

ОБОСНОВАНИЕ АЛГОРИТМА ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА БРУЦЕЛЛЕЗ, СПРОВОЦИРОВАННЫХ КОНТАМИНАЦИЕЙ ЖИВОТНЫХ ИЕРСИНИЯМИ

Ивановская Л.Б.

Сумской национальный аграрный университет
г. Сумы, Украина

В работе представлены материалы по дифференциальной лабораторной диагностике при выявлении неспецифических реакций на бруцеллез у животных, организм которых контаминирован иерсиниями. Разработан алгоритм, включающий клинико-эпизоотологические, серологические и микробиологические исследования, направленные на верификацию диагноза при выявлении в стаде единичных животных, реагирующих в серологических реакциях с бруцеллезным антигеном.

The paper contains materials regarding the differential laboratory diagnostics during the determination of non-specific brucellosis reactions in animals, contaminated with Yersinia. The algorithm has been developed, based on clinical, epizootic, serological and microbiological research directed towards the verification of the diagnosis when single animals in the herd demonstrate positive serological reaction to brucellosis antigen.

Ключевые слова: бруцеллы, иерсинии, антиген, дифференциация, неспецифические реакции.

Key words: Brucella, Yersinia, antigen, differentiation, non-specific reaction.

Введение. Дифференциация серологических реакций при выявлении в стаде единичных животных, которые реагируют с бруцеллезными диагностикумами имеет важное значение. На существование перекрестных серологических реакций между *Y. enterocolitica* сероварианта 09 з бруцеллами указывают ряд исследователей [3,10,11,12].

Антигенное родство между *Y. enterocolitica* и *Brucella* требует дифференциации этих заболеваний, а частое появление соответствующих позитивных серологических реакций, при исследовании животных в благополучных хозяйствах, может быть сигналом их неблагополучия относительно иерсиниоза. Исследователи считают, что проблема перекрестных реакций между бруцеллами и иерсиниями связана с диссоциацией иерсиниозной культуры, о чем свидетельствует факт антигенного родства R-формы *Y. enterocolitica* сероварианта 09 с бруцеллами [3,11,12]. Известны некоторые фенотипические проявления изменений, которые происходят в бактериальной клетке при переходе от низкой температуры к температуре организма животного или человека. К таким явлениям и относится диссоциация. В естественных, и особенно лабораторных условиях, *Y. enterocolitica* образует клетки разных типов – S или R. Антигенная структура бактерий *Y. enterocolitica* зависит от формы данной культуры – S или R. С диссоциативными изменениями у штаммов бактерий изменяются их вирулентные и антигенные свойства, поэтому антигенный состав необходимо изучать как у S-, так и у R- форм *Y. enterocolitica*. Специфическая S-сыворотка, полученная на S-форму *Y. enterocolitica* сероварианта 09, не давала позитивных реакций с бруцеллезными антигенами, в то время как R - сыворотка реагировала с бруцеллезными антигенами в пластинчатой и пробирочной РА, РСК и ИФА [3,9].

Das A., Paranjape V. считают, что все животные с позитивными титрами к *Br. abortus* должны быть исследованы и на *Y. enterocolitica* – инфекцию [10]. Nattermann H. et al предлагали при выявлении позитивных реакций на бруцеллез исключать возможность инфицирования животных *Y. enterocolitica* [8]. К этому же выводу склоняются и некоторые другие исследователи [10,11,12]. Проблема осложняется и тем, что кроме перекрестных реакций бруцелл с *Y. enterocolitica* 09, возникают такие реакции и с другими серовариантами иерсиний: 03, 06, 022, 028, 035, 046 [1,2,4-7].

Подобные проблемы уже не первый год изучают в странах ЕС. Так, в Бельгии и Франции, странах свободных от бруцеллеза, в течение 4 лет (1992-1996) возросло количество стад крупного рогатого скота, где позитивно реагировали животные на бруцеллез при отсутствии клинических признаков бруцеллеза. Возбудителя *Br. abortus* не выделяли ни в одном из случаев. На этом основании результаты серологических исследований были квалифицированы, как неспецифические, ошибочные. Исследованиями было доказано, что серопозитивность сывороток животных была связана с кишечным иерсиниозом (09) [11,12].

Для дифференциальной диагностики этих инфекций предложены, кроме РА, ELISA – тест, метод иммуноблотинга [9] и другие, но каждый из методов имеет как преимущества, так и недостатки. Широкому применению методов ELISA и иммуноблотинга в Украине препятствует недостаточное оснащение соответствующим оборудованием и реактивами в диагностических лабораториях. Поэтому для дифференциации единичных случаев позитивно реагирующих сывороток с бруцеллезным антигеном используют разработанный в ННЦ «ИЭКВМ» набор компонентов для серологической диагностики иерсиниозов животных и, в первую очередь, серовариантов 09 и 06.30 [2,6].

