

## ГЛАВА 3.1.4.

### **БРУЦЕЛЛЕЗ (*BRUCELLA ABORTUS*, *B. MELITENSIS* И *B.SUIS*) (ИНФЕКЦИЯ *BRUCELLA ABORTUS*, *B. MELITENSIS* И *B.SUIS*)**

---

#### **РЕЗЮМЕ**

**Описание болезни:** Бруцеллез – это общее название инфекций животных и человека, вызываемых несколькими видами бактерий рода *Brucella*: в основном, *Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*. Возбудителем бруцеллеза у КРС обычно является *Brucella abortus*, реже - *B. melitensis*, и еще реже - *B. suis*. *B. melitensis* считается основным возбудителем инфекции у овец и коз. У свиней данное заболевание чаще связано с заражением биоварами 1-3 *B. suis*, однако, заболевание, вызываемое биоваром 2, отличается по своему диапазону хозяев, ограниченностью распространения определенными географическими регионами и патогенности. В некоторых регионах резервуаром инфекции *B. suis* стали кабаны. С клинической точки зрения болезнь характеризуется одним или несколькими следующими признаками: аборт, задержка отделения плаценты, орхит, эпидидимит, и, изредка, артрит наряду с экскрецией организмов с выделениями из матки и с молоком. Постановка точного диагноза базируется на выделении бруцелл из абортированного материала, выделений из вымени или из тканей, удаленных при патологоанатомическом исследовании. *Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis* являются высоко патогенными микроорганизмами для человека, поэтому с потенциально контаминированными тканями, культурами и материалами следует работать в лабораториях, обеспечивающих соответствующий уровень биоазациты.

**Идентификация возбудителя:** Идентификацию *Brucella* проводят путем демонстрации *Brucella*-подобных микроорганизмов в абортированном материале или в вагинальных выделениях с помощью модифицированного метода кислотоустойчивого окрашивания; диагноз считается наиболее вероятным, особенно, в случае подтверждения серологическими тестами. Методы полимеразной цепной реакции позволяют обнаруживать ДНК *Brucella* в патологическом материале. По возможности, *Brucella* spp. нужно выделять путем культивирования образцов маточных выделений, абортированных плодов, выделений из вымени или отдельных тканей, таких как лимфатические узлы, репродуктивные органы самцов и самок. Виды и биовары устанавливают методами лизиса фагов, культивирования, а также биохимическими и серологическими методами. Полимеразная цепная реакция является дополнительным средством идентификации и типирования микроорганизма на основе специфичных последовательностей генома.

**Серологические тесты и тесты клеточного иммунитета:** Наиболее удобными тестами для скрининга стад и отдельных мелких жвачных, животных из семейства верблюдовых и бычьих (КРС и буйволов) являются: тесты с забуференным антигеном *Brucella* (роз-бенгал тест и пластинчатая реакция агглютинации с забуференным антигеном), реакция связывания комплемента, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Однако ни один из этих серологических тестов не подходит для всех видов животных или для всех эпизоотологических ситуаций, а некоторые из этих тестов не подходят для диагностики бруцеллеза у свиней, поэтому положительные результаты в скрининговых тестах необходимо подтверждать с использованием установленного подтверждающего или дополнительного метода. Непрямой ИФА или кольцевая проба для сборного молока являются эффективными методами скрининга и мониторинга молочного скота на бруцеллез. Кожная проба с бруцеллином подходит как для невакцинированных жвачных,

так и для свиней и может использоваться для скрининга или в качестве подтверждающего теста для стада, в тех случаях, когда некоторые животные в стаде оказываются положительными по результатам серологических тестов при отсутствии очевидных факторов риска.

**Требования к вакцинам и биологическим препаратам:** Штамм 19 *Brucella abortus* и штамм Rev.1 *B. melitensis* остаются эталонными вакцинами для борьбы с бруцеллезом у КРС и овец и коз, соответственно, с которыми сравнивают все остальные вакцины. Обе вакцины должны быть приготовлены из культур посевного материала, полученных из надлежащего источника. Вакцина на основе шероховатого штамма RB51 *B. abortus* также стала официальной вакциной для профилактики инфекции *B. abortus* у КРС в некоторых странах. Вакцин для контроля бруцеллеза у свиней не существует. Препараты бруцеллина не должны содержать липополисахаридов, характерных для штаммов гладких форм, а антигены для серологических тестов должны быть получены из гладких штаммов 1119-3 или 99 *B. abortus*, а в случае с непрямым ИФА – из гладкого штамма 16М *B. melitensis*. Вакцины и препараты бруцеллина должны соответствовать соответствующим стандартам

## А. ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез – это общее название инфекций животных и человека, вызываемых несколькими видами бактерий рода *Brucella*: в основном, *Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*. Инфекция овец бактерией *B. ovis* описана отдельно в Главе 2.7.8 Эпидидимит баранов.

