

ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

**СРАВНИТЕЛНО ИЗПИТВАНЕ ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА НА РЕАКЦИЯ
ЗА СВЪРЗВАНЕ НА КОМПЛЕМЕНТА (РСК) ИЗВЪРШЕНА
ПРИ 4⁰ С И 37⁰ С ЗА ДИАГНОСТИКА НА БРУЦЕЛОЗА
ПРИ ГОВЕДАТА**

СТОЯНКА АТАНАСОВА, МАРИНА ДРАГОЙЧЕВА, МАРИН ЙОСИФОВ*,
ЕВГЕНИЯ ДИМИТРОВА

Национален диагностичен научноизследователски
ветеринарномедицински институт - София

*Институт по животновъдни науки - Костинброд

Съветът на общността, с Решение на Комисията от 4 март 2004 г. относно одобряване на тестовете за откриване на антитела срещу бруцелоза по говедата в рамките на Директива 64/432/ЕИО, приема РСК като един от основните тестове за серологична диагностика на бруцелоза при говедата (3). Методът показва висока чувствителност и специфичност, което е от особена важност за правилното и своевременно диагностициране на *Brucella sp.* (Масалски, Н., 2008). Според редица автори (Костов, Г., 1995; Масалски, Н., 2008.; Burgess G. W, M. J. Norris, 1982) чрез РСК се откриват антитела на *Brucella sp.* още от втората седмица на заразяването.

РСК се поставя в два варианта - при 37⁰С и при 4⁰С, известни като РСК на "топло" и на "студено". Различни автори изразяват различни предпочитания към съответните варианти. Al Dahouk et al. (2003), Niilo et al. (1986), Searson (2000) смятат, че РСК при 37⁰С притежава по-висока чувствителност в сравнение с тази, проведена при 4⁰С. Други автори (Burgess G. W, M. J. Norris, 1982; Ramirez-Pfeiffer C. et al., 2007; Ridler A. L., 2002) намират по-високи титри на антителата при поставяне на РСК при 4⁰С.

В Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2009, раздел 2.4.3. (9, 2008), по който са задължени да работят НРЛ "Бру-

целоза" при НДНИВМИ и всички други лаборатории в системата на БАБХ, методът е описан и в двата варианта.

Референтната лаборатория "Бруцелоза" на ЕС в Maisons-Alfort Париж разработва РСК за диагностика на бруцелоза при говедата при 4⁰С. Същата препоръчва, без да задължава, този вариант на РСК на референтните лаборатории от страните, членки на ЕС. Стандартната оперативна процедура (СОП) за РСК при 4⁰С на тази лаборатория се базира на съответните нормативни документи (8).

Референтната лаборатория "Бруцелоза" при VLA Weybridge разработва същия метод при 37⁰С.

С настоящото изпитване си поставихме за цел да сравним чувствителността на РСК за диагностика на бруцелозата при говедата, проведена при 37⁰С и при 4⁰С и да отговорим кой от вариантите е с по-голяма диагностична стойност.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За целта на изпитването използвахме 25 серумни проби от говеда. Пробите и стандартната оперативна процедура за разработване на РСК на "студено" ни бяха предоставени от Референтната лаборатория "Бруцелоза" на ЕС в Maisons-Alfort Париж. При този вариант на

реакцията общият обем на реагентите е 2.5 ml, а първа фаза на реакцията е 16-18 h при 4°C. Реакцията се отчита след центрофугиране на пробите и контролите непосредствено след втора фаза (30 min при 37°C) на 800-1200 оборота за 10 min в охлаждаща центрофуга при 3°C.

Изследванията по РСК при 37°C извършихме според СОП на нашата лаборатория, базирана на Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2008, раздел 2.4.3. (9) и съобразена с изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025. Общият обем на реагентите също е 2.5 ml, а първа фаза на реакцията е 30 min при 37°C.

За разработването на двата варианта на ме-

комплемент и хемолизин титрирахме непосредствено преди започване на главния опит по метода за титрация на тези компоненти описан в СОП.

