

Методологію доказових досліджень (ДД) відпрацьовували на прикладі спалаху хвороби Ауескі (ХА) у дрібнотварному свиногосподарстві, де спалах хвороби стався після заводу ремонтного кнура. Етіологічні дослідження на ХА проводили згідно стандартних операційних процедур (СОП) ННЦ «ІЕКВМ» з урахуванням вимог МЕБ. Експериментальна схема ДД була спрямована на вивчення спорідненості кишечних споруутворюючих бацил (без уточнення видового складу) у неблагополучній (А), підозрюваній (Б) та контрольній (В) групах свиней. Для цього з ректальних квачів стандартними бактеріологічними методами виділяли спори кишечних бацил і літичні бактеріофаги. Потім пулами виділених бактеріофагів заражали пули пророщених зі спор культур кишечних бацил. Доказом спорідненості культур кишечних бацил вважали їх чутливість до одного й того пулу кишечних фагів.

За результатами досліджень розроблена методика, яка є перспективною для доказових досліджень і судово-ветеринарної експертизи хвороби Ауескі, але потребує подальших випробувань щодо відтворюваності та рівня вірогідності.

Ключові слова: хвороба Ауескі, судово-ветеринарна експертиза.

УДК 619:616.98-078:579.841.11:57.083.33

ОЦІНКА ЧУТЛИВОСТІ ТА СПЕЦИФІЧНОСТІ РОЗ-БЕНГАЛ ПРОБИ ЗА ДІАГНОСТИКИ САПУ

Козій Р.В.*

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
м. Київ, Україна, e-mail: rvkoziy@yahoo.com

Серологічні методи відіграють вирішальну роль у лабораторній діагностиці сапу. У цій статті описано визначення чутливості та специфічності РБП для серологічної діагностики сапу. Роз-Бенгал проба (РБП) – простий та швидкий експрес-тест, який можна використовувати у поєднанні з іншими методами для діагностики сапу.

Матеріали і методи. Досліджено панель з 711 польових негативних зразків сироваток коней та лабораторну панель з 94 позитивних сироваток коней. Реакцію проводили згідно інструкції виробника.

Результати. Встановлено, що чутливість РБП склала 80,9 %, а специфічність – 90,2 %. Таким чином, доцільно використовувати РБП як експрес-метод для діагностики сапу лише у поєднанні з іншими лабораторними та клінічними методами діагностики та викласти отримані результати в Інструкції щодо профілактики та боротьби з сапом тварин.

Ключові слова: сап, серологічна діагностика, Роз-Бенгал проба, РБП.

Сап (лат. malleus; англ. glanders, farcy; фр. morve; нім. Rotz; ісп. muermo) – це висококонтагіозна інфекційна зоонозна хвороба, яка викликається бактерією *Burkholderia mallei* (раніше *Pseudomonas mallei*). На сап в основному хворіють представники родини конячих. До сапу чутливі й деякі інші види тварин, зокрема верблюди, представники родини котячих та собачих, дрібна рогата худоба, а також люди. В останні роки сап набуває все більшого значення, оскільки за рахунок руху коней під час міжнародної торгівлі, міжнародних змагань тощо існує небезпека занесення хвороби з ендемічних (Бразилія, Близький Схід, Пакистан, Індія, Монголія та ін.) у вільні регіони [1].

Єдиним природним резервуаром збудника сапу у природі є коні [2]. У зв'язку з цим, своєчасне виявлення та ізоляція хронічно та латентно хворих тварин є основною передумовою ефективного контролювання поширення сапу.

Пряме виявлення *B. mallei* бактеріологічним чи молекулярно-генетичним методами часто ускладнене, особливо у хронічно та латентно хворих тварин, у яких слабо виражені клінічні ознаки [2].

