

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043499**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.29

(21) Номер заявки
201800490

(22) Дата подачи заявки
2017.09.21

(51) Int. Cl. **C12N 1/20** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА У ЖИВОТНЫХ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

(43) **2019.09.30**

(86) **PCT/AZ2017/000007**

(87) **WO 2019/056075 2019.03.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЛЫЕВ АБУЛЬФАТ АХМЕД ОГЛЫ;
БАБАЕВ АНАР АХМЕД ОГЛЫ (AZ)**

(56) RU-C1-2491545
RU-C1-2435842
RU-C1-2539827
Nastavlenie po diagnostiki brutselleza
zhivotnykh, 29.09.2003, № 13-5-02/0850

(72) Изобретатель:
Алыев Абульфат Ахмед оглы, Бабаев Анар Ахмед оглы, Гулиев Нураддин Гюллар оглы, Халилов Гамлет Геюш оглы, Гянджалиев Фадаил Кямран оглы, Садыглы Озал Мустафа оглы, Гасанов Эльхан Гашим оглы, Гараева Малахат Аслан кызы, Гюльалиева Фируза Рза кызы (AZ)

(57) Изобретение относится к области ветеринарии, в частности к способу дифференцированной диагностики бруцеллеза сельскохозяйственных животных. Задачей изобретения является повышение точности и достоверности выявления эпизоотически опасных в отношении бруцеллеза животных и дифференциальной диагностики бруцеллеза у больных животных и животных с естественно приобретенным иммунитетом или вакцинированных животных при массовом исследовании. Техническое решение заключается в том, что проводят серологическое исследование с постановкой реакции агглютинации РА с сывороткой крови животного по общепринятой методике, при этом полученный осадок РА (++++) выдерживают еще 18-20 ч в термостате при температуре 37-38°C, а затем еще один час - при комнатной температуре, и далее используют такой осадок в качестве заменителя антигена в постановке повторной реакции агглютинации. Если результат по РА отрицателен, то дополнительно проводят бактериологическое исследование, при котором осуществляют посев патологического материала от животных - агаровые питательные среды на основе мясного бульона и при выявлении характерных колоний бруцелл проводят реакцию преципитации. Используемые для выявления бактерий бруцеллеза животных способом по изобретению питательные среды готовят на основе мясного бульона, причем в питательной среде для выявления бактерий бруцеллеза у крупного рогатого скота в качестве основы для бульона используют смесь измельченных трубчатых, позвоночных костей и ребер с добавлением измельченного на куски мяса, для выявления бактерий бруцеллеза у мелкого рогатого скота используют семенники козлов и баранов, взятые в равных количествах 1:1, а для выявления бактерий бруцеллеза у подопытных животных, таких как кролики, морские свинки, используют мясо кролика.

B1

043499

043499

B1

Изобретение относится к области ветеринарии, в частности к способу диагностики бруцеллеза сельскохозяйственных животных в питательной среде для диагностики.

Бруцеллез - это зооантропонозная инфекция (болезнь), которая наносит ущерб и снижает до 50% фактической стоимости каждого животного вследствие принудительной бойни в животноводческих хозяйствах. В настоящее время государством осуществляется ряд мер по ликвидации бруцеллеза, увеличивают количество профилактических мероприятий, ведутся научные исследования, но, несмотря на это, ликвидация этого заболевания остается актуальной проблемой.

Питательные среды - биологические препараты, используемые для выращивания микроорганизмов и изучения культуральных, биохимических, антигенных свойств.

Известна питательная среда, основой которой является агар Мартена следующего состава, г/л: пептон Мартена - 0,5; хлористый натрий - 3,0; 20% гидроокись натрия - 3,0; агар микробиологический - 2,0; мясная вода - 0,5 л; рН 7,2±0,1 (Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Вельская Н.А. Микробиология. - М.: Медицина, 1987).

Недостатком данной среды является ее низкая продуктивность.

