

АПРОБАЦИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ

О. И. ЗАХАРОВА, соискатель,
Е. С. СЛЕПЦОВ, доктор ветеринарных наук, профессор,
Н. В. ВИНОКУРОВ, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М. Г. Сафронова
(677001, г. Якутск, ул. Б-Марлинского, д. 23/1)

Ключевые слова: бруцеллез, инфекционный процесс, иммунитет, штамм, эпизоотический процесс, вакцина.

В статье изложены результаты апробации иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител при диагностике бруцеллеза северных оленей, проведенного в лаборатории оленеводства и традиционных отраслей Якутского НИИ сельского хозяйства и на опытной базе ФГБНУ Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко. С положительными и сомнительными реакциями с помощью комплекса РА + РСК было выявлено 29 проб – 8,2 % из числа исследованных, с помощью ИФА – 35 проб – 10 % (показания ИФА полностью совпали с показаниями РА + РСК; дополнительно к РА + РСК выявлено 6 проб – 1,7 % из числа исследованных). Во всех 35 пробах с положительными и сомнительными реакциями в РА + РСК и/или ИФА был получен отрицательный результат в РИД с О-ПС антигеном, что свидетельствует об отсутствии в обследуемых стадах эпизоотически опасных в отношении бруцеллеза животных. В ИФА из 25 исследуемых сывороток крови показали положительный результат 8 проб (показатели оптической плотности 1,362–2,063), что свидетельствует о полном соответствии показаний ИФА показаниям РНГА и диагностическому комплексу РА + РСК и большей диагностической чувствительности ИФА по сравнению с указанными реакциями в отношении выявления антител к бруцеллам. Результаты исследования показали высокую специфичность и эффективность тест-системы ИФА на основе моноклональных антител при выявлении инфицированных бруцеллезом северных оленей, чем общепринятые тесты.

APPROBATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WITH MONOCLONAL ANTIBODIES IN THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS OF REINDEER

O. I. ZAKHAROVA, external doctoral candidate,
E. S. SLEPTSOV, doctor of veterinary science, professor,
N. V. VINOKUROV, candidate of veterinary science, senior researcher,
Yakut Scientific Research Institute of Agriculture named after M. G. Safronov
(23/1 B-Marlinskogo Str., 677001, Yakutsk)

Keywords: brucellosis, infection process, immunity, strain, epizootic process, vaccine, reindeer.

In the article results of approbation of ELISA based on monoclonal antibodies in the diagnosis of brucellosis of reindeer conducted in the laboratory of reindeer breeding and traditional branches of the Yakut Scientific Research Institute of Agriculture and on the experimental base of the Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary of Y. R. Kovalenko. Positive and questionable reactions with the help of agglutination reaction (AR) + complement fixation reaction (CFR) complex, 29 samples were detected – 8.2 % from the number of investigated, with the help of ELISA-35 samples – 10 % (the ELISA test fully coincided with the readings of AR + CFR, in addition to AR + CFR, 6 samples – 1.7 % of those studied). In all 35 samples with positive and questionable reactions in AR + CFR and/or ELISA, a negative result was obtained in the immunodiffusion reaction (IR) with O-polysaccharide antigen, which indicates the absence of epizootically dangerous animals in the surveyed herds. In ELISA, of the 25 test sera, a positive result of 8 samples was shown (optical density of 1.362 – 2.063), which indicates the complete compliance of the ELISA indicators with the indirect hemagglutination reaction (IHGR) and the diagnostic complex AR + CFR and the greater diagnostic sensitivity of ELISA compared to the indicated antibody detection to brucella.

Положительная рецензия представлена И. И. Бочкаревым, доктором биологических наук, профессором, заведующим кафедрой паразитологии и эпизоотологии животных Якутской государственной сельскохозяйственной академии.

Бруцеллез северных оленей на Крайнем Севере Российской Федерации имеет широкое распространение, является значительным сдерживающим фактором дальнейшего развития оленеводства и продолжает представлять серьезную социальную опасность. Не менее важным является ликвидация бруцеллеза в эпидемиологическом отношении, так как больные бруцеллезом животные являются источником инфекции для людей. Однако, болезнь представляет большую проблему, требует значительных трудозатрат и материальных средств на проведение комплекса ветеринарно-санитарных и организационно-хозяйственных мероприятий. Для диагностики бруцеллеза у животных используют бактериологический, серологический и аллергический методы исследований с учетом клинических признаков болезни и эпизоотологических данных. Серологический метод является основным, а иногда и единственным критерием оценки благополучия животных по бруцеллезу, так как при проведении бактериологического исследования больных не всегда удается выделить культуру возбудителя.