**Возбудители:** Генетические и иммунологические данные свидетельствуют о том, что все члены семейства *Brucella* являются близкородственными. Тем не менее, основываясь на различиях в выборе хозяина и эпидемиологии, свойственных основным вариантам микроорганизма, а также на молекулярных данных о геномных вариациях, Подкомитет по таксономии *Brucella* Международного комитета по систематике прокариотов в 2005 году занял четкую позицию в отношении возврата к таксономической классификации *Brucella*, существовавшей до 1986 г. Данное заявление подразумевает повторное утверждение шести классических видов *Brucella* с их соответствующими биоварами. Наименования шести классических видов *Brucella* в установленном порядке опубликованы в Утвержденном списке названий бактерий (1980 г.), им соответствуют шесть типовых штаммов: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* и *B. canis*<sup>1</sup>. Первые три штамма по своим культуральным и серологическим свойствам разделены на биовары (см. Таблицы 2 и 3). В течение последнего десятилетия штаммы *Brucella* выделяли у морских животных, но данные штаммы невозможно отнести ни к одному из вышеописанных видов. Исследования по определению их правильного местоположения в таксономии рода продолжаются, и было предложено классифицировать их в два новых вида: *B. ceti* и *B. pinnipedialis* (Foster et al., 2007). Новый вид бактерии, названный *B. microti*, также выделили у обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*), а также у лис и в почве в Центральной Европе (Scholz et al., 2008). Кроме того, описаны новые изоляты, выделенные из имплантата молочной железы человека и при легочных инфекциях (штаммы BO1 и BO2), а также у самок павианов, родивших мертворожденное потомство, однако, естественный резервуар этих изолятов пока остается невыясненным. Хотя описано только два изолята нового типа, их официально включили как 10-ый и 11-ый вид *Brucella*: *B. inopinata* и *B. rapionis*, соответственно (Scholz et al., 2010; Whatmore et al., 2014). И наконец, штаммы, выделенные у грызунов, лис и лягушек, охарактеризовали как атипичные штаммы *Brucella*, отличающиеся от уже описанных видов. Они пока не утверждены как новые виды *Brucella*.

<sup>1</sup> <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>

*Brucella* является членом семейства *Brucellaceae*, отряд *Rhizobiales*, класс *Alphaproteobacteria*. Генетически бактерия является родственной некоторым патогенам растений и симбионтов рода *Agrobacterium* и *Rhizobium*, а также патогенам животных (*Bartonella*) и условно-патогенным или почвенным бактериям (*Ochrobactrum*).

## 1. Описание болезни

### 1.1. Бруцеллезная инфекция у КРС

Бруцеллез у КРС обычно вызывают биовары *Brucella abortus*. В некоторых странах, а именно в южной Европе, Африке и западной Азии, где КРС содержится в тесном соседстве с овцами или козами, возбудителем заболевания также может быть *B. melitensis* (Verger, 1985). Иногда *B. suis* может вызвать хроническую инфекцию вымени у КРС без абортирования или передачи другим животным. Бруцеллезная инфекция у КРС широко распространены по всему миру, но несколько стран в северной и центральной Европе, Канада, Япония, Австралия и Новая Зеландия считаются свободными от *B. abortus* и *B. melitensis*.

У молодых животных и небеременных особей женского пола болезнь обычно протекает бессимптомно. После заражения *Brucella abortus* или *B. melitensis* у взрослых беременных самок развивается плацентит, обычно приводящий к аборту в период между пятым и девятым месяцами беременности. Даже при отсутствии аборта высокие концентрации микроорганизма обнаруживают в плаценте, фетальной жидкости и вагинальных выделениях. Также может отмечаться поражение молочной железы и прилегающих лимфоузлов с проникновением возбудителя в молоко. Последующие беременности обычно доходят до нужного срока, но инфекции матки и молочных желез рецидивируют, при этом концентрация микроорганизма в плаценте и молоке снижается. При острых инфекциях возбудитель обнаруживают в большинстве крупных лимфоузлов. У взрослых особей мужского пола может развиваться орхит/эпидидимит. Бруцеллез может быть причиной бесплодия особей обоих полов. Гигромы, возникающие, как правило, в области суставов ног, являются довольно распространенным признаком бруцеллеза в некоторых тропических странах и могут быть единственным явным признаком болезни; бактерии *Brucella* часто обнаруживают в жидкости гигромы.

### 1.2. Бруцеллезная инфекция у овец и коз

Возбудителем бруцеллеза овец и коз (кроме инфекции *B. ovis*) является, как правило, один из трех биоваров *B. melitensis*. Время от времени встречаются случаи заражения овец и коз *B. abortus* и *B. suis*, однако, такие случаи чрезвычайно редки. Бруцеллезная инфекция овец и коз считается эндемичной в средиземноморском регионе, хотя заболевание широко распространено по всему миру. Северная Америка (кроме Мексики) считается свободной от бруцеллеза, как и северная и центральная Европа, юго-восточная Азия, Австралия и Новая Зеландия. По своим патологическим и эпидемиологическим характеристикам инфекция *B. melitensis* у овец и коз очень схожа с заболеванием, вызываемым *B. abortus* у КРС. В большинстве случаев первичным путем передачи *Brucella* становится плацента, фетальные жидкости и вагинальные выделения инфицированных овец и коз во время аборта или срочных родов. Выделение микроорганизма в среду также происходит с выделениями из вымени и со спермой; бактерии можно обнаружить в различных тканях, например, в лимфоузлах головы, в селезенке и органах, связанных с репродуктивной функцией (матка, придатки яичка и семенники), а также в пораженных артритом суставах.