Наиболее близким к заявляемому относится плотный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (ППГГА), эту среду применяют для исследования и культивирования *Br. abortus*, *Br. melitensis* и *Br. suis*. Для получения среды берут 400 г свежей говяжьей печени, освобождают ее от жира и пленок, измельчают на куски по 5-8 г, добавляют 0,5 л водопроводной воды и кипятят в течение 1 ч. Затем фильтруют через нейлоновый или ватный фильтр. Этот печеночный отвар разводят пополам водопроводной водой, добавляют 1% пептона, 0,5% химически чистого хлорида натрия, 2,5% агара и 17 мл на 1 л 10%-ного раствора гидрокарбоната натрия (найденно на сайте "Бруцеллез сельскохозяйственных животных").

Сущность заявленного изобретения заключается в том, что для достоверности и точности выявления эпизоотической оценки на бруцеллез стад крупного и мелкого рогатого скота проводят диагностику на бактерии бруцеллеза *Br. abortus*, *Br. bovis*, *Br. melitensis*, *Br. suis*, *Br. ovis*, используя, в частности, питательные среды на основе мясного бульона.

Задачей изобретения является повышение точности и достоверности выявления эпизоотически опасных в отношении бруцеллеза животных и питательная среда для выявления бактерий бруцеллеза, которое решается исключением недостатков при агглюцинации (РА) с более высокими качественными характеристиками.

Поставленная задача решается, в частности, за счет использования питательной среды на основе мясного бульона.

Причем в среде для выявления бактерий бруцеллеза у крупного рогатого скота (КРС) в качестве основы для бульона используют смесь измельченных трубчатых, позвоночных костей и ребер с добавлением измельченного на куски мяса, для выявления бактерий бруцеллеза у мелкого рогатого скота (МРС) используют семенники козлов и баранов, взятые в равных количествах 1:1, а для выявления бактерий бруцеллеза у подопытных животных (ПЖ), таких как кролики, морские свинки, используют мясо кролика.

При этом основу для бульона пропускают через мясорубку и разводят дистиллированной водой из расчета 2,5 л воды на 1 кг основы для бульона, настаивают в прохладном месте в течение 30 мин, затем кипятят в течение 20 мин, полученный бульон охлаждают, снимают верхнюю жировую часть с застывшего бульона и пропускают его через марлево-ватный фильтр, отделяя от мелких костей бульон, в полученный бульон добавляют 3-5 г хлористого натрия и 10-25 г тщательно промытого и отжатого агар-агара и 10-20 мл глицерина, полученную смесь стерилизуют в автоклаве под давлением 1,5 атм в течение 40 мин до полного растворения агар-агара, готовят слабо-щелочную питательную среду с рН 7,2-7,6, полученную смесь разливают в пробирки, чашки Петри или в посевные колбы и затем однократно стерилизуют при температуре 110°C под давлением 1,5 атм в течение 30 мин.

Полученные таким образом питательные среды до посева бруцеллезного микроба для стерильности помещают в термостат при температуре 37°C на 72 ч.

Примеры составов питательных сред приведены в табл. 1.

Таблица 1

№ ш/п	КРС	МРС	ПЖ
Бульон	Кости и куски мяса 1кг + 2,5 л воды	Семенники козлов и баранов 1кг + 2,5л воды	Мясо кролика 1кг + 2,5 воды
Хлорид натрия,г	3 4 5	3 4 5	3 4 5
Агар-агар,г	10 20 25	10 20 25	10 20 25
Глицерин,г	10 15 20	10 15 20	10 15 20
рН	7,2-7,6	7,2-7,6	7,2-7,6

Известен способ получения бруцеллезного антигена, используемый для диагностики бруцеллеза, который включает культивирование бруцелл, отмывание микробных клеток, обработку их фенолом [Григорьева Г.И., Игнатов П.Е., Федоров А.И. Способ получения антигенов из бактерий рода *Brucella*. А.с. № 1631786. СССР. 1988].

Однако антиген, полученный известным способом, используется только для постановки реакции агглютинации, с помощью которой обнаруживают специфические антитела в сыворотке больных бруцеллезом животных и людей.