Таким образом, на основании вышеизложенного, очевидна необходимость изыскания рациональных схем поствакцинальной диагностики в целях повышения эффективности системы противобруцеллезных мероприятий при бруцеллезе северных оленей [1–15].

Цель и методика исследований. Целью исследований является апробация иммуноферментного анализа на основе с моноклональным антител при диагностике бруцеллеза северных оленей. Работа была выполнена в период 2014 по 2017 г. в лаборатории оленеводства и традиционных отраслей Якутского НИИ сельского хозяйства, в оленеводческих хозяйствах Якутии, а также на опытной базе ФГБНУ ВИЭВ где были проведены серологические исследования по апробации новой диагностической тест-системы ИФА на основе с моноклональным антител при бруцеллезе северных оленей. Разработанную тест-систему ИФА испытали на мелком рогатом скоте и на северных оленях. Учет реакций осуществлялся инструментальным способом. В процессе испытания новой тест-системы ИФА удалось также добиться максимальной простоты ее использования и сокращения сроков учета реакций до 1,5–2 часов.

Результаты исследований. Проведенные комплексные серологические исследования на бруцеллез (РА и РСК с официальным диагностикумом, ИФА с разработанной тест-системой) 350 проб сывороток крови северных оленей, иммунизированной

ванного против бруцеллеза живыми вакцинами из штаммов V.abortus 75/79-AB и 82, из благополучных и неблагополучных по бруцеллезу оленеводческих стад Нижнеколымского района Республики Саха (Якутия). В благополучной стаде с положительными и сомнительными реакциями с помощью комплекса РА + РСК было выявлено 29 проб – 8,2 % из числа исследованных, с помощью ИФА – 35 проб, или 10 % (показания ИФА полностью совпали с показаниями РА + РСК; дополнительно к РА + РСК выявлено 6 проб – 1,7 % из числа исследованных). Во всех 35 пробах с положительными и сомнительными реакциями в РА + РСК и/или ИФА был 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.

При исследовании на бруцеллез сывороток крови от северных оленей неблагополучных стад, не подвергавшегося вакцинации, в РНГА из 25 исследуемых проб реагировали 8 проб в титрах 50 – 200 МЕ, в комплексе РА + РСК – только 6 (РА – 4 с титрами 50 – 100 МЕ; РСК – 2 с титром 1:5). В ИФА из 25 исследуемых сывороток крови показали положительный результат 8 проб (показатели оптической плотности 1,362 – 2,063), что свидетельствует о полном соответствии показаний ИФА показаниям РНГА и диагностическому комплексу РА + РСК и большей диагностической чувствительности ИФА по сравнению с указанными реакциями в отношении выявления антител к бруцеллам.

Выводы и рекомендации. Таким образом, апробация ИФА на основе с моноклональным антител для диагностики бруцеллеза северных оленей перспективна для применения в при массовых исследованиях в оленеводческих стадах, 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. Результаты исследования показали высокую специфичность и эффективность тест-системы ИФА на основе моноклональных антител при выявлении инфицированных бруцеллезом северных оленей, чем общепринятые тесты.

Литература

1. Винокуров Н. В., Слепцов Е. С. Изучение диагностической эффективности РНГА при бруцеллезе северных оленей // Ветеринария и кормление. 2007. № 6. С. 35.

