



Единый Бруцеллезный Антиген Для Ра, Рск И Рдск И Способ Его Получения

1. Улугмурадов Азамат
Даминович

Received 27th Aug 2021,
Accepted 29th Sep 2021,
Online 08th Oct 2021

¹ докторант-исследователь, Научно-исследовательский институт ветеринарии Республика Узбекистан

Аннотация: В статье представлен способ получения единого бруцеллезного антигена для РА, РСК и РДСК, снижение его себестоимости за счет более высокой урожайности бактериальных клеток в процессе культивирования и использования местных компонентов, что позволяет повысить эффективность противобруцеллезных мероприятий в Республике.

Ключевые слова: бруцеллез, патогенность, инфекция, реакция агглютинации, антиген, диагностикумы, эффективность.

Введение. Создание и обеспечение отечественными диагностикумами является важной частью системы противобруцеллезных мероприятий имеющих социально-экономическое значение для страны.

Бруцеллез относится к особо-опасным зоонозным инфекциям и относится ко второй группе по патогенности. Заболевание с инфекционно-аллергическим проявлением, трудно поддается лечению, поражает практически все органы и системы организма. Возбудителем бруцеллеза являются микроорганизмы, относящиеся к роду *Brucella*. В Узбекистане циркулируют в основном 1,3,6 биотипы, относящиеся к виду *Brucella abortus* (основной хозяин возбудителя – крупный рогатый скот), 1,2 биотипы вида *Brucella melitensis* (основной хозяин возбудителя – козы и овцы).

Контроль благополучия хозяйств, при карантинировании завозных животных, при отборе здоровых животных при комплектовании стад, выявление очагов инфекции, определение степени распространения болезни и проведение противобруцеллезных мероприятий могут быть выполнены только на основе доступности, эффективных диагностикумов и правильного их использования [1].

Известен антиген, приготовленный из штамма *Brucella abortus* 1913/100, предназначенного для изготовления препаратов для диагностики бруцеллеза (патент RU № 2149183) [2]. Недостатком указанного антигена являются: 1. Антиген предназначен для количественного определения в пробирочной реакции агглютинации; 2. Антиген является дорогим, т.к. импортный.

Известен цветной бруцеллезный антиген, приготовленный из штамма *Brucella abortus* 104-М, инактивированный 0,5%-ным раствором фенола в буферном растворе (рН 3,7-3,75) при 85-90°C и красителя. При этом предложенный цветной вакцинный бруцеллезный штамм содержит

штамм *Brucella abortus* 104-М с концентрацией бактериальной массы в гомогенной смеси 8,0-8,5 % от объема взвеси, а в качестве красителя -1%-ный раствор сафранина [3]. Недостатками антигена являются: 1. Сложность приготовления буферного раствора; 2. Длительность приготовления антигена; 3. Использование химического анилинового красителя сафранина, который при хранении экстрагируется и влияет на стандартность.

Известен единый бруцеллезный антиген для РА, РСК и РДСК, применяемый для серологической диагностики бруцеллеза животных, который представляет собой взвесь инактивированных нагреванием бруцелл в фенолизированном физ. растворе. Для изготовления антигена для РА, РСК, РДСК используют вакцинный штамм *Brucella abortus* 19. Посев производят увлажнением питательной среды посевным материалом, после чего четверти помещают в термостат при температуре 37°C на трое суток. Разведение суспензии проводят 0,5%-ным карболизированным физиологическим раствором. Активность антигена в РА устанавливают, если в разведение 1:5 с конечным разведением стандартной бруцеллезной сыворотки 1:500 дает 50% агглютинации (+) [4]. Недостатками являются: 1. При изготовлении антигена используется сложная питательная среда; 2. Дороговизна и сложности с приобретением производственного штамма.

Целью статьи является получение единого бруцеллезного антигена для РА, РСК и РДСК, снижение его себестоимости, путем применения местных компонентов и наличие признака маркера.

Сущность методики заключается в том, что, единый бруцеллезный антиген для РА, РСК и РДСК, культивируют в течение 48 ч [4] питательной среде, дополнительно включающей стимулятор роста - нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота и состоит из инактивированной фенолом суспензии штамма *Brucella abortus* 104-М- вариант UZ, биотип – 6, селекционированного в местных экологических условиях НИИВ в концентрации бактериальных клеток 40-45 млрд.кл./см³ с наличием признака маркера (не продуцирует H₂S).

