

УДК. 619:616.988:614.47

ЎЗБЕКИСТОНДА ҚИШЛОҚ ХЎЖАЛИК ҲАЙВОНЛАРИ БРУЦЕЛЛЁЗИНИНГ ДИАГНОСТИКА ВОСИТАЛАРИНИ ТАКОМИЛЛАШТИРИШ

Саидов А.А

таянч-докторант,

Рузимуродов М.А

в.ф.н., катта илмий ходим,

Улуғмурадов А.Д

в.ф.ф.д., кичик илмий ходим,

Қуватов Б.Х

., кичик илмий ходим.

Ўзбекистон Республикаси, Самарқанд ш., Ветеринария илмий-тадқиқот институти, e-mail:nivi@vetgov.uz

Аннотация: В статье приведены результаты испытаний отечественных гемолизина и комплемента, разработанных в качестве дженериков и столь необходимых при постановке реакции связывания комплемента используемого для диагностики бруцеллёза и других особо опасных болезней сельскохозяйственных животных.

Калит сўзлар: Бруцеллёр, эпизоотология, эпизоотик жараён, диагностика, комплемент боғлаш реакцияси, гемолизин, комплемент, антиген, зардоб, эритроцитлар.

Summary: The article presents the results of tests of domestic hemolysin and complement, developed as generics and so necessary when setting up the complement fixation reaction used to diagnose brucellosis and other especially dangerous diseases of farm animals.

Keywords: Brucellosis, epizootology, epizootic process, diagnostics, complement fixation reaction, hemolysin, complement, antigen, serum, erythrocytes.

I. Асослаш

Ўзбекистонда эпизоотияга қарши чора-тадбирларни ҳуқуқий тартибга солиш масалалари энг жиддий эътиборни талаб қилади. Зооноз инфекция бўлган бруцеллёр касаллигига келсак, бу масалалар янада долзарб бўлиб бормоқда, чунки улар катта ижтимоий ва иқтисодий аҳамиятга эга. ФАО/ЖССТнинг бруцеллёр бўйича эксперт қўмитаси таъкидлашича,



бруцеллёз дунёнинг 170 дан ортиқ мамлакатларида кенг тарқалган бўлиб, уларда касалларнинг ҳақиқий сони йилига 5-12,5 миллион кишини ташкил қилади [1].

Бруцеллёз касаллигининг бутун дунё бўйлаб тарқалиши, хусусан, Ўзбекистонда мавжуд бўлишининг сабабларидан бири чорвачиликнинг жадал ривожланиши, маълум ёки қўшни ҳудудларга чорва молларининг миграцияси, диагностика воситаларининг етарли даражада ва ўз вақтида таъминланмаганлиги, касалликни ташхислашнинг етарли даражада ривожланмаганлиги, утилизация қилинган ҳайвонни аниқлаш ва компенсация қилиш тартиби, бунинг натижасида ушбу касаллик бўйича эпизоотик вазият устидан самарали назорат бузилиши ҳисобланади.

Ўзбекистонда ветеринарияда ФАО/БҲСХҚТ (Бутунжаҳон ҳайвонлар соғлиғини ҳимоя қилиш ташкилоти) томонидан мавжуд, маълум бўлган ва тавсия этилган барча бруцеллёз диагностикаси усулларида, яъни РБН (Роз-бенгал намуна), АР (агглютинация реакцияси), КБР (комплемент боғлаш реакцияси), КУБР (комплементни узоқ боғлаш реакцияси), ХР (сутда ҳалқа реакцияси), ИФТ (иммунофермент таҳлил), ПЗР (полимераза занжирли реакция), аллергия усуллар ва ҳаказолар қўлланилади [5,6]. Юқоридаги барча тестлардан ўтмишда ҳам, ҳозир ҳам барча мамлакатларда, асосий серологик усуллар классик РБН (Рос-бенгал намунаси), агглютинация реакцияси (РА) ва комплемент боғлаш реакцияси (КБР) ҳисобланади.

Комплемент боғлаш реакцияси биринчи марта 1901 йилда Генгон, Бордет томонидан тавсифланган. Пфиффер, Иссаефф (1894) ва Бордет томонидан гемолиз (1898) аллақачон маълум бўлган бактериолиз ҳодисаларини бирлаштириб, улар орасига оз миқдорда гемолизин ва комплемент қуйиб, классик комплемент боғлаш реакциясини яратдилар.