### 1.2. Бруцеллезная инфекция у свиней

У свиней бруцеллез обычно связан с заражением биоварами 1, 2 или 3 *B. suis*. Время от времени встречаются случаи заражения овец и коз *B. abortus* и *B.*

*melitensis*, однако, такие случаи чрезвычайно редки. Превалентность инфекции, как правило, достаточно низкая, хотя в таких регионах, как Южная Америка и Юго-Восточная Азия, распространенность болезни может быть намного выше. В некоторых странах бруцеллез свиней может быть серьезной, но пока неосознанной проблемой. Инфекцию биоваром 1 *Brucella suis* обнаруживали у диких свиней в южных штатах США и в штате Квинсленд (Австралия), а также в некоторых других странах Океании. В этих странах также регистрировали случаи заражения бруцеллезом у людей, охотящихся и обрабатывающих продукты от диких свиней. Болезнь обычно передается через поедание корма, контаминированного продуктами опороса или аборта или маточными выделениями. Свиньи с готовностью поедают абортированные плоды и плаценты. Заражение также часто происходит во время спаривания, и обнаружение *B. suis* в сперме следует принимать во внимание во время искусственного осеменения. После транзитной бактериемии у свиней, также как и у жвачных, бактерии *B. suis* колонизируют клетки репродуктивного тракта особей обоего пола: у свиноматок – плаценту и плоды, у хряков поражения возникают в одном или более из следующих органов: семенники, предстательная железа, придатки яичек, семенные пузырьки или бульбоуретральные железы. У хряков поражения, которые часто бывают двусторонними, начинаются с гиперплазии, иногда прогрессирующей до образования абсцесса; конечная стадия протекает в виде склероза и атрофии. Артрит может возникать в разных суставах; иногда наблюдается развитие спондилита. Аборты – самое частое проявление бруцеллеза у свиноматок – могут происходить на любом сроке супоросности, чаще всего в период с 50 по 110 день. Вагинальные выделения не столь очевидный признак, и в хронически инфицированном стаде самым важным клиническим признаком болезни становится infertility, а не аборты. У хряков болезнь часто приобретает персистирующий характер, при котором поражение репродуктивных органов приводит к временному или постоянному нарушению половой активности. Бактерии *Brucella* могут присутствовать в сперме хряка при отсутствии явного поражения репродуктивных органов или отклонений в половой деятельности. У животных обоих полов могут наблюдаться отек суставов и сухожильных влагалищ, хромота и, иногда, паралич задних конечностей. У большинства особей мужского и женского пола болезнь пройдет в течение 6 месяцев, однако, у многих животных она приобретет форму хронической инфекции (Olsen et al., 2012).

По выбору хозяев, распространению и степени патогенности инфекция, вызываемая биоваром 2 *B. suis*, отличается от инфекции, вызываемой биоварами 1 и 3. Исторически, областью распространения биовара 2 *B. suis* был огромный регион между Скандинавией и Балканами (EFSA, 2009). Во время вспышек бруцеллеза в Европе источником заражения сероваром 2 свиней на свободно-выгульном содержании, вероятно, были дикие кабаны, которые считаются основным резервуаром инфекции в дикой природе (EFSA, 2009). Биовар 2 *Brucella suis* вызывает миллиарные поражения, особенно, в тканях репродуктивных органов, в которых часто наблюдается нагноение. До настоящего времени случаи бруцеллеза у человека редко связывали с биоваром 2. Однако случаи заражения биоваром 2 регистрировали у охотников с пониженным иммунитетом, которые во время свежевания и потрошения туш кабанов и зайцев подвергаются воздействию вируса. Кроме того, сообщалось о редких случаях бессимптомной инфекции сероваром 2 *B. suis* у овец и коз, контактировавших с инфицированными дикими кабанами.

#### **1.4. Инфекция *Brucella* у других домашних животных, диких животных, содержащихся в неволе, или у диких животных**

Бруцеллез был так же описан у одногорбых верблюдов (*Camelus dromedaries*) и у двугорбых верблюдов (*C. bactrianus*), у верблюдовых Южной Америки: лам

(*Lama glama*), альпак (*Lama pacos*), гуанако (*Lama guanicoe*) и викуний (*Vicugna vicugna*) в связи с контактом с мелкими и крупными жвачными, зараженными *B. abortus* или *B. melitensis*.