2. Винокуров Н. В., Слепцов Е. С. Изучение диагностической эффективности реакции непрямой гемагглютинации при бруцеллезе // Якутский медицинский журнал. Якутск. 2008. № 4. С. 72–73.
3. Винокуров Н. В., Евграфов Г. Г., Слепцов Е. С. Эпизоотология бруцеллеза северных оленей в различных зонах Республики Саха (Якутия) // Инновационные разработки молодых ученых - развитию АПК : сб. науч. тр. по мат. III Междунар. науч.-практ. конф. Ставрополь, 2014. Т. 2. № 7. С. 352–355.
4. Винокуров Н. В., Лайшев К. А., Слепцов Е. С., Евграфов Г. Г. Реактогенные свойства и иммунологическая реактивность слабоагглютиногенных вакцин из штаммов *V.abortus* 75/79-AB и 82 для северных оленей // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. 2014. № 36. С. 79–81.
5. Винокуров Н. В., Лайшев К. А., Решетников А. Д., Слепцов Е. С., Макарова Л. И. Современное состояние по бруцеллезу северных оленей в Республике Саха (Якутия) // Ветеринарный врач. 2014. № 4. С. 18–22.
6. Винокуров Н. В., Лайшев К. А., Слепцов Е. С., Евграфов Г. Г. К вопросу о бруцеллезе северных оленей в Республике Саха (Якутия) // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2016. № 1. С. 54–58.
7. Иммунопрофилактика бруцеллеза северных оленей с использованием противобруцеллезных вакцин в условиях Республики Саха (Якутия) : монография / Е. С. Слепцов, Н. В. Винокуров, М. И. Искандаров, В. И. Федоров, И. Д. Замьянов. Новосибирск, 2016. 108 с.
8. Слепцов Е. С., Винокуров Н. В., Евграфов Г. Г. Свойства вакцины из штаммов *V.abortus* 82 и *V.abortus* 75/79-AB в организме северных оленей // Достижение науки и техники АПК. 2013. № 4. С. 72–73.
9. Слепцов Е. С., Винокуров Н. В., Федоров В. И., Евграфов Г. Г. Иммунологическая реактивность организма северных оленей при повторной реиммунизации вакцинами из штаммов *V.abortus* 82 и *V.abortus* 75/79-AB // Аграрный вестник Урала. 2011. № 4. С. 27.
10. Слепцов Е. С., Искандаров М. И., Винокуров Н. В., Евграфов Г. Г., Евграфова А. В. Результаты бактериологических исследований оленьих культур из штаммов *V.suis* 45 и *V.suis* 245 в организме морских свинок // Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса : мат. междунар. науч.-практ. конф. Ставрополь, 2013. С. 256.
11. Слепцов Е. С., Винокуров Н. В., Устинцева Ю. Ю., Малышева И. А., Захарова О. И. Иммуногенность вакцин из штаммов *V.abortus* 19 и 82, *V.suis* 61 для северных оленей при различных методах введения // Аграрный вестник Урала. 2011. № 4. С. 21–22.
12. Слепцов Е. С., Искандаров М. И., Винокуров Н. В., Евграфов Г. Г., Евграфова А. В. Предварительные результаты изучения свойств культур из штаммов *V.suis* 45 и *V.suis* 245 на лабораторных животных // Вестник Бурятской ГСХА им. В. Р. Филиппова. 2014. № 3. С. 28–31.
13. Слепцов Е. С., Искандаров М. И., Винокуров Н. В., Евграфов Г. Г., Евграфова А. А. Результаты бактериологических исследований «оленьих культур» из штаммов *V.suis* 45 и *V.suis* 245 в организме морских свинок // Инновационные разработки молодых ученых - развитию АПК : сб. науч. тр. по мат. II Междунар. науч.-практ. конф. Ставрополь, 2013. Т. 3. № 6. С. 256–258.
14. Слепцов Е. С., Винокуров Н. В., Евграфов Г. Г. Реактогенные, антигенные и иммуногенные свойства культуры из шт. *V.suis* 61 в опытах на морских свинках // Аграрный вестник Урала. 2015. № 7. С. 32–35.
15. Экспериментальный бруцеллез крупного рогатого скота в Республике Саха (Якутия) : монография. / Е. С. Слепцов, М. П. Альбертян, Н. В. Винокуров, И. Д. Замьянов, А. А. Хоч. Новосибирск, 2016. 72 с.