КБР икки босқичли серологик реакциядир. Биринчи босқичда синалаётган тизимда антиген-антитело комплекси ҳосил бўлади, у комплемент билан ўзаро таъсир қилади, иккинчи босқичда эса гемолиз реакцияси. Агар биринчи босқичда комплемент реакцияда иштирок этмаса, иккинчи босқичда эритроцитлар гемолизи содир бўлади. Шунинг учун гемолизин (ёки гемолитик зардоб) ва комплемент КБРнинг ажралмас компонентлари ҳисобланади. Шундай қилиб, ушбу компонентларнинг ўзаро таъсири механизмига кўра, КБР комплементнинг қўшимча иштироки билан гемолиз чегарасини белгилайди. КБРда комплементдан ташқари иккита антиген-антитело комплекси иштирок этади. Улардан бири, аниқ маълум ва стандартлаштирилган, гемолизин билан сенсбилизацияланган қўчқор эритроцитларининг суспензияси бўлган



индикатор (гемолитик) тизим деб аталади. Бошқа антиген-антитело комплекси тест тизимини ташкил қилади. Комплекмент тизими қонда доимо мавжуд бўлган ҳимоя оқсиллари мажмуасидир. Ушбу тизимнинг С1, С2, С3 ва С4 тўртта компоненти маълум бўлиб, улар фақат биргаликда ишлайди. Ушбу компонентлардан бирининг йўқлиги унинг фаолиятдан маҳрум бўлишига олиб келади. Комплекмент антибактериал таъсирга эга бўлишидан ташқари, у ҳужайраларга қарши антителоларнинг таъсирини ҳам фаоллаштиради ва тўлдиради. Шунинг учун комплекментни боғлаш реакциясидан антиген ва ггантителоларни аниқлаш ва миқдорини аниқлаш учун ҳам фойдаланиш мумкин. Серологик таҳлилнинг бу усули преципитация, агглютинация ва нейтраллаш усулларига нисбатан сезгирлиги билан солиштириш мумкин, яъни антителоларнинг 0,05 мкг ± 5% гача азотини аниқлаш имконини беради [2,3,4].

Олимларнинг умумий фикрига кўра, КБРнинг АРдан устунлиги шундаки, бу реакция доимийроқ бўлиб, бироз кечроқ пайдо бўлади, лекин бруцеллёз билан касалланган ҳайвонларда АРга қараганда узоқроқ давом этади, ундаги зона ҳодисаси бундан мустасно. Унинг муҳим камчилиги шундаки, у назорат билан икки даврда ишлаб чиқарилади ва битта ўрнига тўртта реагентдан фойдаланишни талаб қилади. У агглютинация реакциясини алмаштира олмайди, шунинг учун АР ва КБРда ҳайвонларнинг қон зардобини бир вақтнинг ўзида ўрганиш билан яхши натижаларга эришилади. Николетти, Холмес (1966), П.А.Вершилова (1961) ва бошқа тадқиқотчиларнинг фикрича, одамлар ва ҳайвонларда АР ва КБР махсус ва ишончли ҳисобланади.

Амерлаут Г.А. (1961) томонидан икки турдаги оқсиллар - агглютининлар Ig M - термолабил, юқори молекуляр оғирликка эга, +65°C ҳароратда парчalandи ва Ig G - паст молекуляр оғирликдаги термостабил, 15 дақиқа давомида +65°C гача қиздиришга бардош бериши кашф этилгандан сўнг, агглютининларнинг ушбу синфлар пайдо бўлиш вақтини аниқлаш ва шу билан бруцеллёзнинг ўткир ва сурункали шаклларини фарқлаш мумкин бўлди. Шу билан бирга, 1974 йилда Герберт ва 1981 йилда Берман ҳарорат ва вақт АР ва КБР кўрсаткичларига сезиларли таъсир кўрсатишини таъкидладилар.

Ҳозирги вақтда ВИТИ бруцеллёз лабораторияси мутахассислари томонидан барча диагностика воситалари, яъни РБН, ХР, АР ва КБР учун антигенлар, шунингдек, ижобий ва салбий назорат зардоблари ишлаб чиқилган бўлиб, улар Ўзбекистон Республикаси Давлат Ветеринария қўмитаси ҳузуридаги ветеринария дори воситалари, озуқавий қўшимчалари сифати ва муомаласини назорат қилиш Давлат илмий марказида муваффақиятли рўйхатга олинган. Шу билан бирга, маҳаллий гемолизин ва комплекмент ишлаб



чиқариш масаласи очиклигича қолмоқда, уларсиз нафақат бруцеллёз ташхисида, балки юқумли эпидидимит, туберкулёз, оқсилни типизациялашда, манқа ва бошқа ўта хавфли юқумли касалликлар диагностикасида ишлатиладиган КБР ва КУБР реакцияларини қўйишни амалга ошириш мумкин эмас.