Интензивността на инхибиране на хемолизата при отделните проби и съответните разреждания изразявахме по следния начин:

- 0 = 0% инхибиране (пълна хемолиза);
- 1x = 25% инхибиране (75% хемолиза);
- 2x = 50% инхибиране (50% хемолиза);
- 3x = 75% инхибиране (25% хемолиза);
- 4x = 100% инхибиране;

Титърът на антителата при изследваните проби изразявахме в IU/ml по следната таблица, предоставена ни от Референтната лаборатория "Бруцелоза" на ЕС:

Разреждания на пробите	Инхибиране на хемолизата			
	25% (+)	50% (++)	75% (+++)	100% (++++)
1/2	8.3	10	11.6	13.3
1/4	16.6	20*	23.3	26.6
1/8	33.3	40	46.6	53.3
1/16	66.6	80	93.3	107
1/32	133	160	187	213
1/64	267	320	373	427
1/128	533	640	747	853
1/256	1 067	1 280	1 493	1 707

* Според европейските норми и ОИЕ при 20 IU/ml, пробата е положителна

тода използвахме антиген *Brucella* за РСК, производство на Institut Pourquier - France, партиден № 74, годен до 31.03.2012; комплемент, производство на IDVET - France, партиден № 5ML-012 годен до януари 2013; хемолизин, производство на BioMerieux SA - France, партиден № 839762701, годен до 21.10.2011; 50%-ова суспензия на овчи еритроцити, производство на BioMerieux SA - France, партиден № 863084901, годност до 12.07.2010.

И при двата варианта пробите се инактивират при 60°C, а реакцията се отчита след втора фаза, на 2-рия и 24-ия час. На кръвните серуми извършихме серийни разреждания в геометрична прогресия както следва: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. Използваните в опита

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от сравнителното изследване (табл. 1) показват, че двата варианта на метода имат еднаква специфичност. При РСК на "студено" се установяват 13 отрицателни (N) и 12 положителни (P) проби. Същите резултати, при същите номера проби се получават и при РСК на "топло".

В чувствителността на реакцията при двата варианта също няма съществени разлики. От всичките изследвани 25 проби абсолютно еднакви резултати, изразени в IU/ml по двата варианта на РСК, получихме при 7 броя (проби №№ 2, 3, 4, 6, 12, 16 и 18). По-висок титър на антителата при варианта на "студено" получихме при проби №№ 5, 9, 13, 14 и 21, а