References

1. Vinokurov N. V., Sleptsov E. S. A study of the diagnostic efficacy of IHGR in brucellosis of reindeer // Veterinary Medicine and Feeding. 2007. № 6. P. 35.
2. Vinokurov N. V., Sleptsov E. S. A study of the diagnostic efficiency of the indirect hemagglutination reaction in case of brucellosis // Yakutsk Medical Journal. 2008. № 4. P. 72–73.
3. Vinokurov N. V., Evgrafov G. G., Sleptsov E. S. Epizootology of brucellosis of reindeer in various zones of the Republic of Sakha (Yakutia) // Innovative developments of young scientists to the development of agro-industrial complex : proc. of the III International scient. and pract. conf. Stavropol, 2014. Vol. 2. № 7. P. 352–355.
4. Vinokurov N. V., Laishev K. A., Sleptsov E. S., Evgrafov G. G. Reactogenic properties and immunological reactivity of weakly-agglutinogenic vaccines from strains *V.abortus* 75/79-AB and 82 for reindeer // Messenger of St. Petersburg State Agrarian University. 2014. № 36. P. 79–81.
5. Vinokurov N. V., Laishev K. A., Reshetnikov A. D., Sleptsov E. S., Makarova L. I. The current state of brucellosis of reindeer in the Republic of Sakha (Yakutia) // Veterinary doctor. 2014. № 4. P. 18–22.
6. Vinokurov N. V., Laishev K. A., Sleptsov E. S., Evgrafov G. G. On the Brucellosis of Reindeer in the Republic of Sakha (Yakutia) // Issues of Regulatory and Legal Regulation in Veterinary Medicine. 2016. № 1. P. 54–58.

7. Immunoprophylaxis of brucellosis of reindeers using anti-brucellosis vaccines in the Republic of Sakha (Yakutia) : monograph / E. S. Sleptsov, N. V. Vinokurov, M. I. Iskandarov, V. I. Fedorov, I. D. Zamyaynov. Novosibirsk, 2016. 108 p.
8. Sleptsov E. S., Vinokurov N. V., Evgrafov G. G. Properties of the vaccine from strains B.abortus 82 and B.abortus 75/79-AB in reindeer organism // Achievement of science and technology in AIC. 2013. № 4. P. 72–73.
9. Sleptsov E. S., Vinokurov N. V., Fedorov V. I., Evgrafov G. G. Immunological reactivity of reindeer organism after reimmunization by vaccines from strains B.abortus 82 and B.abortus 75/79-AB // Agrarian Bulletin of the Urals. 2011. № 4. P. 27.
10. Sleptsov E. S., Iskandarov M. I., Vinokurov N. V., Evgrafov G. G., Evgrafova A. V. The results of bacteriological studies of deer crop strains B.suis 45 and B.suis 245 in the body of guinea pigs // Innovative development of young scientists – development of agro-industrial complex : proc. of intern. scient. and pract. conf. Stavropol, 2013. P. 256.
11. Sleptsov E. S., Vinokurov N. V., Ustinceva Y. Y., Malysheva I. A., Zakharova O. I. Immunogenicity of the vaccine from strains B.abortus 19 and 82, B.suis 61 for reindeer in different methods of administration // Agrarian Bulletin of the Urals. 2014. № 8. P. 21–22.
12. Sleptsov E. S., Iskandarov M. I., Vinokurov N. V., Evgrafov G. G., Evgrafova A. V. Preliminary results of studying the properties of cultures from strains B.suis 45 and B.suis 245 on laboratory animals // Bulletin of Buryat State Agricultural Academy named after V. R. Filippov. 2014. № 3. P. 28–31.
13. Sleptsov E. S., Iskandarov M. I., Vinokurov N. V., Evgrafov G. G., Evgrafova A. A. The results of bacteriological studies of “reindeer cultures” from strains B.suis 45 and B.suis 245 in the organism of guinea pigs // Innovative developments of young scientists to the development of agro-industrial complex : proc. of the II International scient. and pract. conf. Stavropol, 2013. Vol. 3. №6. P. 256–258.
14. Sleptsov E. S., Vinokurov N. V., Evgrafov G. G. Reactogenic, antigenic and immunogenic properties of the culture from pcs. B.suis 61 in experiments on guinea pigs // Agricultural Bulletin of the Urals. 2015. № 7. P. 32–35.
15. Experimental brucellosis of cattle in the Republic of Sakha (Yakutia) : monograph / E. S. Sleptsov, M. P. Albertyan, N. V. Vinokurov, I. D. Zamyaynov, A. A. Hoch. Novosibirsk, 2016. 72 p.