Юқоридагилардан келиб чиқиб, биз гемолизин ва комплементнинг маҳаллий женерикларини ишлаб чиқиш, уларни ишлаб чиқариш ва тижоратлаштириш бўйича меъёрий-техник ҳужжатларни ишлаб чиқишни мақсад қилиб олдик.

II. Материаллар ва усуллар.

Гемолизин ишлаб чиқариш ва параметрларни ишлаб чиқиш учун В.С.Калинин ва С.И.Гинзбург ва Курск биофабрикасининг технологияси ва комплемент учун эса собиқ Алма-Ата биофабрикасининг тажрибасидан фойдаланилди. Гемолизин ва комплемент ишлаб чиқариш технологиясининг параметрларини такомиллаштириш шахсий маълумотлар ва олинган натижаларни ҳисобга олган ҳолда амалга оширилди.

Гемолитик зардоб ва комплемент ишлаб чиқариш бўйича ишда 2,5-3,5 кг оғирликдаги 25 та қуёнлар ва мос равишда 350-400 г оғирликдаги 25 дона денгиз чўққаларидан фойдаланилди.

Эритроцитлар суспензияси қоракўл зотли қўчқорлардан олинди ва классик усул бўйича Алсивер эритмасида қайта суспензия қилинди. Алсивер эритмаси 18,7 г кимёвий тоза глюкоза, 4,2 г NaCl, 8,0 г натрий цитрат ва 0,5 г лимон кислотаси 1000 мл дистилланган сувда эритиб тайёрланди. Олинган эритма қайнатилиб, пахта дока фильтр орқали филтрланди, флаконларга қуйилди ва автоклавда +105°C ҳароратда 25-30 дақиқа давомида стерилизация қилинди.

Қуёнлар қулоқ венасига 0,25 дан 1,25 мл гача кўпайиб борувчи дозаларда 3 кунлик интервал билан 0,85% физиологик эритмасидаги 40%-ли қўчқор эритроцитлари билан 3 марта инъекция қилинди. Дастлаб, қулоқ жун қопламаси тозаланиб, ксилол билан ишлов берилди. Қуёнлардан қон охириги инъекциядан 7 кундан кейин олинди. Олинган зардоб қуён комплементини парчалаш учун +56+58°C да 30 дақиқа давомида инактивация қилинди. Олинган зардобнинг бир қисми (гемолизин) 1:1 нисбатда глицерин билан, бошқа қисми эса 0,5% ли фенол билан консервацияланди ва флаконларга қуйилди.

Олинган зардоб ГОСТ 20730 талабларига жавоб берадиган гўшт-пептонли бульон (ГПБ), гўшт-пептонли агар (ГПА), вазелин мойи



иштирокидаги гўшт-пептон-жигар бульони (ГПЖБ) ва Сабуро муҳитида амалдаги рецепт бўйича тайёрланган турли хил озуқа муҳитлари ёрдамида стериллик учун синовдан ўтказилди. Озуқа муҳитларининг ҳар бири 8-10 см³ ҳажмли пробиркаларга қуйилди, пахта дока тиқинлари ва пергамент қопқоқлари билан ёпилди ва автоклавда 30 дақиқа давомида 0,15 МПа да стерилизация қилинди.

Экишлар гемолизинли ҳар бир флаконга ҳар бир муҳитдан иккита пробиркадан фойдаланган ҳолда учта флаконда ўтказилди. Бунинг учун флаконнинг таркиби спиртли олов устида аввал гўшт-пептонли бульон солинган пробиркага қуйилиб, яхшилаб аралаштирилди, сўнгра қолган пробиркалардаги муҳитларга экиб чиқилди. ГПБ, ГПА, ГПЖБдаги экмалар термостатда +37+38°C ҳароратда, Сабуро муҳитида эса +20+22°C ҳароратда 10 кун давомида сақланди.