Кроме того, бруцеллез наблюдался у домашних буйволов (*Bubalus bubalus*), американских и европейских бизонов (*Bison bison* и *Bison bonasus*, соответственно), яков (*Bos grunniens*), лосей/вапити (*Cervus elaphus*), у африканских буйволов (*Syncerus caffer*) и различных видов африканских антилоп. Клинические проявления бруцеллеза у этих животных схожи с таковыми у КРС.

Инфекция *Brucella melitensis* у диких жвачных возникает в результате тесного контакта этих животных с овцами и козами в энзоотических регионах. Клинические признаки бруцеллеза у этих животных схожи с таковыми у КРС или у овец и коз. Однако у некоторых видов диких жвачных (например, у серн [*Rupicapra rupicapra*], горных альпийских козлов [*Capra ibex*] и иберийских диких козлов [*Capra pyrenaica*]) наблюдался гнойный или кальцифицирующий артрит и орхит, а также увеит и неврологические нарушения. Эти виды считаются конечными носителями, болезнь у которых обычно исчезает сама собой после искоренения инфекции среди домашнего скота, кроме тех случаев, когда вспышка возникла в результате воздействия антропогенных факторов.

Развитие эпизоотологической ситуации с инфекцией *B. suis* у других видов животных кроме свиней протекает по двум разным сценариям. В первом случае заражение *B. suis* возникает у животных, которые не являются естественными хозяевами данной инфекции вследствие поедания контаминированных материалов или совместного обитания с естественными хозяевами. Например, обыкновенные песцы и мелвильские островные волки могут заразиться сероваром 4 *B. suis* от северных оленей; собаки и такие грызуны, как крысы и мыши, приобретают *B. suis* при совместном обитании с естественными хозяевами; КРС и лошади заражаются при совместном содержании или взаимодействии с инфицированными свиньями. Возбудителем инфекции в этом случае становятся, без сомнения, четко определенные биовары, циркулирующие у естественных хозяев. В качестве примера можно привести так называемый бруцеллез мышей в Содружестве независимых государств (СНГ) и в странах Балтии, в которых мелкие грызуны заражены биоваром 5 *B. suis*. Другую ситуацию описывали в Австралии, где штаммы, выделенные у грызунов, были похожи на *B. suis*, но имели другие характеристики; в конце концов, их признали генетически не родственными *B. suis*.

Кроме диких кабанов, резервуаром серовара 2 *B. suis* и возможным источником передачи бактерии домашнему скоту также считается заяц-русак (*Lepus europaeus*). Болезнь у зайца-русака характеризуется образованием узелков размером с зернышко пшена или вишню или больше, при этом самые крупные узелки заполнены гнойным содержимым. Такие узелки могут возникать практически в любом месте, иногда под кожей или внутри мышечной ткани, в селезенке, печени или легких и в репродуктивных органах животных обоего пола. Как ни удивительно, но внешне животное может выглядеть совершенно здоровым. В результате совместного обитания с инфицированными свиньями, дикими кабанам или зайцами серовар 2 *B. suis* может проникать в популяции и других видов животных. Передача микроорганизма домашнему скоту может происходить при потрошении или свеживании диких кабанов в коровниках.

Биовар 4 *B. suis* вызывает опасное зоонозное заболевание у дикого или одомашненного северного оленя или карibu (*Rangifer tarandus* и его подвиды) по всему арктическому региону, включая Сибирь, Канаду и Аляску. *Rangifer tarandus* чрезвычайно восприимчив к инфекции *B. suis*, проявляющейся лихорадкой, угнетенным состоянием и различными местными признаками: абортами,

задержкой отделения плаценты, метритом, иногда с кровянистыми выделениями, маститом, бурситом и орхитом. Передача инфекции человеку происходит через прямой контакт или потребление сырого молока и других термически необработанных продуктов из северного оленя, особенно, костного мозга.

### 1.5. Зоонозный риск и требования к биобезопасности

Бруцеллез передается человеку, вызывая острое фебрильное заболевание – мальтийскую лихорадку – которое может перейти в хроническую форму и привести к серьезным осложнениям, поражающим скелетно-мышечную, сердечно-сосудистую и центральную нервную системы. Необходимо принимать меры предосторожности для предотвращения заражения человека. Заражение обычно происходит при работе с микроорганизмами и передается, в основном, оральным, воздушно-капельным или конъюнктивальными способами, однако, в тех регионах, где болезнь является эндемичной, наибольший риск для населения представляет потребление молочных продуктов. Существует также определенный риск для ветеринаров, работников боен и фермеров, которые соприкасаются с зараженными животными/тушами и абортрованными плодами или плацентами. Бруцеллез также считается одной из самых легко приобретаемых лабораторных инфекций, поэтому все лабораторные манипуляции с живыми культурами или потенциально инфицированным/контаминированным материалом следует осуществлять в лабораториях, обеспечивающих надлежащий уровень биобезопасности и биозащиты, определенный по результатам анализа биорисков (см. Главу 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Руководство по управлению биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии). Для работы с материалами, инфицированными *Brucella*, разработаны специальные рекомендации по мерам обеспечения биобезопасности (дополнительную информацию см. у Alton et al., 1988; Совместный экспертный комитет по бруцеллезу ФАО/МЭБ, 1986; ВОЗ, 1953; ВОЗ, 2004; Глава 1.1.3 Транспортировка образцов животного происхождения).