Алергічна малеїнова проба, розроблена в 1891 році, була основним засобом діагностики сапу в СРСР, країнах Європи та Північної Америки у рамках заходів з ліквідації цієї хвороби у першій половині ХХ століття. В ендемічних регіонах основним методом діагностики сапу залишається малеїнова проба. Однак, малеїнізація може давати негативні або сумнівні результати у 10 % випадків за дослідження інфікованих коней, особливо у старих або виснажених тварин. Можлива також хибно-позитивна реакція за стрептококової інфекції [3]. Крім того, малеїнова проба викликає гуморальну реакцію та утворення специфічних антитіл, що перешкоджає наступним серологічним дослідженням [2]. У зв'язку з цим, згідно міжнародних вимог, провідне місце у лабораторній діагностиці сапу посідають серологічні методи.

Одним із серологічних методів, запропонованих для діагностики сапу є Роз-Бенгал проба (РБП). РБП – це варіант реакції аглютинації, за якої використовують антиген, зафарбований барвником Роз-Бенгалом, для кращої візуалізації реакції. На сьогодні, ця реакція валідована лише в Російській Федерації, і не рекомендується МЕБ для міжнародної торгівлі [4]. Разом з тим, у діючій

* Науковий керівник – Скрипник В.Г.

в Україні Інструкції щодо профілактики та боротьби з сапом тварин, реакція аглютинації (РА) є рекомендованим методом серологічної діагностики.

Метою роботи було оцінити діагностичну чутливість та специфічність варіанту реакції аглютинації Роз-Бенгал проби (РБП) з використанням антигену виробництва ФКП «Курська біофабрика – фірма «БИОК»» для серологічної діагностики сапу коней.

Матеріали та методи. Для визначення діагностичної чутливості використовували лабораторну панель з 94 позитивних сироваток крові коней, відібраних з різних ендемічних щодо сапу регіонів (Пакистан, Кувейт, Ліван, ОАЕ). Вони були підтверджені як позитивні шляхом виділення та ідентифікації збудника сапу *B. mallei* або методом імуноблоту. Ці сироватки були надані з колекції референтної лабораторії МЕБ з сапу у Інституті ім. Фрідріха Лефлера, м. Єна, Німеччина. У якості панелі негативних сироваток для визначення специфічності використовували 711 сироваток крові коней, відібраних з різних регіонів України.

РБП проводили згідно «Інструкції з використання антигену сапного кольорового для пластинчатої реакції аглютинації». Дослідження проводили на базі референтної лабораторії МЕБ з сапу в Інституті ім. Фрідріха Лефлера, м. Єна, Німеччина.

Чутливість визначали за формулою [5]:

$$\frac{ПП-ХН}{ПП} \times 100\%, \text{ де}$$

ПП – панель позитивних сироваток;

ХН – хибно негативні результати реакції.

Специфічність реакції визначали за формулою [5]:

$$\frac{ПН-ХП}{ПН} \times 100\%, \text{ де}$$

ПН – панель негативних сироваток;

ХП – хибно позитивні результати реакції.

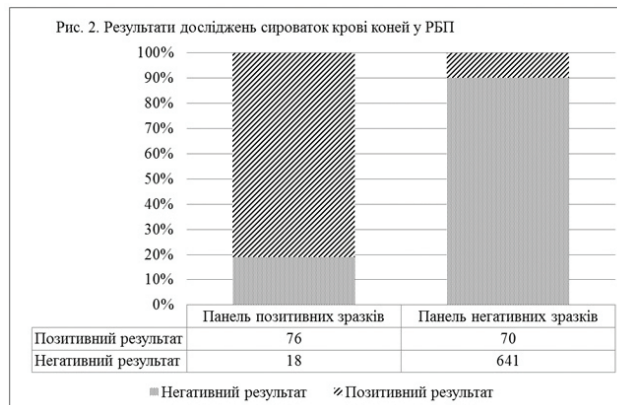
На рисунку 1 проілюстрована методика постановки та оцінки РБП



Рис. 1. Постановка РБП для діагностики сапу коней

Результати досліджень. За дослідження лабораторної панелі позитивних зразків сироватки крові, відібраних від хворих на сап коней (n=94) методом РБП, 76 зразків дали позитивну реакцію, а 18 зразків – негативну. За дослідження панелі польових негативних зразків сироватки крові коней (n=711) методом РБП, 641 зразок дав негативну реакцію, а 70 зразків – позитивну. Польові зразки, які дали позитивну реакцію в РБП, були негативними за дослідження методами РЗК та імуноблоту.