Таблица 1. Серумни проби от говеда, изследвани чрез РСК при 4⁰С и 37⁰С

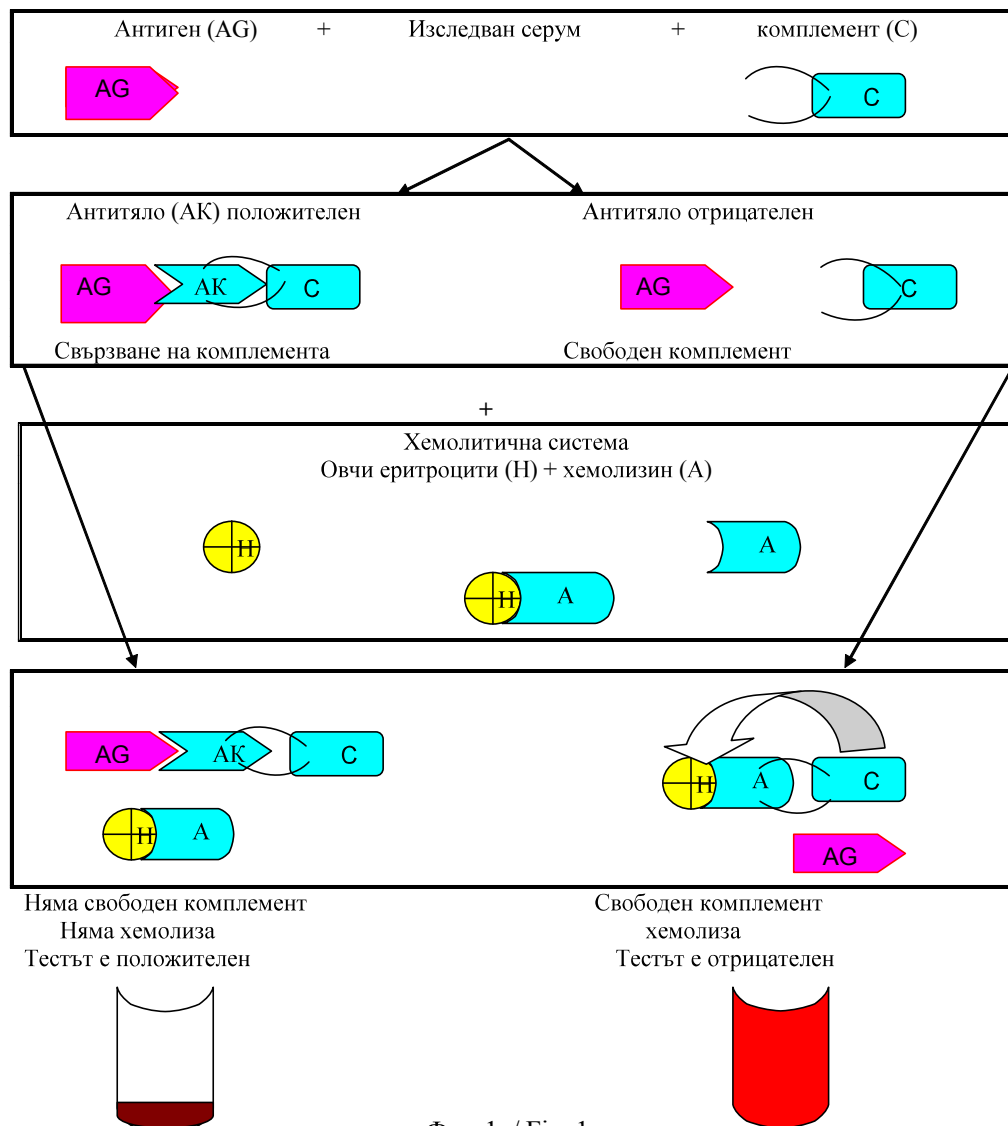
Проба №	РСК при 4 ⁰ С								РСК при 37 ⁰ С							
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	IU/ml	(P/N)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	IU/ml	(P/N)
1	0	0	0	0	0	0	0	N	1x	0	0	0	0	0	8.3	N
2	4x	4x	4x	3x	0	0	93.3	P	4x	4x	4x	3x	0	0	93.3	P
3	1x	0	0	0	0	0	8.3	N	1x	0	0	0	0	0	8.3	N
4	4x	4x	4x	4x	2x	0	160	P	4x	4x	4x	4x	2x	0	160	P
5	4x	4x	4x	4x	0	0	107	P	4x	4x	4x	2x	0	0	80	P
6	4x	2x	0	0	0	0	20	P	3x	2x	0	0	0	0	20	P
7	4x	4x	4x	2x	0	0	80	P	4x	4x	4x	3x	0	0	93.3	P
8	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0	0	0	0	0	0	N
9	4x	4x	3x	0	0	0	46.6	P	4x	4x	2x	0	0	0	40	P
10	1x	0	0	0	0	0	8.3	N	0	0	0	0	0	0	0	N
11	4x	4x	4x	2x	0	0	80	P	4x	4x	4x	4x	0	0	107	P
12	3x	1x	0	0	0	0	16.6	N	3x	1x	0	0	0	0	16.6	N
13	4x	4x	4x	3x	0	0	93.3	P	4x	4x	2x	0	0	0	40	P
14	4x	4x	4x	0	0	0	53.3	P	4x	4x	3x	0	0	0	46.6	P
15	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0	0	0	0	0	0	N
16	1x	0	0	0	0	0	8.3	N	1x	0	0	0	0	0	8.3	N
17	2x	0	0	0	0	0	10	N	1x	0	0	0	0	0	8.3	N
18	4x	4x	4x	2x	0	0	80	P	4x	4x	4x	2x	0	0	80	P
19	2x	0	0	0	0	0	10	N	0	0	0	0	0	0	0	N
20	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0	0	0	0	0	0	N
21	4x	4x	2x	0	0	0	40	P	3x	2x	1x	0	0	0	33.3	P
22	3x	2x	0	0	0	0	20	P	3x	2x	1x	0	0	0	33.3	P
23	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0	0	0	0	0	0	N
24	1x	0	0	0	0	0	8.3	N	2x	0	0	0	0	0	10	N
25	0	0	0	0	0	0	0	N	0	0	0	0	0	0	0	N

при варианта на "топло" по-висок титър се установява при проби №№ 7 и 11. Получените от нас резултати съвпадат с резултатите на **Burgess (1982)**, **Ramirez-Pfeiffer et al. (2007)** и **Ridler et al. (2002)**, които намират по-високи титри на антителата при поставяне на РСК при 4⁰С. Ние смятаме обаче, че получените разлики са несъществени и не оказват влияние върху окончателния резултат, т.е дали дадена проба е серологично положителна или отрицателна.

Като цяло, данните от нашето изпитване не се различават от данните в изследванията

на **Костов (1995)** и някои други автори (**Searson, J., 2000**), които твърдят, че Реакция за свързване на комплемента, извършена при 4⁰С и при 37⁰С, показва еднаква чувствителност и специфичност.

Различията в твърденията на **Searson, J. (2000.)** в полза на РСК на "студено" може да се отдадат на различията в използвания за реакцията антиген. Според нас не би трябвало да има съществени разлики в крайния резултат, независимо от температурата при която се осъществява първата фаза на реакцията, поради това че принципът на РСК е един и



Фиг. 1. / Fig. 1.