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

**Таблица 1. Методы исследования для диагностики инфекции *B. abortus*, *melitensis* или *suis***

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельного животного <sup>a</sup>	Содействие политике искоренения <sup>b</sup>	Подтверждение подозрения на инфекцию или клинических случаев <sup>c</sup>	Превалентность инфекции в стаде – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя</b>						
Методы с использованием окрашивания	-	-	-	+	-	н/п
Культивирование	-	-	-	+++	-	н/п
ПЦР	-	-	-	+/+++	-	н/п

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельного животного <sup>a</sup>	Содействие политике искоренения <sup>b</sup>	Подтверждение подозрения на инфекцию или клинических случаев <sup>c</sup>	Превалентность инфекции в стаде – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
<b>Определение иммунного ответа</b>						
<b>ВВАТ (RBT или ВРАТ)</b>	+++	++	+++	+	+++	н/п
<b>FPA</b>	++	++	+	++	++	н/п
<b>CFT</b>	++	++	+++	++	+++	н/п
<b>нИФА</b>	+++	++	+++	++	+++	н/п
<b>кИФА</b>	++	+	+	+	++	н/п
<b>BST</b>	++	-	+	+++	++	н/п
<b>SAT</b>	++	+	+	-	+	н/п
<b>Тесты на основе НГ и цитозоли<sup>e</sup></b>	-	-	+	++	-	н/п
<b>Тесты в сборном молоке<sup>f</sup></b> <b>нИФА в молоке или кольцевая реакция с молоком</b>	+++	-	+++	+	+++	н/п

Примечания: +++ = рекомендованный метод; ++ = подходящий метод; + = применение данного метода возможно в определенных обстоятельствах, хотя стоимость, надежность и другие факторы существенно ограничивают возможность его применения; - = метод не подходит для данной цели; н/п = не применимо. ПЦР = полимеразная цепная реакция; ВВАТ = тест с забуференным антигеном *Brucella* (то есть RBT [розбенгал тест] и ВРАТ [пластинчатая реакция агглютинации с забуференным антигеном]); FPA = поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; CFT = реакция связывания комплемента; нИФА или кИФА = непрямой или конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ; BST = кожная проба с бруцеллином; SAT = реакция сывороточной агглютинации; НГ = нативный гаптен

<sup>a</sup> Относится только к стадам, странам или зонам, свободным от бруцеллезной инфекции.

<sup>b</sup> Для повышения эффективности программ эрадикации в инфицированных стадах рекомендуется проводить тесты параллельно с целью повышения их диагностической чувствительности, а именно: проводить не менее двух серологических тестов, например, ВВАТ или FPA и CFT или нИФА. Дополнительное повышение чувствительности возможно за счет одновременного проведения серологического теста и BST.

<sup>c</sup> В регионах с низкой превалентностью инфекции или при ее почти полном отсутствии прогностическая ценность положительных результатов серологических тестов может быть очень низкой. В таких ситуациях для подтверждения клинических случаев необходимо проведение идентификации агента.

*В инфицированных стадах положительный результат любого серологического теста считается подтверждением клинического диагноза.*

В инфицированных стадах положительный результат любого серологического теста считается подтверждением клинического диагноза. Животное с положительным результатом любого серологического теста считается инфицированным даже при отсутствии у него клинических признаков.

В регионах с низкой превалентностью инфекции или при ее почти полном отсутствии положительные результаты серологических тестов у отдельных животных следует подтверждать методами культивирования (или ПЦР) или BST.

В странах или зонах, свободных от инфекции, подозрение на бруцеллез у отдельных животных возникает после получения положительного результата в скрининговом тесте и в подтверждающем серологическом тесте (серии тестов) и требует подтверждения методами культивирования (или ПЦР) и/или BST.

<sup>d</sup> Возможно получение ложноположительных результатов.

<sup>e</sup> В регионах, в которых практикуется иммунизация вакциной S19 или Rev.1 подкожно, этот тест может помочь дифференцировать антитела, индуцированные вакциной, от антител, возникших в результате заражения.

<sup>f</sup> Только для молочного КРС.

Все случаи абортирования и орхита у КРС, овец и коз и свиней следует рассматривать как подозрение на бруцеллез, что влечет за собой изучение истории стада и забор образцов для проведения лабораторных исследований. Клиническая картина не является патогномоничной, поэтому окончательный диагноз «бруцеллез» может быть поставлен только по результатам выделения и идентификации бруцелл, однако, в ситуациях, в которых бактериологические методы исследования не применимы, постановка диагноза может быть основана на молекулярных или иммунологических методах.

## 1. Идентификация возбудителя

Не существует единого метода, с помощью которого бактерию можно распознать как *Brucella* с высоким уровнем достоверности. Таким образом, для достоверной идентификации агента необходимо одновременное изучение ростовых характеристик, применение серологических и бактериологических или молекулярных методов (Alton et al., 1988; Совместный экспертный комитет FAO/МЭБ по бруцеллезу, 1986).