Причинно-следственная связь между совокупностью существенных признаков антигена и достигаемым техническим результатом, заключается в том, что повышается доступность диагностикума, качество антигена, за счет высокой агглютинабельности штамма *Brucella abortus* 104-М- вариант UZ, биотип-6, снижается его себестоимость, за счет более высокой урожайности бактериальных клеток в процессе культивирования и использования местных компонентов, сокращается время приготовления за счет сокращения операций, и безопасность для обслуживающего персонала, за счет авирулентности штамма. Антиген не содержит живых бактерий, является стерильным, высокоактивным и высокоспецифичным.

Предлагаемый единый бруцеллезный антиген для реакции РА, РСК и РДСК, отличается от аналогов тем, что:

1. В аналоге применяют известный штамм *Brucella abortus* 19, а не новый штамм *Brucella abortus* 104-М-вариант UZ, биотип –6;
2. В предлагаемом антигене концентрация бактериальных клеток составляет 40-45 млрд/см³, в аналоге [3] 8,0-8,5 % от объема взвеси.
3. В предлагаемом антигене применяют нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота в качестве стимулятора роста, а в НБА нет.

Полученные результаты.

Опыты проводили в условиях лаборатории бруцеллеза НИИВ в 2018-2019 гг. с опытными и производственными сыворотками крови крупного и мелкого рогатого скота из хозяйств

Самаркандской, Джизакской, Хорезмской областей и Республики Каракалпакстан с различной эпизоотической обстановкой по бруцеллёзу.

Для изготовления бруцеллезного антигена культуру штамма *Brucella abortus* 104-М-вариант UZ, биотип-6 культивировали на твердой питательной среде МППГГА, засеивали на агар в пробирки и просматривали на чистоту роста. Использовали для посева взвесь 2-х суточной агаровой культуры, после чего засеянные колбы помещали в термостат при $T=37^{\circ}\text{C}$ на двое суток.

В среду МППГГА добавляли 4 мл стимулятора роста-нормальной сыворотки крови крупного рогатого скота на 100 мл среды. Засеянные колбы помещали в термостат при $T=37^{\circ}\text{C}$ на двое суток. После окончания выращивания колбы с чистым ростом культуры отбирали для смыва. В результате получены колонии типичные для – S форм (по Уайт-Вилсону), остальные выбраковывали. Полученную культуру инактивировали нагреванием в течение 45 мин при $T=70^{\circ}\text{C}$ в 0,5%-ном фенолизированном физиологическом растворе, стабилизировали в холодильнике при $T=+4^{\circ}\text{C}$ в течение 5 дней. Одновременно ее проверяли на чистоту и стерильность, путем высева на МППА и МППБ. Посторонняя микрофлора не обнаруживалась. Осадок дополнительно ресуспензировали 0,5%-ным фенолизированным физиологическим раствором до первоначального объема.

Для приготовления 10 л антигена брали 0,4 л антигена, который разбавляли 9,6 литрами 0,5%-ного фенолизированного физиологического раствора до получения концентрации бруцелл в суспензии равной 40 млрд. клеток/см³. По внешнему виду антиген представляет собой суспензию бело-молочного цвета, которую разливали в 10, 20, 50 мл стеклянные флаконы.

Антиген хранят в закрытых помещениях, в сухом темном месте не ниже 4°C и не выше 10°C . При хранении в указанных условиях срок годности препарата составляет 2 года. Перед применением флаконы с антигеном тщательно встряхивают для получения равномерной суспензии, а в холодное время года предварительно подогревают в водяной бане при температуре + $30-35^{\circ}\text{C}$. Антиген считают специфичным, если в разведении 1:10 в РА он не агглютинирует с физиологическим раствором или негативной сывороткой в разведениях 1:25. Стандартизированный в РА антиген используется в РСК в рабочем разведении 1:150. Антиген выпускают, если в РА его разведение 1:10 с конечным разведением стандартной бруцеллезной сыворотки 1:500 дает 50% агглютинации (++) ; Учет реакции агглютинации. Результаты реакции учитывают визуально и определяют в крестах по следующей схеме: ++++ (4 креста)- (100% агглютинации); +++ (3 креста)- (75% агглютинации); ++ (2 креста)- просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен 50% агглютинации. 2. В РСК – дает полную задержку гемолиза с положительной бруцеллезной сывороткой в ее предельном титре при разведении антигена не ниже чем 1:75. Рабочий титр антигена в РА-1:10, в РСК -1:150. Антиген считают специфичным, если в разведении 1:10 в РА он не агглютинирует с физиологическим раствором или негативной сывороткой в разведениях 1:25. Стандартизированный в РА антиген используется в РСК в рабочем разведении 1:150. Антиген, обладающий самоагглютинирующими, самозадерживающими и гемотоксическими свойствами для использования не пригоден.

Активность единого бруцеллезного антигена для РА, РСК и РДСК, прототипа и аналога - цветного антигена по патенту № UZ IAP 03422 приведена в таблице 1.