Известен также способ получения антигена для дифференциальной диагностики вакцинированных и больных бруцеллезом животных, включающий экстракцию липополисахарида из бруцелл вида *abortus* обработкой 2%-ым раствором уксусной кислоты в присутствии 10%-ного раствора NaCl при автоклавировании, отделение экстракта центрифугированием, фракционирование супернатанта спиртом, выделение О-полисахарида из полученного осадка с последующей его очисткой, при этом выделение О-полисахарида осуществляют трихлоруксусной кислотой на холоду в течение 15 мин, а очистку проводят гель-фильтрацией в агарозе (RU 2035188 С, кл. А61К 39/10, от 21.02.1992).

Недостатком данного способа является его трудоемкость, сложность и длительность. Необходимость использования трудоемкого процесса гель-фильтрации в 1,6%-ной агарозе и дополнительное осаждение белков трихлоруксусной кислотой значительно понижали выход конечного продукта (О-ПС антигена). Кроме того, очистка антигена с помощью гель-фильтрации требует громоздкого и дорогостоящего оборудования и реактивов, что существенно повышает стоимость конечного продукта.

Наиболее близкий способ диагностики и выявления больных бруцеллезом животных раскрыт в "Наставлении по диагностике бруцеллеза животных № 13-5-02/0850 от 29 сентября 2003 г."

Диагностику больных животных проводят следующим образом.

Для исследования на бруцеллез молоко для КРС или МРС из каждого стерильного удоа берут 10-15 мл и сливают в исследуемые стерильные пробирки.

Исследование проводят на свежееохлажденном молоке до 4-10°C, добавляют в каждую пробирку по одной капли 10%-ного раствора формалина на 5 мл молока. Перед исследованием молоко тщательно перемешивают для равномерного распределения сливок.

Для кольцевой реакции не рекомендуют использовать молоко от коров или буйволиц больных маститом или болезнями, сопровождающиеся повышенной температурой, так как антиген обесцвечивается.

Кровь у животных берут из яремной вены. Сыворотку крови готовят методом отстоя, для этого пробирки с кровью помещают в термостат на 1 ч при температуре 38°C, сгустки крови отделяют от стенок пробирки и выдерживают в термостате при температуре 10°C. Через 20-24 ч после взятия крови, отстоявшуюся сыворотку подвергают исследованию.

Реакцию агглютинации проводят в серологических пробирках в объеме 1 мл в четырех разведениях:

при исследовании сывороток крови овец, коз, оленей (маралов) и собак - 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200; людей, крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов - 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400; пушных зверей и морских свинок - 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80.

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок. В пробирках первого ряда делают исходное разведение. Для этого сыворотку крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов берут в дозе 0,1 мл, вносят в пробирку, добавляют к ней 2,4 мл соответствующего раствора хлорида натрия, смешивают и получают разведение сыворотки 1:25. Сыворотку крови овец, коз, оленей (маралов) и собак берут в дозе 0,2 мл и добавляют 2,3 мл соответствующего раствора хлорида натрия (разведение 1:12,5), а сыворотку крови пушных зверей и морских свинок берут в дозе 0,3 мл и добавляют 1,2 мл соответствующего раствора хлорида натрия (разведение 1:5). Таким образом, делают исходное разведение испытуемых сывороток в пробирках первого ряда штатива (по 10 проб в ряду).

После приготовления исходного разведения сывороток в первом ряду в пробирки третьего, четвертого и пятого рядов вносят по 0,5 мл соответствующего раствора хлорида натрия. Затем из пробирок первого ряда при помощи группового дозатора Флоринского или индивидуальных пипеток-дозаторов переносят в пробирки второго и третьего рядов по 0,5 мл исходного разведения сывороток (1:25; 1:12,5 или 1:5). В пробирках третьего ряда сыворотки смешивают, по 0,5 мл этого разведения переносят в пробирки четвертого ряда и также из пробирок четвертого ряда - в пятый. Из пробирок пятого ряда 0,5 мл жидкости удаляют.

Таким образом, делают последовательные двукратные разведения сывороток.