Все образцы, отобранные в случае подозрения на бруцеллез, немедленно охлаждают после забора и как можно быстрее транспортируют в лабораторию. Если время в пути составляет более 12 часов, все образцы кроме вагинальных смывов следует заморозить. По прибытии в лабораторию образцы, сразу не отправленные на посев, замораживают (Alton et al., 1988). В любом случае, чем короче время доставки и хранения, тем выше вероятность выделения бруцелл, тем более что первоначальное количество бруцелл в образце может быть достаточно низким. Ни одна из транспортных сред не может повысить выживаемость бруцелл в образцах патологического материала животных.

### 1.1. Методы с использованием окрашивания

Микроорганизмы *Brucella* являются кокобациллами или короткими палочками длиной от 0,6 до 1,5 мкм и шириной от 0,5 до 0,7 мкм. Они обычно размещаются по одной, реже парами или маленькими группами. Морфология бруцелл постоянна, за исключением старых культур, в которых могут встречаться плеоморфные формы. Бруцеллы неподвижны. Они не образуют спор, и не продуцируют жгутиков, пили, или настоящих капсул. *Brucella* являются грамтрицательными бактериями и обычно не дают биполярного окрашивания. Они резистентны к обесцвечиванию слабыми кислотами и, таким образом, окрашиваются в красный цвет по методу Циля-Нильсена в модификации Стампа (Alton et al., 1988). Это обычная процедура для исследования мазков органов или биологических жидкостей, предварительно зафиксированных нагреванием или этанолом, в ходе которой микроорганизмы окрашиваются в красный цвет на синем фоне. Так же можно использовать метод с использованием антител, меченных флуорохромом или пероксидазой. Присутствие внутри клеток устойчивых к слабым кислотам организмов с морфологией *Brucella* или микроорганизмов, специфически окрашенных методами иммуноокрашивания, позволяет поставить предварительный диагноз «бруцеллез». Однако эти методы не подходят или обладают низкой чувствительностью в молоке и молочных продуктах, в которых бруцеллы часто присутствуют в небольших количествах, а интерпретация результатов часто затруднена из-за наличия жировых шариков. С

осторожностью так же следует подходить и к интерпретации положительных результатов окрашивания по Стампу, поскольку в этих препаратах сложно отличить бруцеллы от других микроорганизмов, вызывающих аборт, например, *Chlamydophila abortus* или *Coxiella burnetti*. Результаты, положительные или отрицательные, необходимо подтверждать культивированием.

Для демонстрации возбудителя в различных биологических пробах можно так же применять методы с использованием прямых ДНК зондов или полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Bricker, 2002; Whatmore & Gopaul, 2011), хотя на данный момент чувствительность и специфичность этих подходов остается низкой в сравнении с классическими бактериологическими методами. Тем не менее, некоторые из этих молекулярных методов помогают провести идентификацию и типирование изолятов *Brucella* (см. Раздел В.1.4).

## **1.2. Забор образцов и культивирование**

Выделение бактерий всегда требует много времени, затрат и усилий, тем не менее, эта процедура необходима для подтверждения болезни и для определения вида/биоваров бруцелл. Хотя этот метод часто считают не достаточно чувствительным, он может быть очень эффективным при условии правильного подбора вида и количества образцов, их хранения, объема посевного материала и культуральной среды.

### **1.2.1. Базальные среды**

Прямое выделение и культивирование бруцелл обычно проводят на твердой среде. В целом, это наиболее удовлетворительный метод, позволяющий выделять и четко распознавать развивающиеся колонии. Такие среды так же ограничивают образование негладких мутантов и чрезмерный рост контаминирующих агентов. Однако для объемных проб или в целях обогащения рекомендуется использовать жидкие среды. Существует большое количество коммерческих дегидратированных базальных сред, например, основа для среды *Brucella*, триптозо- (или триптиказо)-соевый агар (ТСА). Добавление 2-5% лошадиной сыворотки или сыворотки КРС необходимо для роста таких штаммов, как *Brucella abortus* биовар 2, поэтому многие лаборатории всегда добавляют сыворотку в такие базальные среды, как кровяная агаровая основа или колумбийский агар, и получают отличные результаты. Возможно применение других подходящих сред, таких как сывороточно-декстрозный агар (СДА) или глицериново-декстрозный агар (Alton et al., 1988). СДА предпочтительнее использовать для наблюдения морфологии колоний. Для выделения бруцелл из крови и других жидкостей организма или из молока, когда обычно рекомендуют использовать обогащенные среды, можно применять неселективную двухфазную среду, известную как среда Кастанеды. Среда Кастанеды подходит для выделения ввиду того, что бактерии *Brucella* имеют тенденцию к распаду в бульонной среде, что препятствует биотипированию традиционными бактериологическими методами.