Гемолитик зардобнинг зичлиги (Д) таркибида глицерин бўлган г/см формула бўйича ҳисобланади: $D = m/m_1$

бу ерда, m - пикнометр ҳажмидаги зардоб намунасининг массаси, г;

m₁ - пикнометр ҳажмидаги сув намунасининг массаси, г.

Икки параллел аниқлаш натижаларининг арифметик ўртача қиймати якуний синов натижаси сифатида қабул қилинди, улар орасидаги рухсат этилган фарқ 0,0008 г/см³ дан ошмаслиги керак эди.

Суюлтирувчи сифатида қорамол зардобидан ва стерил кимёвий тоза глицерин эритмасидан фойдаланилди. Гемолитик зардобнинг фаоллиги гемолитик тизимдаги қўчқор эритроцитларининг 100% гемолизи билан аниқланди. Шу билан бирга, гемолизин 1:20 суюлтирилганда комплемент билан титрланди. Гемолитик зардобнинг титри унинг энг кичик миқдори (яъни, энг юқори суюлтириш) сифатида қабул қилинди, бунда эритроцитларнинг 2,5% суспензиясининг 0,5 см³ тўлиқ (100%) гемолизи 0,5 см³ комплемент иштирокида суюлтирилганда 2,5 см³ суюқликнинг умумий ҳажмида 1:20 нисбатни ташкил қилди.

Гемолитик зардобнинг зарарсизлиги пробиркада қўчқор эритроцитларининг комплементсиз гемолизини тўлиқ йўқлиги билан тавсифланди.

Гемолитик зардобни суюлтириш схемаси 1-жадвалда келтирилган.

Гемолитик зардобнинг асосий суюлтирилиши 1:100 нисбатда тайёрланди, бунинг учун 0,1 см³ гемолитик зардоб ва 9,9 см³ физиологик эритма ўлчанди. Зардобнинг асосий суюлтирилишидан (1:100) 1:500 дан 1:2000 гача суюлтиришлар тайёрланди.



Гемолитик зардобни титрлаш схемаси 1-жадвал.

/р	Асосий суюлтириш дозаси 1:100 см ³	Физиолог ик эритма дозаси, см ³	Жами ҳажми см ³	Ҳосил бўлган суюлтириш нисбати
	0.2	0.8	1,0	1:500
	0.2	1,3	1,5	1:750
	0.2	1,8	2,0	1:1000
	0.2	2,3	2,5	1:1250
	0.2	2,8	3,0	1:1500
	0.2	3,3	3,5	1:1750
	0.2	3,8	4,0	1:2000

Турли эпизоотик ҳолатдаги хўжаликлардан келтирилган 85 намуна дала зардоблари билан қўйилган КБР Россия Федерациясининг Шёлково биофабрикасида ишлаб чиқарилган гемолизин ва комплемент билан таққосланиб, амалдаги “Ҳайвонлар бруцеллез касаллигининг диагностикаси бўйича илмий асосланган ТИЗИМ” бўйича амалга оширилди.

III. Тадқиқот натижалари

Қўчқор эритроцитлари суспензиясини охирги инъекциясидан 7 кун ўтгач, барча қуёнлар юракни пункция қилиш орқали тўлиқ (тотал) қонсизлантирилди ва олинган зардоб инактивация қинигач, 1:1 нисбатда глицерин билан стерилизация қилинди.

ГПБ, ГПА, ГПЖБда гемолизинни экиш ва иш режими +37+38°C бўлган термостатда, Сабуро муҳитида эса +20 +22°C да 10 кун давомида сақлаш орқали стериллик текширилганда, барча пробиркалардаги экмалар стерил ҳолатда қолди, яъни бегона микрофлораларнинг ўсиши кузатилмади.

Гемолитик зардобнинг зичлиги (Д) 1,135 - 1,142 г/см³ оралиғида бўлиб, бу зардобдаги глицериннинг масса улуши тахминан 50±5% га тўғри келди. Глицериннинг масса улушига асосланиб, гемолизин миқдорини ҳисоблаш КБРни қўйишда икки барабар титрни ҳисобга олган ҳолда қабул қилинди, яъни гемолизин титри 1:1000 бўлса, унинг икки марта кўпайтирилган титри 1:500



деб ҳисобланди (яъни $0,1 \text{ см}^3$ гемолизин ва $49,9 \text{ см}^3$ физиологик эритма ва бошқ.)

Барча 4 та тажриба намуналарини умумий ҳажмда аралаштириш ва глицерин қўшгандан кейин олинган гемолитик зардобни титрлаш натижалари 2-жадвалда келтирилган.