Таблица 1.- Активность предлагаемого единого бруцеллезного антигена для реакции РА, РСК и РДСК, НБА по патенту № UZ IAP 03422

Характеристика	Кол-во проб	НБА			Предлагаемый антиген		
		Полож.	Сомн.	Отр.	Полож	Сомн	Отр.
Сыворотка крови от коров с различной эпизоотической ситуацией по бруцеллезу	1536 проб	10	-	-	10	-	-

Результаты, приведенные в таблице 1 показывают, что предлагаемый антиген и НБА выявляли одинаковое количество, т.е. 10 положительно реагирующих проб сывороток из 1536 исследованных, что свидетельствует об их одинаковой активности. В таблице 2 приведен сравнительный анализ НБА, аналога и предлагаемого антигена.

Таблица 2.-Сравнительный анализ НБА, аналога и предлагаемого бруцеллезного антигена

№	Показатели	Антиген по Патенту № UZ IAP 03422	Н.Б.А.	Предлагаемый антиген
1.	Производственные штаммы для приготовления антигена	Штамм Brucella abortus 104-М	Штаммы Brucella abortus 19	Штаммы Brucella abortus 104-М - вариант UZ, биотип – б
2	Время культивирования	72 час	72 час	48 ч.
3	Инактивация	При 85-90 ⁰ С в течение 60 мин. в 0,5% фенолиз. буферном физрастворе	При 80 ⁰ С в течение 60 мин. в 1%-ном карболиз. физрастворе	При 75 ⁰ С в течение 45 минут в 0,5%-ном фенолизирован-ном физрастворе
4	Специфичность и активность,%	100	100	100
5	Качество	Высокое	Высокое	Высокое
6	Доступность	доступный	коммерческий	доступный
7	Стоимость, сум за 1 литр (по цене 2020г.)	1,5 млн. сум за литр.	1млн.сум за литр.	750 тыс. сум за литр.

Как видно из таблицы 2, предлагаемый антиген является доступным, качественным, активным, экономичным и сокращается время для его приготовления.

Были проведены производственные (комиссионные) испытания по Республике Узбекистан.

Для исследования в РА, РСК и РДСК брали 1536 проб сыворотки крови от коров, различных эпизоотических групп и не больных другими болезнями из разных хозяйств РУз. Антиген является активным и специфичным и может быть применен в ветеринарной практике для выявления острых форм бруцеллёза в качестве дополнительного ускоренного теста при исследовании сывороток крови других видов животных (собаки, кошки, пушные звери и др.) и может быть использован для оценки качества иммунизации животных противобруцеллезными вакцинами (состояние иммунитета), выявления толерантных (группа риска) животных и оценки благополучия дойных стад.

Антиген является высококачественным, имеет низкую себестоимость, за счет более высокой урожайности штамма 104-М - вариант UZ, биотип-6, уменьшения времени его приготовления за счет сокращения операций и безопасности для обслуживающего персонала.

Антиген является стерильным, активным и специфичным.

Срок годности антигена 2 года со дня приготовления при условии хранения его в сухом темном месте при температуре не выше 10° С.

Ежегодная потребность РУЗ в едином бруцеллезном антигене для реакции РА, РСК и РДСК находится в пределах 750-800 л при расходе рабочего разведения 1:10 в объеме 0,5 мл на 1 пробу для однократного исследования.

В виду отсутствия производства данного вида антигена аналог завозится из-за рубежа производство отечественного антигена для проверки позволит решить данную социальную и экономическую проблему заболевания людей бруцеллёзом и повысить эффективность противобруцеллезных мероприятий в Республике. Стоимость коммерческих аналогов различных производителей составляет около 100-120 долларов США без затрат на доставку из-за рубежа и таможенные расходы. Только при плановых государственных противоэпизоотических мероприятиях требуется порядка 750-800 литров данного диагностикума.

Выводы:

1. Антиген можно использовать в РСК разведении 1:150 и позволяет сократить расход препарата в два раза.
2. Антиген является высококачественным, имеет низкую себестоимость.
3. Получен патент на полезную модель **UZ № FAP 01652**, 2021г.
4. Производство отечественного антигена для проверки позволит решить социальную и экономическую проблему заболевания людей бруцеллёзом в Узбекистане и повысить эффективность противобруцеллезных мероприятий в Республике.

Список литературы

1. Рузимуродов М.А. Новые инфекционные подходы в борьбе с бруцеллезом, ж. Ветеринария тиббиёти, 2018, № 2, с.14-15.
2. Патент RU № 2149183.
3. Патент UZ № IAP 03422.
4. «Ветеринарные препараты» справочник под ред. Д.Ф.Осидзе, с.181-183.