### **1.2.2. Селективные среды**

Все указанные выше базальные среды можно использовать для приготовления селективных сред. Для подавления роста других микроорганизмов кроме бруцелл добавляют соответствующие антибиотики.

Наиболее широко используемой селективной средой является модифицированная среда Фаррелла (Stack et al., 2002), которую добавляют к 1 л агара: полимиксина В сульфат (5000 ед. = 5 мг);

бацитрацин (25 000 ед. = 25 мг); натамицин (50 мг); налидиксовая кислота (5 мг); нистатин (100 000 ед.); ванкомицин (20 мг). Соответствующая лиофилизированная добавка с антибиотиками имеется в продаже. Однако, налидиксовая кислота и бацитрацин в концентрации, используемой в среде Фаррелла, могут оказывать ингибирующее действие на некоторые штаммы *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*, поэтому стратегией выбора для первичной изоляции бруцелл из полевого патологического материала считается одновременное использование среды Фаррелла и менее селективной модифицированной среды Тайера-Мартина. Однако модифицированная среда Тайера-Мартина не прозрачна из-за гемоглобина, который входит в ее состав как базальный компонент, поэтому она не подходит для прямого наблюдения морфологии колоний - вероятно, самого удобного способа предварительной идентификации бруцелл (Alton et al., 1988). Недавно удалось составить новую селективную и прозрачную культуральную среду (СГА) (de Miguel et al., 2011). Для ее приготовления в качестве базального компонента используют кровяной агар с добавлением 5% стерильной телячьей сыворотки и ванкомицина (20 мг/л), метансульфоната колистина (7,5 мг/л), нитрофурантоина (10 мг/л), нистатина (100000 международных единиц [МЕ]/л) и амфотерицина В (4 мг/л). Эту смесь антибиотиков готовят следующим образом: навешивают ванкомицин, колистин и нистатин в стерильный флакон объемом 50 мл, затем растворяют смесь в 10 мл раствора абсолютного метанола и стерильной очищенной воды (1:1). Нитрофуран навешивают в стерильную пробирку и растворяют в 1 мл 0,1 моль раствора NaOH (предварительно стерилизованного фильтрацией через фильтр с шириной пор 0,22 мкм). Наконец, переносят 10 мг амфотерицина В в стерильный флакон объемом 20 мл и растворяют его в 1 мл диметилсульфоксида. После полного растворения (через 5-10 минут) добавляют 9 мл 10 ммоль стерильного фосфатно-буферного раствора (ФБР) (рН=7,2 ± 0,2). Конечная концентрация амфотерицина В составит 1 мг/мл; для 1 литра среды потребуются 4 мл этого раствора. Оставшуюся суспензию амфотерицина В можно хранить при 5°C ± 3°C несколько дней. Новая среда СГА подавляет рост большинства контаминирующих микроорганизмов, но, в то же время, позволяет расти бруцеллам всех видов, и отличается более высокой чувствительностью, чем модифицированная среда Тайера-Мартина или среда Фаррелла для выделения всех гладких видов бруцелл из полевых образцов, поэтому среда СГА может считаться селективной средой выбора для выделения бруцелл, хотя максимальной диагностической чувствительности можно достичь с использованием среды Фаррелла и среды СГА одновременно (de Miguel et al., 2001).

В отличие от ситуации с несколькими биоварами *B. abortus* или *B. ovis* для роста *B. melitensis* или *B. suis* не требуется атмосфера инкубации, содержащая 5-10% CO<sub>2</sub> (Таблица 2), хотя такая обогащенная CO<sub>2</sub> атмосфера считается оптимальной для культивирования всех видов бруцелл.

Поскольку количество организмов *Brucella*, вероятно, будет ниже в молоке, молозиве и некоторых пробах ткани, чем в абортированном материале, рекомендуется обогащение проб. В случае с молоком надежность результатов можно также повысить центрифугированием и культивированием микроорганизма из сливок и осадка после центрифугирования, однако, необходимо принимать меры предосторожности, чтобы не допустить образования аэрозолей.

Повышения чувствительности культивирования молока без рисков, связанных с центрифугированием, можно достичь за счет увеличения количества культуральных планшетов со средами Фаррелла и СИТА на каждый исследуемый образец молока (минимум по два планшета на каждый образец из одной четверти вымени), при этом в каждый планшет вносят примерно по 0,5 мл молока. Обогащения также можно добиться и в жидкой среде, содержащей сывороточно-декстрозный бульон, триптозо-(или триптиказо)-соевый бульон или бульон для *Brucella* с добавлением смеси антибиотиков, содержащей, как минимум, амфотерицин В (1 мкг/мл), и ванкомицин (20 мкг/мл) (оба в конечных концентрациях). Обогащенную среду инкубируют при 37°C на воздухе с добавлением 5-10% (об/об) CO<sub>2</sub> в течение периода до 6 недель, с еженедельным пересевом на твердые селективные среды Фаррелла и СИТА. По желанию можно использовать двухфазную систему твердой и жидкой селективной среды в одной и той же емкости (метод Кастанеды) для сведения к минимуму количества пересевов. Селективная двухфазная среда, состоящая из базальной среды Кастанеды с добавлением следующих антибиотиков к жидкой фазе, иногда рекомендуется для выделения *Brucella* в молоке (количество приводится на литр среды): полимиксин В (сульфат) (6000 ед. = 5 мг); бацитрацин (25 000 ед. = 25 мг); натамицин (50 мг); налидиксовая кислота (5 мг); амфотерицин В (1 мг); ванкомицин (29 мг); D-циклосерин (100 мг).

