

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК 619:616.981

Н.П. ИВАНОВ, А.Н. КОЖАЕВ, Ф.А. БАКИЕВА, А.А. ЕГИЗБАЕВА

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПРОБИРОЧНОЙ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ НА РАСТВОРАХ ПОВАРЕННОЙ СОЛИ РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ

(*Казахский Национальный аграрный университет, г. Алматы
Республиканская ветеринарная лаборатория, г. Астана*)

Приведены данные о диагностической ценности пробирочной реакции агглютинации на растворах поваренной соли с различной концентрацией. Было выявлено, что при постановке реакции агглютинации по Райту на 0,85%-ном фенолизированном растворе хлористого натрия может быть явление прозоны (до 10% случаев), т.е. в больших концентрациях сыворотки наблюдается менее выраженная реакция. Проведение пробирочной реакции агглютинации на растворах с повышенным содержанием хлористого натрия (5-10%) обеспечивает четко выраженную агглютинацию бруцелл антигена во всех разведениях позитивных проб сыворотки крупного рогатого скота и повышает чувствительность и специфичность указанного диагностического теста.

Введение. Согласно ныне существующему положению постановку реакции агглютинации (РА) при исследовании на бруцеллез сывороток крови крупного рогатого скота проводят на 0,85%-ном фенолизированном физиологическом растворе поваренной соли. Однако в последнее время имеет место сложность приобретения карболовой кислоты в связи с прекращением ее выпуска.

В литературе имеются сообщения о возможности постановки указанной реакции на растворах повышенной концентрации хлористого натрия.

Так, П.А. Триленко (1954) были проведены опыты по постановки РА с повышенным содержанием поваренной соли в сравнении с 0,85%-ным раствором. Автор делает вывод, что оптимальным раствором для РА с сыворотками крови овец является 10%-ный раствор NaCl. При этом автор отмечает, что в этом случае реакция в 3-4 раза чувствительнее классической. [1]

К.Ш. Гаджиев и Ф.Б. Шарипов (1954) рекомендуют применять РА на 10%-ном растворе хлористого натрия, так как она во много раз чувствительнее классического метода, чем при постановке этой реакции на 0,85% -ном растворе хлорида натрия. [2]

L.Rogalski, C.Serafin (1957) ставили реакцию агглютинации с сыворотками крови 206 свиней на растворах, различных по концентрации хлористого натрия (0,5; 0,85; 2,5; 5,0; 10,0; 25%). Авторы отмечают, что реакция агглютинации в 5 – и 10 %-ном растворе соли была более четкой и чувствительнее РА на физиологическом растворе. [3]

И.А.Каркадиновская, А.П.Зубков, М.М.Широбокова (1961), Н.И.Востриков (1962) в результате проведенных исследований пришли к заключению, что РА в 12%-м растворе хлористого натрия в сравнении с РА в физиологическом растворе выявляет большее количество больного бруцеллезом крупного рогатого скота. Авторы считают целесообразным применять при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота реакцию агглютинации в 12%-ом растворе хлористого натрия. [4,5]

Н.В.Софронов, Н.Г. Мыслимова и Н.Н.Нурпитдинов (1964) в результате проведенных экспериментов приходят к выводу, что РА на 5%-м растворе хлористого натрия дает лучшие результаты, нежели РА в 12%-м растворе указанной соли. [6]

Результаты исследований. Результаты опытов, проведенных нами (Н.П.Иванов, 1968) в этом направлении, показали, что постановка РА на растворах повышенной концентрации хлористого натрия увеличивает ее диагностическую эффективность. [7]

Проведением опыта по сравнительной оценке РА на растворах, различных по концентрации хлористого натрия, нами предусматривалось выяснение преимущества одного из указанных методов не только в отношении более полного выявления больных бруцеллезом животных, но и меньшего проявления прозоны.

В наших опытах испытуемая сыворотка крови одновременно исследовалась реакцией агглютинации на 0,85; 5; и 10%-ных растворах хлористого натрия в разведениях сывороток крови крупного рогатого скота 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600, а также по реакции связывания комплемента. У лактирующих коров исследовали молоко *кольцевой реакцией*.