После этого в каждую пробирку второго, третьего, четвертого и пятого рядов с разведенными сыворотками вносят при помощи группового дозатора Флоринского или другого дозирующего устройства по 0,5 мл антигена, предварительно разведенного 1:10 соответствующим раствором хлорида натрия.

После добавления антигена разведение сыворотки в каждой пробирке удваивается и, в зависимости от вида исследуемых животных, будет составлять 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400; 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200 или 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80.

При массовых исследованиях сыворотки разливают индивидуальной микропипеткой (с грушей) или групповыми дозаторами Флоринского в две пробирки в дозах 0,02 и 0,01 мл (сыворотки крупного рога-

того скота, лошадей и верблюдов) или 0,04 и 0,02 мл при исследовании сывороток овец, коз, оленей (маралов) и собак. Затем в каждую пробирку добавляют по 1,0 мл антигена, разведенного соответствующим раствором хлорида натрия 1:20. При этом разведения сывороток будут соответственно 1:50 и 1:100 или 1:25 и 1:50.

При постановке реакции агглютинации одновременно с испытуемыми сыворотками ставят контроли с негативной и позитивной бруцеллезной сыворотками в таких же разведениях.

После добавления к испытуемым и контрольным сывороткам антигена штативы с пробирками встряхивают для смешивания компонентов и помещают в термостат при 37-38°C на 16-0 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции.

Учет реакции агглютинации. Результаты реакции учитывают визуально, определяя степень просветления жидкости, внешний вид агглютината (при его наличии) или антигена на дне пробирки до и затем, после легкого встряхивания, оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ (4 креста) - полное просветление жидкости, микробные клетки антигена осели на дно пробирки в виде "зонтика", при легком встряхивании "зонтик" разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остается прозрачной (100% агглютинации);

+++ (3 креста) - неполное просветление жидкости и хорошо выраженный "зонтик" (75% агглютинации);

++ (2 креста) - неполное просветление жидкости, "зонтик" умеренно выражен (50% агглютинации);

+ (1 крест) - едва заметное просветление жидкости, "зонтик" выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество хлопьев или комочков (25% агглютинации); наступило, на дне пробирки по центру образуется небольшой осадок микробов антигена в виде точки или пятна. При встряхивании осадок легко разбивается, поднимается вверх в виде косички и равномерно распределяется в жидкости, которая при этом приобретает первоначальную мутность.

За титр антител принимают наибольшее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация на 2 креста (++) , что соответствует количеству международных единиц (МЕ) антител в 1 мл сыворотки (например, сыворотка с титром 1:100 содержит 100 МЕ, 1:200-200 МЕ и т.д.).

В предлагаемом способе осадки, которые образуются в результате положительной РА выдержанные после 18-19-часовой выдержки, можно использовать как и антигены наряду с противобруцеллезной сывороткой (позитив и негатив). Сыворотку до использования разводят в титрах 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 в выше указанном режиме оставляют в термостате и при комнатных условиях.

Предлагаемое техническое решение представляет собой способ дифференцированной диагностики бруцеллеза у больных животных и животных с естественно приобретенным иммунитетом или вакцинированных животных при массовом исследовании, который заключается в том в том, что проводят серологическое исследование с постановкой реакции агглютинации РА с сывороткой крови животного по общепринятой методике, при этом полученный осадок РА (++++) выдерживают еще 18-20 ч в термостате при температуре 37-38°C, а затем еще один час - при комнатной температуре, и далее используют такой осадок в качестве заменителя антигена в постановке повторной реакции агглютинации, и если результат такой РА в разведениях ниже диагностического титра отрицательный, а выше диагностического титра - положительный, то животное признается не больным бруцеллезом, а если результат по РА отрицателен, то дополнительно проводят бактериологическое исследование, при котором осуществляют посев патологического материала от животных на мясной бульон и агаровые питательные среды по п.1 формулы, далее при выявлении характерных колоний бруцелл их смывают фенолизированным физиологическим раствором, полученную суспензию инактивируют и используют без разбавления в качестве заменителя антигена при постановке кольцевой реакции преципитации КРП, и если в контроле при реакции между единым бруцеллезным антигеном и моноспецифической бруцеллезной сывороткой отмечается положительная КРП, а между приготовленной суспензией - заменителем антигена и моноспецифической сывороткой - отрицательная КРП, животное признается не больным бруцеллезом, а если между суспензией - заменителем антигена и моноспецифической бруцеллезной сывороткой отмечается положительная КРП, то животное признается больным бруцеллезом (см. табл. 2).