Результати досліджень представлені на рисунку 2.



Відповідно до отриманих результатів було розраховано діагностичну чутливість та специфічність РБП для серологічної діагностики сапу коней. Чутливість РБП склала 80,9 %, а специфічність – 90,2 %.

РБП було розроблено російськими вченими як експрес метод лабораторної діагностики сапу [6]. Цей метод базується на утворенні нерозчинних комплексів між антигеном та специфічними антитілами, які осідають у вигляді пластівців. Для візуалізації осаду використовують органічний барвник Роз-Бенгал. У якості антигену використовується інактивована нагріванням суспензія культури збудника сапу *Burkholderia mallei*, зафарбована Роз-Бенгалом. Naureen A. та співавт. [5] встановили, що РБП за показниками чутливості та специфічності не поступався РЗК та навіть перевершував РНГА та модифіковану реакцію зустрічного імуоелектрофорезу. За даними цих авторів чутливість РБП склала 90%, а специфічність – 100 %. Однак, Н. Букова [6] встановила, що під час дослідження 7730 коней з неблагополучного з сапу регіону Монголії позитивно на РБП прореагувало 482 тварини, але 220 з них (45,6 % випадків) не були підтверджені іншими методами (РЗК, малеїнізація, або клінічний огляд), що ставить під сумнів високу специфічність цього тесту. Разом з тим, згідно даних автора, специфічність антигену для РБП для діагностики сапу у благополучних районах Росії склала 99,8 %. У зв'язку з цим, дослідниця пропонує використання РБП як експрес-методу для діагностики сапу лише у поєднанні з іншими лабораторними та клінічними методами діагностики.

Єдиним методом серологічної діагностики сапу, визнаним МЕБ для міжнародної торгівлі кінями, є РЗК. За літературними даними чутливість та специфічність РЗК складає 90–95 % [5, 7–10]. За даними Naureen та співавторів [5] чутливість РБП з використанням внутрішньолaboratorного антигену склала 90 %, і була нижчою за чутливість РЗК (91,4 %). Разом з тим, за результатами наших досліджень, чутливість комерційного антигену для РБП (Курська біофабрика, БІОК), була значно нижчою порівняно з показниками РЗК і склала всього 80,9 %. У зв'язку з цим, доцільно внести зміни до Інструкції щодо профілактики та боротьби з сапом тварин та вказати РЗК як основний метод серологічної діагностики сапу.

Висновки. 1. Серологічні методи діагностики широко використовуються для лабораторної діагностики сапу. РЗК є єдиним методом, визнаним МЕБ для серологічної діагностики сапу у міжнародній торгівлі кінями.

2. РБП є експрес-методом діагностики сапу, який варто застосовувати лише у поєднанні з іншими методами. За результатами наших досліджень чутливість РБП склала 80,9 %, а специфічність – 90,2 %. Ці показники поступаються специфічності та чутливості РЗК.

3. Враховуючи літературні дані, результати наших досліджень та рекомендації МЕБ щодо серологічної діагностики сапу коней, вважаємо за необхідне внести зміни до Інструкції щодо профілактики та боротьби з сапом тварин та використовувати РЗК як основний метод для серологічної діагностики сапу.