Целью нашей работы являлась разработка алгоритма исследований при дифференциации у животных неспецифических реакций на бруцеллез, спровоцированных контаминацией их организма иерсиниями.

Материалы и методы. Подвергнуты анализу литературные данные, а также результаты многолетних собственных серологических исследований, касающихся гетероспецифичности и дифференциации при плановых иммунологических исследованиях животных на бруцеллез. Использованы эпизоотологические данные, результаты собственных серологических исследований (РА, РБП, РСК)

сывороток продуктивных и лабораторных животных, проведена оценка исследований ряда лабораторий при выявлении неспецифических реакций на бруцеллез.

Результаты исследований. Нами последние годы экспериментально и в условиях хозяйств доказана этиологическая роль ряда грамотрицательных бактерий в появлении гетероспецифичности при серологических исследованиях на бруцеллез. Гетероспецифичность была обусловлена наличием антигенно родственного липополисахаридного компонента в бактериальной клетке бруцелл и некоторых представителей широко распространенных бактерий (*Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Pasteurella* и др.). Следует заметить, что все эти бактерии, как и бруцеллы, могут быть причиной абортов у животных. Как показали исследования, циркуляция этих возбудителей среди животных может маскировать начальную фазу бруцеллеза в стаде, особенно среди молодняка, усложняя диагностику. Поэтому каждый раз при выявлении единично реагирующих на бруцеллез животных приходилось проводить комплекс дифференциально-диагностических исследований, составной частью которых является проведение иммунологических исследований сывороток с иерсиниозными антигенами.

Гетероспецифические серологические реакции с бруцеллезным антигеном чаще всего выявляли при плановых исследованиях половозрелого молодняка обоих полов, реже у взрослых или животных другого возраста. Было установлено, что скученное содержание, водопой из прифермских непроточных водоемов, скормливание большого количества зеленой массы с участков, при поливе которых использовалась вода из отстойников или выносился жидкий навоз, попадание в организм эстрогенов при скормливании большого количества зеленой массы или использование лекарственных препаратов эстрогенного действия, транспортировка, выгон весной на пастбище, скормливание недоброкачественных кормов, особенно животного происхождения, рыбной муки, яичного боя, иммунодепрессивное влияние вакцинных препаратов и т.п. способствуют активации латентной кишечной инфекции у бактерионосителей или поступлению в организм большого количества указанных возбудителей из внешней среды. Как следствие, выявляли развитие бактериемии и появление у части животных иммунного ответа в виде гетероспецифических серологических реакций на бруцеллез.

В этих случаях, как правило, перекрестные титры антител в РА с бруцеллезными антигенами были не высокими, обычно на нижнем диагностическом уровне, не имели тенденции к распространению в стаде и через 2-4 недели после выявления у большинства животных снижались или исчезали. Однако, у отдельных животных позитивные или сомнительные реакции сохранялись в течение 2-3 последующих исследований на бруцеллез через 15-20 дней. Это в равной степени относилось и к результатам исследований в РБП и РСК. При этом выявляли, что наряду с совпадением результатов по двум или трем реакциям, одни реакции могут сохраняться, другие – исчезать. У животных, которые абортировали, в этих случаях серологические исследования на бруцеллез парных сывороток с интервалом 15-20 дней было негативными, что является важным дифференциальным отличием для исключения бруцеллезной этиологии абортов.

Как показали дальнейшие исследования, в большинстве случаев (за исключением носительства *Yersinia enterocolitica* сероварианта 09) при выявлении в благополучных хозяйствах единичных животных, которые реагировали в РА в диагностических титрах, неспецифические реакции в РА можно ликвидировать путем дополнительных исследований таких сывороток с антигеном обработанным ЭДТА (трилон Б). Это позволило значительно ускорить подтверждение или исключение бруцеллеза в хозяйстве (на ферме), сохранить здоровых племенных животных, предотвратить затраты на дополнительные исследования для уточнения диагноза и на проведение ограничительных мер. Для исключения бруцеллеза в случае носительства *Yersinia enterocolitica* сероварианта 09 животных исследовали аллергическим методом (пальпебральной или внутрикожной пробой с бруцеллином ВИЭВ, реакцией лизиса лейкоцитов), проводили серологические исследования сывороток крови и бактериологические исследования с целью выделения возбудителя.