Гемолизинни титрлаш схемаси

2-жадвал

Компонентлар	Гемолизинни суюлтириш							
	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500	1:4000
Гемолизин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент (1:20)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроцитлар (2,5%-ли суспензия)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физ.эритма	1	1	1	1	1	1	1	1
Сув ҳаммоми $37-38^\circ\text{C}$ ҳароратда 10 дақиқа								
Тахминий натижа	ТГ	ТГ	ТГ	ТГ	ҚГ	ҚГ	ҚГ	ҚГ

Изоҳ: ТГ – тўлиқ гемолиз; ҚГ - қисман гемолиз

2-жадвалдаги маълумотларга асосланиб, мос равишда 1:20 нисбатда суюлтирилган 0,5 мл комплемент иштирокида 0,5 мл 2,5% эритроцитларнинг 10 дақиқа ичида тўлиқ гемолизга сабаб бўлган гемолизиннинг энг кичик титри аниқланганлигини кўриш мумкин. 1:2000 (номинал титр) ҳисобланади. Шу билан бирга, кейинги барча назорат пробиркаларда (салбий назорат) гемолиз кузатилмади. Кейинчалик, нормал зардоб билан бузилмаган ҳолда, 1:1500 ва 1:1750 титрли гемолитик зардоб олинди.

Гемолизиннинг 1:1500 ва 1:1750 титрли натижалари ушбу препаратнинг тажриба намуналари фаоллиги бўйича Россияда ишлаб чиқарилган 1:1500 ва 1:1750 титрли гемолизиндан кам эмаслигини кўрсатди.

Гемолитик тизимда маҳаллий комплементни титрлаш натижалари 3-жадвалда келтирилган. Гемолитик тизимдаги комплемент титри $+37+38^\circ\text{C}$ сув



ҳаммомида 10 дақиқа давомида эритроцитларнинг тўлиқ гемолизига сабаб бўладиган энг кичик миқдор деб ҳисобланди.

Гемолитик тизимда комплементни титрлаш схемаси

3-жадвал.

Компонентлар	Пробиркалар рақамлари									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент (1:20)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Физиологик эритма	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	-
Икки марта кўпайтирилган титрдаги гемолизин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Қўчқор эритроцитларини 2,5%-ли суспензияси	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологик эритма	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Сув ҳаммоми 37-38°С ҳароратда 10 дақиқа										
Тахминий натижа	ҚГ	ҚГ	ҚГ	ТГ	ТГ	ТГ	ТГ	ТГ	ТГ	ТГ

Изоҳ: ТГ – тўлиқ гемолиз; ҚГ – қисман гемолиз

3-жадвалда келтирилган маълумотлардан кўришиб турибдики, +37+38°С ҳароратда сув ҳаммомида 10 дақиқа давомида эритроцитларнинг тўлиқ гемолизига сабаб бўлган 1:20 нисбатда суюлтирилганда энг кичик комплемент миқдори, яъни гемолитик тизимда комплементнинг титри 0,08 га тенг.

Шундай қилиб, бруцеллез диагностикасида комплементни боғлаш реакциясини қўйишга мўлжалланган маҳаллий женериклар, яъни гемолизин ва комплементлар иштирокида ўтказилган тадқиқотлар ва синовлар Республикамизда бу компонентларни ҳам лаборатория, ҳам биосаноат шароитларида тайёрлаш зарурати ва имконияти мавжудлигини кўрсатади.



Фойдаланилган адабиётлар рўйхати:

1. Бруцеллёз. Современное состояние проблемы // Монография. под редакцией акад. РАН Онищенко Г.Г. Москва 2019.С.336
2. Горчакова Н.Г. Особенности паразитарной системы бруцеллёза / Н.Г.Горчакова // Научно-исследовательские публикации - 2017. - № 4. - С.14.
3. Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М. Биологические функции комплемента // Бюллетень сибирской медицины – 2007. – Т. 2, № 6. – С. 72–82.
4. Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М. Биологические функции комплемента // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – Т.2, № 6. - С.72–82.
5. Методические указания по диагностике бруцеллёза // Москва. 1982. №115-6а.
6. Ҳайвонлар бруцеллёз касаллигининг диагностикаси бўйича илмий асосланган ТИЗИМ // ЎзР ДВҚ Илмий-Техник Кенгашида (баён № 19, 12-декабр 2018 йилда тасдиқланган).