Список літератури

1. Pal V. Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders / V. Pal, S. Kumar, P. Malik, G. P. Rai // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2012. – Vol. 19, №8. – p. 1193 – 1198.
2. Gregory B.C. Chapter 6 Glanders / B.C. Gregory, D.M. Waag // *Medical Aspects of Biological Warfare*. – 2006. – p. 95–106.
3. Илюхин В.И. Сап в XXI веке: распространение, научные достижения / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина // *Ветеринария*. □ 2014. □ №3. □ с. 14–18.
4. OIE Terrestrial Manual 7th Edition, Chapter 2.5.11. Glanders, 2013.
5. Naureen A. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders / A. Naureen, M. Saqib, G. Muhammad [et al.] // *J Vet Diagn Invest*. – 2007. – №19. – p. 362–367.
6. Букова Н. Сап: разработка, изготовление, контроль и стандартизация диагностикумов. / Н. Букова // *Автореферат*. – Москва. – 1999 г.
7. Khan I. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures / I. Khan, L.H. Wieler, F. Melzer [et al.] // *Transbound Emerg Dis*. – 2013. – №3(60). – p. 204–221.
8. Khan I. Performance of complement fixation test and confirmatory immunoblot as two-cascade testing approach for serodiagnosis of glanders in an endemic region of South East Asia. / I. Khan, M.C. Elschner, F. Melzer [et al.] // *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. – 2012. – №125. – p. 117–121.
9. Khan I. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. / I. Khan, L.H. Wieler, F. Melzer [et al.] // *Veterinary Record*. – 2011. – № 169.
10. Neubauer H. Human Glanders. / H. Neubauer, H. Meyer, E.-J. Finke // *Revue International des Services de Santé des Forces Armées*. □ 1997. □ Tome LXX. □ p. 258–265.
11. Neubauer H. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. / H. Neubauer, L.D. Sprague, R. Zacharia [et al.] // *J. Vet. Med*. – 2005. – №52. – p. 201–205.

EVALUATION OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ROSE BENGAL TEST FOR THE DIAGNOSIS OF GLANDERS

Koziy R.V.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

Serological methods play an important role in the laboratory diagnosis of glanders. In this article we determine the sensitivity and specificity of RBT for the serological diagnosis of glanders. RBT is a simple and quick test, which can be used as an express method for the diagnosis of glanders only in combination with other tests.

The purpose of this work was to evaluate the diagnostic sensitivity and specificity of a plate agglutination Rose Bengal test (RBT) using the antigen manufactured by FKP “Kurskaya Biofabrika – firma “BIOK” for the serological diagnosis of glanders in horses.

Materials and methods. A panel of 711 negative horse sera (collected in different regions of Ukraine) and a laboratory panel of 94 positive horse sera (provided by the OIE reference laboratory for glanders, FLI, Germany) were tested. The test was performed according to the manufacturer guidelines.

Results. The sensitivity of RBT was determined to be 80,9 % and the specificity was 90,2 %.

Conclusions. The only OIE validated method of the serological diagnosis of glanders for the international trade of equidae is complement fixation test (CFT). According to the literature data and the results of our study the diagnostic sensitivity and specificity of RBT are lower than those of CFT. Thus, RBT should only be used for the diagnosis of glanders in combination with other diagnostic methods. According to the obtained results, changes to the Guidelines for the prevention and eradication of glanders should be made.

Keywords: glanders, serological diagnosis, Rose Bengal test, RBT.

УДК 619:616.98:579.873.21:57.084.1:636.9

ВПЛИВ ПАСАЖУВАННЯ НА БІЛИХ МИШАХ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ НА ЇХ ВІРУЛЕНТНІСТЬ ДЛЯ МОРСЬКИХ СВИНОК

Котляр О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: sanya.kotlyar.oo@mail.ru

Результати проведеного дослідження свідчать про те, що культура збудника туберкульозу бичачого виду (шт. Vallae) після пасажування на безпородних білих мишах з послідуочим введенням суспензії морським свинкам, зумовлювала в останніх прогресуючий туберкульозний процес різної інтенсивності (залежно від дози) до стадії генералізованого туберкульозу з летальністю тварин на 8–15 діб раніше в порівнянні з контрольною групою. Про підвищення рівня імунологічної реактивності у морських свинок дослідних груп свідчили результати внутрішньошкірної туберкулінової проби: припухлості на місцях введення алергену з'являлись на тиждень раніше в порівнянні з контролем.

