлены результаты исследований неспецифических маститов у лактирующих овцематок. Описаны формы их проявления и этиологическая роль условно-патогенной микрофлоры при заболеваниях молочной железы. Смешанные формы микроорганизмов преобладали над монокультурами (соответственно 88,96 и 11,04 %) и состояли из двух, реже трех видов микроорганизмов. Конкретного возбудителя, обладающего специфическими свойствами вызывать те или иные формы мастита у лактирующих овцематок, не выявлено. Среди патогенных монокультур наиболее часто обнаруживалась синегнойная палочка (46,15 %). По степени патогенности доминировали монокультуры золотистого и эпидермального стафилококков (*Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*), соответственно 20,37 и 19,44 %. Маститный (выменной) стрептококк (*Streptococcus uberis*) и кишечная палочка (*E. coli*) в моновариантах идентифицированы соответственно в 19,04 и 18,18 % случаях от числа выделенных культур.

Ключевые слова: молочная железа, овцематки, диагностика, неспецифические маститы, условно-патогенная микрофлора.

Маститы (Mastitis) – воспаление молочной железы – сложная реакция организма, развивающаяся как следствие воздействия механических, термических, химических и биологических факторов, проявляющаяся патологическими изменениями как в самих тканях, так и в секрете молочной железы животного [1].

Одним из главных этиологических факторов широкого распространения маститов у овец являются травматические повреждения молочной железы, наносимые ягнятами, нарушения целостности кожи сосков и самой молочной железы, что служит воротами для внедрения в организм животных условно-патогенной микрофлоры. Способствуют инфицированию неблагоприятные условия содержания животных и наличие высоковирулентных микроорганизмов в местах скопления овец.