Всего нами было проверено по названным реакциям 673 сыворотки крови и 644 пробы молока, полученных от 291 головы крупного рогатого скота двух ферм опытного хозяйства Республиканской овоще-картофельной станции.

На ферме №1 находились, в основном, абортировавшие коровы, переведенные с фермы №2, а на ферме №2 содержались не абортировавшие животные. С учетом этого, можно рассмотреть более позднюю стадию развития бруцеллезной инфекции на ферме №1. На этой ферме животные были исследованы трехкратно, а на второй – двукратно.

К моменту второго исследования количество животных на ферме №1 увеличилось за счет перевода абортировавших животных с фермы №2, а на ферме №2 - за счет ввода животных с горных пастбищ. Результаты этих исследований приведены в нижеследующей таблице 1.

Таблица 1. Результаты исследования на бруцеллез крупного рогатого скота неблагополучного по бруцеллезу хозяйства

№ фермы	№ исслед.	Кол-во жив.	Показания реакций								
			РА на 0,85%		РА на 5%		РА на 10%		РСК		
			Pear.	Фен. зоны	Pear.	Фен. зоны	Pear.	Фен. зоны		Kол-во	Pear.
Ферма №1	1	120	93/77,5	8/8,6	101/84,0	1/1,0	102/85,0	2/2,0	104/86,7	118	85/72,0
	2	132	106/80,3	14/13,2	112/85,0	2/1,8	113/85,6	2/1,8	118/89,4	126	96/76,1
	3	130	99/76,1	9/9,1	108/83,1	1/0,9	108/83,1	2/1,8	108/83,1	117	84/71,9
Ферма №2	1	132	107/81,0	3/2,87	123/93,1	2/1,6	123/93,1	3/2,4	84/63,6	129	65/50,0
	2	159	133/83,7	11/8,3	138/87,0	3/2,2	140/88,0	5/3,6	121/76,0	154	83/54,0

Примечание. Числитель – абсолютное количество, знаменатель – проценты.

Как явствует из таблицы, процент реагирующих животных на ферме №1 больше всего по РСК. По РА больше реагировало при постановке ее на 5 и 10%-ном растворе хлористого натрия. Последнее заключение подтверждается и при исследовании животных фермы №2.

Количество же положительных показаний по РСК здесь значительно меньше.

Феномен прозоны больше всего проявлялся при постановке РА на 0,85 %-м хлористого натрия, затем на 10%-м растворе хлористого натрия. При проведении РА на 5%-м растворе хлористого натрия феномен прозоны был выражен меньше и небольшим абсолютным количеством.

Далее нами была поставлена реакция Райта комиссионно в Республиканской ветеринарной лаборатории с заведомо известными, ранее исследованными в ИФА сыворотками крови крупного рогатого скота. Полученные при этом данные отражены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты исследования проб сыворотки крови крупного рогатого скота на растворах с различным содержанием хлористого натрия

	Результат на растворах с различной концентрацией хлористого натрия											
	0,85%			5%			10%					
	Разведение сыворотки											
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:50	1:100	1:200	1:400	1:50	1:100	1:200	1:400
Позитив	2/20	2/20	5/50	6/60	7/70	7/70	6/60	6/60	7/70	7/70	6/60	6/60
Сомнит	3/30	4/40	1/10	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Негатив	5/50	4/40	4/40	4/40	3/30	3/30	4/40	4/40	3/30	3/30	4/40	4/40
Прозона	4/40	4/40	1/10	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. В дробных числах: числитель – абс.количество; знаменатель – %.

Как видно из данных приведенной таблицы 2, на 0,85% фенолизированном физиологическом растворе в разведениях сыворотки 1:50 и 1:100 число позитивных показаний было в три раза меньше, нежели в разведениях 1:200 и 1:400, что свидетельствует о явлении прозоны при исследовании сывороток, давших позитивные показания РА в более высоких титрах. В то же время весьма важно отметить: такого рода явлений не было отмечено при исследовании с этим же антигеном на

растворах с повышенным содержанием хлористого натрия, что подтверждает качественную сторону всех компонентов реакции.