Ключові слова: туберкульоз, алергічна діагностика, туберкулін, білі мишки, морські свинки.

Першочерговим завданням у комплексі протитуберкульозних заходів є своєчасне виявлення та негайне видалення інфікованих тварин з гурту. Це можна здійснити тільки удосконаленням діагностики туберкульозу, що дозволить виявляти інфікованих тварин до стадії клінічного прояву хвороби, що важливо по епізоотологічним і економічним факторам [11].

Складовими сучасної первинної діагностики туберкульозу тварин є алергічний, патологоанатомічний та бактеріологічний методи, результати яких визначають епізоотичний стан гурту або господарства. Туберкульоз вважають встановленим, якщо показники алергічної проби підтверджуються картиною патологоанатомічного розтину тварин, а при відсутності помітних характерних для хвороби змін – позитивними результатами бактеріологічного дослідження. Останнє поділяється на культуральний і біологічний методи, які дозволяють одержати чисті культури мікобактерій туберкульозу та проводити їх видову ідентифікацію, визначати біологічні і біохімічні властивості [3, 5, 7, 8].

Визначення епізоотичної ситуації щодо туберкульозу тварин і встановлення етіології алергічних реакцій можливе тільки при лабораторному дослідженні біоматеріалу. Біологічна проба являється основним методом диференціації мікобактерій туберкульозу. Використання морських свинок і кролів забезпечує диференціацію мікобактерій бичачого від людського виду та інших мікобактерій. Розвиток патологічного туберкульозного процесу в органах і тканинах лабораторних тварин залежить від їх виду та вірулентності збудника.

Деякі дослідники повідомляють про доцільність використання в якості лабораторної моделі безпородних білих мишей при вивченні вірулентності збудників туберкульозу та атипичних мікобактерій, що прискорює одержання результату біологічної проби та дозволяє визначати терміни персистенції в їх організмі атипичних мікобактерій [1, 2, 4, 10].

Мета досліджень. Вивчити біологічні властивості *M. bovis*, пасажованих через організм білих мишей, на морських свинках.

Матеріали та методи. Із бактеріальної маси трьохтижневої культури референтного штаму збудника туберкульозу бичачого виду (шт. Vallae), вирощеної на середовищі Павловського, готували завись в концентраціях 0,1; 0,5 і 1,0 мг/мл стерильного фізіологічного розчину. Для проведення дослідів було сформовано із безпородних білих мишей масою 27–30 грамів три дослідних групи по 9 голів і контрольну (3 голови). Тваринам дослідних груп вводили внутрішньочеревно завись культури збудника в однаковій дозі 0,5 мл і різних вищезазначених концентраціях для кожної групи. Тваринам контрольної групи вводили стерильний фізіологічний розчин. Одночасно бактеріальну масу, яку використовували для зараження білих мишей, висівали на поживне середовище для визначення життєздатності мікобактерій та обліку росту колоній через кожні 7 діб протягом дослідів (90 діб).

Через 7, 14 і 21 добу по три миші з кожної групи евтаназували для дослідження на туберкульоз. При патологоанатомічному розтині відібрали печінку та селезінку для бактеріоскопічного, культурального і біологічного дослідження. Із органів виготовляли мазки – відбитки, які фарбували за методом Ціля – Нільсона і проводили мікроскопію. Перед культуральним дослідженням внутрішні органи обробляли за методикою А.П. Алікаєвої, після чого виготовлену на фізіологічному розчині суспензію використали для зараження морських свинок масою 300–350 грамів, з яких сформували 3 дослідні групи і 1 контрольну по 9 голів. Тварини до початку дослідів не реагували на внутрішньошкірне введення туберкуліну (ППД) для ссавців. Морським свинкам