Изучая эти вопросы, мы в своих исследованиях получили позитивные перекрестные реакции у 5,1% телок как с антигеном 09, так и с антигеном 06.30. В сыворотках от телок случного возраста процент позитивно реагирующих был большим и составлял 9,2% и 7,7% случаев соответственно. При исследовании сывороток от овец позитивных перекрестных реакций и иерсиниозными антигенами не устанавливали, а сыворотки коз реагировали со всеми тремя антигенами в 100% случаев. Среди лошадей, позитивно реагировавших на бруцеллез (92 головы), нашими исследованиями в развернутой РА показано, что эти реакции преимущественно были связаны с присутствием антител к антигенам *Y. enterocolitica* разных серовариантов. Наиболее часто сыворотки реагировали с антигеном серовариантов 06.30 (37%) и 09 (21,7%) и только в 7,6% случаев с серовариантом 03. При исследовании 52 проб сывороток крови крупного рогатого скота, реагировавших в РА и РСК с бруцеллезными диагностикумами, с оригинальными формолантигенами 09 реагировали 34,6% в титрах 1:200-1:800; с 06.30 – 38,5% (1:200 – 1:1600). Таким образом, было доказано, что реакции с бруцеллезными диагностикумами у этих животных были обусловлены наличием *Y. enterocolitica* серовариантов 09 и 06.30.

В лабораторных исследованиях на кролях, которым вводили живые культуры иерсиний серовариантов 03, 06.30 и 09, выявили высокую степень родства между штаммами Br.abortus 19, из которого изготавливают фабричный антиген, и *Y. enterocolitica* серовариантов 09 и 03. Подкожное заражение морских свинок иерсиниями серовариантов 09 и 06.30, а также бруцеллами вызывало незначительный подъём уровня антител к обоим антигенам. При сравнительном исследовании морских свинок через 30 дней после инокуляции культуры иерсиний (5 млрд. м. к.) или бруцелл (2 млрд. м. к.) устанавливали перекрестную реакцию в РА.

При использовали бруцеллина ВИЭВ в благополучных по бруцеллезу хозяйствах при выявлении позитивных реакций с единственным бруцеллезным антигеном в РА и РСК, а также в РБП у свиней и крупного рогатого скота. У исследованных животных позитивный результат на бруцеллез (РА, РСК, РБП) у части животных сохранялся и при повторном исследовании через 15 – 20 дней и больше, что было основанием

для постановки диагноза на бруцеллёз и в условиях благополучия зоны по бруцеллёзу проведения оздоровительных мероприятий (санитарный забой всех животных подозреваемых в заражении и т.д.). Однако, при дополнительном исследовании с R-бруцеллином, проведении диагностического забоя и бактериологических исследований с постановкой биопробы на морских свинках путем инокуляции материала от реагирующих в серологических реакциях животных, была получена негативная аллергическая проба, и культура бруцелл не выделена, но в четырёх случаях изолировали культуру *Y. enterocolitica*.

На основании вышеизложенного необходимо был разработан алгоритм таких исследований, который включал полный спектр доказательной базы, позволяющей осуществить верификацию диагноза (рисунок 1).