Все вышеизложенное дает нам полное основание рекомендовать проведение реакции агглютинации на 5-10%-м растворе хлористого натрия при исследовании на бруцеллез сывороток крови крупного рогатого скота. При этом исключаются явления прозоны и к минимуму сводятся сомнительные показания реакции.

Методика постановки реакции агглютинации принципиально не отличается от классического её варианта на 0,85% -ном растворе хлористого натрия. Её осуществляют при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, верблюдов, оленей, собак, пушных зверей и некоторых других видов животных.

Компоненты реакции агглютинации:

- испытуемые сыворотки крови;
- позитивная бруцеллезная сыворотка, изготовленная биопредприятием или полученная от больного бруцеллезом животного. На этикетке флакона с такой сывороткой указывают титры в РА и РСК и дату изготовления;
- негативная сыворотка (сыворотка крови здорового животного), изготовленная биопредприятием или полученная в лаборатории;
- антиген бруцеллезный - единый для РА, РСК и РДСК – изготовленный на предприятии, представляет собой гомогенную взвесь инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл в физиологическом растворе. Специфическая активность антигена стандартизирована по референтной агглютинирующему сыворотке, что позволяет выражать результаты реакции агглютинации в международных единицах антител на 1,0 см³ сыворотки (например, сыворотка с конечным титром РА 1:100 с оценкой в ++ и более содержит 100 МЕ, 1:200 – 200 МЕ и т.д.). Перед применением антиген тщательно встряхивают;
- раствор хлорида натрия. Для приготовления 5-10%-ного раствора хлорида натрия в одном литре дистиллированной воды растворяют при подогревании соответственно 50,0 и 100,0 грамм хлорида натрия, фильтруют через бумажный фильтр и используют по назначению.

Техника постановки РА.
Реакцию агглютинации проводят в объеме 1,0 см³ в двух или четырех разведениях:

- исследование сыворотки крови крупного рогатого скота начинают с разведения 1:50. Разлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками, пипетменами или групповыми дозаторами Флоринского.

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови берут 5 пробирок. В первой пробирке делают основное разведение сыворотки, т.е. вносят 0,1 см³ сыворотки и добавляют к ней 2,4 см³ соответствующего раствора хлорида натрия (получают разведение сыворотки 1:25).

После приготовления основного разведения сыворотки в первой пробирке в третью, четвертую и пятую вливают по 0,5 см³ соответствующего раствора хлорида натрия. Затем из первой пробирки переносят во вторую и третью пробирки по 0,5 см³ основного разведения сыворотки. В третьей пробирке сыворотка смешивается с раствором хлорида натрия и 0,5 см³ этого разведения переносят в четвертую пробирку, а из нее 0,5 см³ – в пятую. Из пятой пробирки 0,5 см³ раствора сыворотки удаляют.

После этого в каждую пробирку, кроме первой, которая служит контролем, добавляют по 0,5 см³ антигена, предварительно разбавленного 1:10 с соответствующим раствором хлорида натрия. Пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат при 37-38 градусах Цельсия на 16-20 часов, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1-2 часов и проводят учет реакции.

При массовых исследованиях сыворотку крови крупного рогатого скота разливают индивидуальной микропипеткой (с грушей), или пипетменом в две пробирки в дозе 0,02 и 0,01 см³, затем в каждую пробирку добавляют по 1,0 см³ антигена, разведенного соответствующим раствором хлорида натрия 1:20. После чего ставят в термостат и через 16-20 часов выдерживают в термостате и дополнительно 1-2 часа при комнатной температуре. Затем проводят учет реакции.

Учет результатов реакции агглютинации.