Таблица 2

Диагностическая оценка реакции

Результаты реакций			Диагностическая оценка
Серологическая (РА) после 18-19 часовой выдержки	Серологическая (РА) заменитель антигена	Серологическая Кольцевая реакция преципитации (КРП)	
Положительный	Положительный	Отрицательный	Здоров
Отрицательная	Не исследуется	Положительный	Болен
Положительный	Отрицательный	Отрицательный	Здоров

Таким образом, предлагаемый способ дифференцированной диагностики бруцеллеза включает одновременно серологические и бактериологические массовые исследования, при этом сокращается время бактериологических исследований, для которых не требуется использования сложного оборудования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Питательная среда на основе мясного бульона для выявления бактерий бруцеллеза животных, содержащая химически чистый хлористый натрий, агар-агар и глицерин, отличающаяся тем, что в питательной среде для выявления бактерий бруцеллеза у крупного рогатого скота в качестве основы для бульона используют смесь измельченных трубчатых, позвоночных костей и ребер с добавлением измельченного на куски мяса, для выявления бактерий бруцеллеза у мелкого рогатого скота используют семенники козлов и баранов, взятые в равных количествах 1:1, а для выявления бактерий бруцеллеза у подопытных животных, таких как кролики, морские свинки, используют мясо кролика, при этом основу для бульона пропускают через мясорубку и разводят дистиллированной водой из расчета 2,5 л воды на 1 кг основы для бульона, настаивают в прохладном месте в течение 30 мин, затем кипятят в течение 20 мин, полученный бульон охлаждают, снимают верхнюю жировую часть с застывшего бульона и пропускают его через марлево-ватный фильтр, отделяя от мелких костей бульон, в полученный бульон добавляют 3-5 г хлористого натрия, 10-25 г тщательно промытого и отжатого агар-агара и 10-20 мл глицерина, полученную смесь стерилизуют в автоклаве под давлением 1,5 атм в течение 40 мин до полного растворения агар-агара, готовят слабо-щелочную питательную среду с рН 7,2-7,6, полученную смесь разливают в пробирки, чашки Петри или в посевные колбы и затем однократно стерилизуют при температуре 110°C под давлением 1,5 атм в течение 30 мин.

2. Способ дифференцированной диагностики бруцеллеза у больных животных и животных с естественно приобретенным иммунитетом или вакцинированных животных при массовом исследовании, заключающийся в том, что проводят серологическое исследование с постановкой реакции агглютинации РА с сывороткой крови животного по общепринятой методике, при этом полученный осадок РА (++++) выдерживают еще 18-20 ч в термостате при температуре 37-38°C, а затем еще один час - при комнатной температуре, и далее используют такой осадок в качестве заменителя антигена в постановке повторной реакции агглютинации, и если результат такой РА в разведениях ниже диагностического титра отрицательный, а выше диагностического титра - положительный, то животное признается не больным бруцеллезом, а если результат по РА отрицателен, то дополнительно проводят бактериологическое исследование, при котором осуществляют посев патологического материала от животных на мясной бульон и агаровые питательные среды по п.1 формулы, далее при выявлении характерных колоний бруцелл их смывают фенолизированным физиологическим раствором, полученную суспензию инактивируют и используют без разбавления в качестве заменителя антигена при постановке кольцевой реакции преципитации КРП, и если в контроле при реакции между единым бруцеллезным антигеном и моноспецифической бруцеллезной сывороткой отмечается положительная КРП, а между приготовленной суспензией - заменителем антигена и моноспецифической сывороткой - отрицательная КРП, животное признается не больным бруцеллезом, а если между суспензией - заменителем антигена и моноспецифической бруцеллезной сывороткой отмечается положительная КРП, то животное признается больным бруцеллезом.