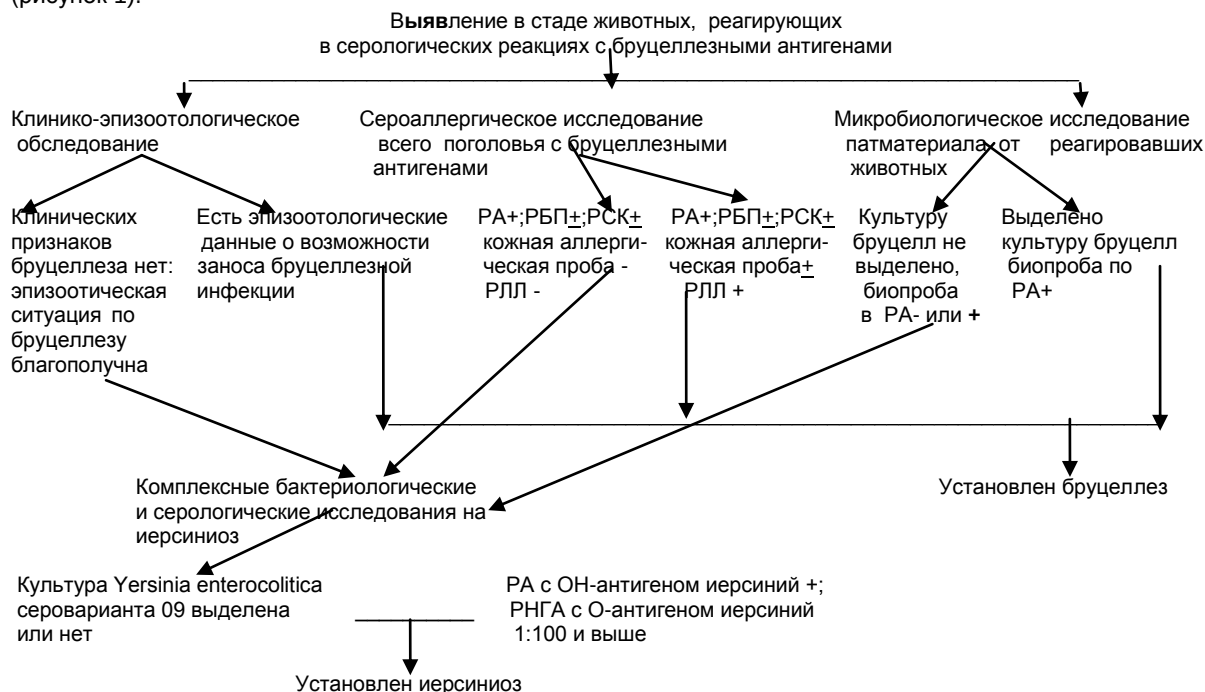


Рисунок 1 - Дифференциация бруцеллеза и иерсиниоза в областях благополучных по бруцеллёзу

Заключение. При выявлении единично реагирующих на бруцеллез животных доказана необходимость проведения комплекса дифференциально-диагностических исследований, составной частью которого являются серологических исследования сывороток крови с иерсиниозными антигенами.

Литература. 1.Бабкин А.Ф., Соболев Н.М., Орлова В.А., Ивановская Л.Б. Серологическая и бактериологическая индикация иерсиний у животных //Ветеринария. - К.: 1988.-В.63.-С.20-24. 2. Бабкін А.Ф. Методичні рекомендації з ієрсиніозу тварин (діагностика, диференційна діагностика неспецифічних реакцій з бруцельозними діагностикумами) /А.Ф.Бабкін, Л.Б.Івановська.-Суми: СНАУ, 2005.-28 с. 3. Бусол В.А. Этиология перекрестных реакций при бруцеллезе и их дифференциация /В.А.Бусол, А.Ф.Бабкин, П.Н.Жованик //В кн: Бруцеллез сельскохозяйственных животных.- К.:Урожай,1991.-С.146-161. 4. Івановська Л.Б. Вивчення перехресних серологічних реакцій між бактеріями *Y. enterocolitica* і *Brucella* //Л.Б.Івановська. - Вісник Сумського ДАУ, серія «Ветеринарна медицина».-2001.-Вип.6.-С.52-54. 5. Івановська Л.Б. Об этиологии неспецифических реакций на бруцеллезный антиген у лошадей //Л. Б. Ивановская //Материалы II НПК по болезням лошадей (Москва, 21 - 22.09.2001). - С.21. 6. Івановська Л.Б. Епізоотологічний моніторинг та розробка серологічної діагностики ієрсиніозу тварин //Л. Б. Івановська. - Дис. ... канд. вет. наук. - Х., 2007. - 239 с. 7. Методические рекомендации по уточнению диагноза и профилактике заболевания при выявлении в стаде единичных животных, реагирующих с бруцеллезными диагностикумами / Бабкин А. Ф., Яновская Р.Э., Орлова В.А., Ивановская Л.Б.-К.:Урожай,1990. -16 с. 8.Намтерман Х., Хорш Ф. Этиология и патогенез иерсиниоза //Ветеринария.-1987.-№10.-С.76-78. 9.Шумилов К.В. Современные данные об иерсиниозе животных //К.В.Шумилов, Л.П.Мельниченко, В.В.Селивестров //Ветеринария.-1998.-№4.-С.7-13. 10. DasA. Seroprevalence of *Yersinia enterocolitica* associated abortion in buffaloes with reference to its serological cross reaction with *Brucella abortus* /A.Das,V.Paranjape //Indian. Vet. J.-1988.-V.65.-№6.-P.469-474. 11. Kittelberger R. Serological cross reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9-infected cattle /R.Kittelberger, M.Reichel, C.Staak et al //Vet.Microbiol -1997.-V.57.-№4.-P.361-371. 12.Weynants V. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* 0:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests /V. Weynants, A.Tibor, P. Denoel et al // Vet. Microbiol. -1996.-V.48.-№1-2.-P.101-112.

GROUNDING OF THE RESEARCH ALGORITHM DURING THE DIFFERENTIATION OF NON-SPECIFIC BRUCELLOSIS REACTIONS, CAUSED BY YERSINIA CONTAMINATION IN ANIMALS

Ivanovska Ludmila Borisovna
Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

E.mail: lusia-iv@list.ru

Адрес: 40021, Украина, г. Сумы, ул. Г.Кондратьева, 160