Результаты реакции учитывают визуально и определяют в крестах по следующей схеме:

++++ (4 креста) – полное просветление жидкости, микробные тела антигена осели на дно пробирки в виде «зонтика», при легком встряхивании «зонтик» разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остается прозрачной (100%-ная агглютинация);

+++ (3 креста) – неполное просветление жидкости и хорошо выраженный «зонтик» (75% агглютинации);

++ (2 креста) – слабое просветление жидкости и «зонтик» умеренно выражен (50% агглютинации);

+ (1 крест) – едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество хлопьев или комочеков (25% агглютинации);

- (знак минус) – просветления жидкости и образования «зонтика» не наступило, на дне пробирки виден «пунктик» осевших микробов антигена, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь.

За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, где произошла агглютинация не менее, чем на два креста (++) , что соответствует количеству МЕ в 1,0 см³ сыворотки.

Для более объективной оценки результатов РА в крестах готовят стандарты мутности, соответствующие 0 (нулю), 25, 50 и 75% просветления жидкости.

С этой целью в четыре пробирки последовательно наливают 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 см³ антигена, разведенного 1:10. Затем в этом же порядке в три первые пробирки добавляют 3,0; 2,0; 1,0 см³ раствора поваренной соли, в четвертую пробирку раствор не добавляют. После встряхивания жидкость из каждой из них переносят по 0,5 см³ в серологические пробирки и добавляют по 0,5 раствора поваренной соли. Полученные стандарты соответствуют 75, 50 и 25% просветления жидкости, в последней, четвертой пробирке просветление отсутствует, стандарт мутности готовят каждый раз при постановке РА и выдерживают в термостате с основной реакцией.

Степень просветления в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют визуально путем сравнения со стандартом и результаты выражают в крестах.

Диагностическая оценка результатов реакции агглютинации.

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сывороткой крови крупного рогатого скот с разведением 1:100 (100 МЕ) с оценкой не менее чем на ++ (2 креста).

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации в разведении 1:50 (50 МЕ) с сыворотками крови крупного рогатого скота с оценкой не менее чем на ++ (2 креста).

При получении сомнительного результата реакции сыворотки крови данного животного исследуют повторно через 3-4 недели.

На неблагополучных по бруцеллезу фермах животных, при исследовании сыворотки крови которых получен дважды сомнительный результат РА, относят к положительно реагирующем.

В случаях нечетко выраженных показаний пробирочной РА, что нередко случается при исследовании сыворотки крови крупного рогатого скота и, особенно, верблюдов, реакцию агглютинации ставят по следующей модифицированной методике.

Исследуемые пробы сыворотки крови крупного рогатого скота разливают микропипетками: каждую в три пробирки, в первую и вторую – по 0,025 см³, а в третью - 0,0125.

Затем во вторую и третью пробирки вносят предварительно разведенный 1:10 бруцеллезный антиген в дозе 0,5 см³, а в первую - в таком же объеме раствор поваренной соли. Штативы с сывороткой крупного рогатого скота ставят в водяную баню и прогревают при температуре 45⁰С в течение 10 минут (верблюдов – 60-62⁰С 5 минут).

В первую пробирку антиген не вносят, она служит контролем качества сыворотки.

По истечении этого времени во все пробирки разливают 5%-ный раствор поваренной соли в количестве 0,7 см³, то есть доводят общий объем до 1,2 см³. Пробы выдерживают при комнатной температуре 18-24 часа, после чего проводят учет реакции.

Учет результатов модифицированной РА проводят аналогично классической, то есть пробирочной реакции агглютинации и выражают в крестах.

Выводы

1. При проведении реакции агглютинации по Райту на 0,85%-ном фенолизированном растворе хлористого натрия до 10% случаев может быть явление прозоны, т.е. в больших концентрациях сыворотки наблюдается менее выраженная реакция.

2. Проведение пробирочной реакции агглютинации на растворах с повышенным содержанием хлористого натрия (5-10%) без фенола обеспечивает четко выраженную агглютинацию бруцелл антигена во всех разведениях позитивных проб сыворотки крупного рогатого скота.