същ (фиг. 1). Ако в изследвания серум има антитела, то тогава комплементът при всички обстоятелства би се присъединил към антиген-антитяло комплекса. По същия начин би останал свободен при отсъствие на антитела в изследвания серум.

Като заключение може да кажем, че двата варианта на РСК при серологична диагностика на бруцелоза по говедата са с еднакви качества и всяка лаборатория може сама да определи по кой вариант да работи. Според нас не е необходимо да се удължава времето за изследване с почти 24 h, прилагайки варианта

на "студено". От опит знаем, че понякога бързината на изследването (без това да вреди на качеството) е от голямо значение за ветеринарномедицинската практика.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Костов, Г.**, 1995. Сравнително изпитване на диагностичната стойност на РСК на "топло" и "студено" със серуми от кочове с естествена инфекция *Brucella ovis*. Ветеринарна сбирка, 9-10; 15-21.
2. **Масалски, Н.**, 2008. Заразни болести по овцете. ИК "Еньовче", С.

3. Решение на Комисията от 4 март 2004 година относно одобряване на тестовете за откриване на антитела против бруцелоза по говедата в рамките на Директива 64/432/ЕИО на Съвета (нотифицирано под номер С (2004) 654).
4. **Al Dahouk, S., H. Tomaso, K. Nockler, H. Neubauer, D. Frangoulidis**, 2003. Laboratory based diagnosis of brucellosis: A review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab*; 49:487-505.
5. **Burgess G. W, M. J. Norris**, 1982. Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. *Australian Veterinary Journal*, 1; 23-25.
6. **Mantur B. G, A. S. Akki, S. S. Mangalgi, S. V. Patil, R. H. Gobbur, B. V. Peerapur**, 2004. Childhood brucellosis - a microbiological, epidemiological and clinical study. *J Trop Pediatr*; 50 :1537.
7. **Niilo L, W Donald, Mac Donald, F Gordon, and M. William Stone**, 1986. Ovine Brucellosis in Alberta *Can Vet J*. 27(6), 245-249
8. **Normative references**
 - ▶ Bovine brucellosis, *In*: The OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), 6th Edition 2008, Chapter 2.4.3, OIE, Paris, 624-659. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf
 - ▶ Commission Decision of 10 December 2008 (2008/984/EC) amending Annex C to Council Directive 64/432/EEC and Decision 2004/226/EC as regards diagnostic tests for bovine brucellosis (*notified under document number C(2008) 7642*). Official Journal of the European Union, L 352/38-L 352/45.
- ▶ ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- ▶ OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories, 2nd Edition, 2008, OIE, Paris.
- ▶ Norme Francaise (French Standard) NF U 47-004 - Methodes d'analyse en sant? animale, Recherche d'anticorps contre la brucellose par la micro-m?thode de fixation du compl?ment, avril 2009, AFNOR, France.
9. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2008. Office International des Epizooties, Paris, France.
10. **Ramirez-Pfeiffer C., K. Nielsen, P. Smith, F. Marin-Ricalde, C. Rodriguez-Padilla, and R. Gomez-Flores**, 2007. Application of the Fluorescence Polarization Assay for Detection of Caprine Antibodies to *Brucella melitensis* in Areas of High Prevalence and Widespread Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*, March, Vol. 14, No. 3, 299-303.
11. **Ridler A. L., D. M. West, K. J. Stafford, P. R. Wilson, M. G. Collett**, 2002. Effects of vaginal *Brucella ovis* infection of red deer hinds on reproductive performance, and venereal transmission to stags. *New Zealand Veterinary Journal*, Vol. 50, N 4, 1, 126-131(6).
12. **Wanke, M. M., M. V. Delpino, P. C. Baldi**, 2002. Comparative performance of ELISA assay using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet. Microbiol*, 88, 367-375.
13. **Searson, J.**, 2000. Sensitivity and specificity of two microtiter complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J*.

A COMPARATIVE STUDY ABOUT THE SENSITIVITY
OF THE COMPLEMENT FIXATION TEST (CFT) IN DIAGNOSTIC
OF THE DISEASE BRUCELLOSIS IN COWS HELD IN 4⁰ C AND 37⁰ C

S. Atanasova , M Dragoycheva., M Yossifov, E. Dimitrova*
National Diagnostic Research Veterinarymedical Institute - Sofia
**Institute of Animal Sciences - Kostinbrod*

SUMMARY

It was made comparative test about the sensitivity of the CFT method in in diagnostic of the disease brucellosis in cows. The reaction was placed ad 4⁰ C and 37⁰ C. The obtained results that both variants of the CFT were with equal sensitivity and specificity. This allows diagnostic laboratory to choose under what kind of conditions to work.