3. Постановка пробирочной реакции агглютинации на растворах с повышенным содержанием хлористого натрия (5-10%) повышает чувствительность и специфичность указанного диагностического теста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Триленко П.А. Особенности реакции агглютинации и кольцевой реакции при исследовании на бруцеллез сывороток крови и молока овец//Ветеринария.- №1, 1954.
2. Гаджиев Г.Ш., Шарипов Ф.Б. К методике исследования сывороток крови овец на бруцеллез по реакции агглютинации//Ветеринария.- №3, 1954.
3. Rogalski L., Serafin C. Wpływ stezenia soli kuchennej na odczyn agglutynacyjny z antygenem Br. abortus bovis u swin// Medicina Weterinaria, 13,6,333-334.Warszawa,1957.
4. Каргадиновская И.А., Зубков А.П., Широбокова М.М. Об усовершенствовании серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота//Ветеринария.- №11, 1961.
5. Востриков Н.И. Об усовершенствовании серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота// Ветеринария.- №8, 1962.
6. Софонов Н.В., Мыслимова Н.Г., Нурутдинов Н.Н. Усовершенствование серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота//Тр.Узб.НИВИ, т.XV, 1964.
7. Иванов Н.П. Сравнительная эффективность некоторых методов диагностики бруцеллеза// Дис.на соис...кан.вет.наук, Алма-Ата, 1968.

Н.П. ИВАНОВ, А.Н. КОЖАЕВ, Ф.А. БАКИЕВА, А.А. ЕГІЗБАЕВА

ӘРТҮРЛІ КОНЦЕНТРАЦИЯДАҒЫ АС ТҮЗҮ ЕРІТІНДІЛЕРІНДЕГІ ПРОБИРКАЛЫҚ АГГЛЮТИНАЦИЯ РЕАКЦИЯСЫНЫҢ ДИАГНОСТИКАЛЫҚ ҚҰНДЫЛЫҒЫ.

Мақалада әртүрлі концентрациядагы ас түзы ерітінділеріндегі пробиркалық агглютинация реакциясының диагностикалық құндылығы жайында мәліметтер көлтірілген. Агглютинация реакциясын Райт бойынша 0,85% фенолданған наратий хлориді ерітіндісінде қою кезінде прозона құбылышы болатындығы (10% жағдайда) анықталған, яғни сары судың үлкен концентрацияларында реакция айқын емес. Ал пробиркалық агглютинация реакциясын натрий хлоридінің жогары концентрация бар ерітінділерінде (5-10%) қою, ірі қара мал қан сарысының барлық сүйылтуындағы позитивті сымактарына бруцелла антигендерінің агглютинациясын айқын байқатады және атаптап диагностикалық тест жүйенің сезімталдырылғын және арнайылығын жогарылатады.

N.P. IVANOV, A.N. KOZHAEV, F.A. BAKIYEVA, A.A. EGIZBAEVA

DIAGNOSTIC VALUE OF TEST-TUBE AGGLUTINATION TEST FOR SALT SOLUTIONS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS

The article presents data on the diagnostic value of the test-tube agglutination test using solutions with different concentrations of salt. It was found that in the formulation of Wright agglutination test at 0.85% Mr. fenolizirovannom solution of sodium chloride can be prozone phenomenon (up to 10% of cases), ie at high concentrations of serum response occurs less pronounced. Carrying out test-tube agglutination test using solutions with a high content of sodium chloride (5-10%) provides a distinct agglutination of Brucella antigen in all dilutions of positive serum samples of cattle and increases the sensitivity and specificity of this diagnostic test.

*Иванов Николай Петрович – доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН РК,
Казахский Национальный аграрный университет*

*Кожаев Аскар Нурсултанович – кандидат ветеринарных наук, доцент
Казахский Национальный аграрный университет*

*Бакиева Флюра Альбертовна – кандидат ветеринарных наук
Казахский Национальный аграрный университет*

*Егизбаева Айнагуль Амангельдиновна – врач-серолог Республиканской ветеринарной лаборатории, г. Астана
Место работы: РГП РВЛ*