Все культуральные среды должны пройти контроль качества с эталонными штаммами для подтверждения эффекта. Лучше использовать прихотливый штамм, например, биовар 2 *B. abortus*, *B. ovis* или биовар 2 *B. suis* в небольшом объеме.

На подходящей твердой среде колонии *Brucella* становятся четко видимыми через 2-3 дня инкубирования. После 4 дней инкубирования колонии *Brucella* становятся круглыми, 1-2 мм в диаметре, с гладкими краями. При просматривании при дневном свете через прозрачную среду они прозрачны и имеют бледно-медовый цвет. При осмотре сверху колонии кажутся выпуклыми и жемчужно-белыми. Позднее колонии становятся крупнее и немного темнее. Гладкие (S) колонии *Brucella* могут изменяться во время роста, особенно после многократных пересевов, и к распаду до шероховатых (R) форм. Шероховатые формы гораздо менее прозрачны, имеют более гранулированную, матовую поверхность, цвет варьирует от матового белого до коричневого в отраженном или проходящем свете. Проверка на диссоциацию легко осуществляется с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым: шероховатые колонии окрашиваются в красный/фиолетовый, а гладкие колонии не впитывают краситель или окрашиваются в бледно-желтый цвет. Если колонии гладкие, то их нужно проверить с использованием антисыворотки против гладких штаммов бруцелл или с использованием моноспецифических сывороток против антигена А или М, если таковые имеются в наличии. В случае с негладкими колониями изоляты проверяют против антисыворотки к антигену R *Brucella*. Изменения в морфологии колоний, как правило, связаны с изменением вирулентности, серологических свойств и/или чувствительности к фагам. Типичная морфология колоний и положительная агглютинация со специфичной противобруцеллезной антисывороткой с последующей пробой на оксидазу и уреазу (см. Таблицы 2 и 3) позволяет предварительно идентифицировать изолят как бактерию *Brucella*. Однако рекомендуется

также провести подтверждающие исследования и типирование в референтной лаборатории.

### **1.2.3. Забор образцов и культивирование**

Выбор образцов для целей диагностики бруцеллеза животных методом культивирования обычно зависит от наблюдаемых клинических признаков. К наиболее ценным с точки зрения диагностики пробам относятся вагинальные секреты (смывы), абортированные плоды (содержимое желудка, селезенка и легкие), плодные оболочки и молоко, сперма и жидкость при артрите или гигроме. Из туш животных предпочтительными тканями для культивирования являются ткани ретикулоэндотелиальной системы (т.е. лимфоузлы головы, лимфоузлы молочной и половых желез и селезенка), беременная матка или матка сразу после родов и вымя. Рост обычно наблюдается через 3-4 дня, но культуры не стоит отбраковывать как отрицательные до истечения 8-10 дней.

#### **1.2.3.1 Ткани**

Образцы тканей отбирают в асептических условиях стерильными инструментами. Из образцов тканей удаляют лишний материал (например, жир), нарезают на мелкие кусочки и мацерируют с использованием гомогенизатора «Stomacher» или измельчителя тканей с добавлением небольшого количества стерильного фосфатно-буферного раствора (ФБР) до посева на твердую среду.

#### **1.2.3.2. Вагинальные выделения**

Вагинальные смывы, взятые после аборта или родов, являются великолепным источником для выделения бруцелл и представляют собой меньший риск для персонала по сравнению с абортированными материалами. Смывы высевают штрихом на твердую среду.

#### **1.2.3.3. Молоко**

Пробы молока отбирают сразу после мытья и высушивания всего вымени и дезинфекции сосков. Необходимо, чтобы пробы содержали молоко из всех долей, поэтому из каждого соска нужно взять 10-20 мл молока, меняя или дезинфицируя перчатки после каждого животного, чтобы не допустить перекрестной контаминации образцов. Первые струйки сливают, а пробу отбирают непосредственно в стерильный сосуд или флакон. Следует соблюдать осторожность, чтобы избежать контакта молока с руками доярки. Молоко центрифугируют, а сливки и осадок наносят на твердую селективную среду, по отдельности или в смеси, или проводят посев штрихом, как указано выше. Если возбудители бруцеллеза присутствуют в образцах сборного молока, их число обычно очень мало, и выделение микроорганизма из таких проб очень маловероятно.

#### **1.2.3.4. Молочные продукты**

Молочные продукты, такие как сыры, следует культивировать в средах, описанных выше. Поскольку в таких материалах, вероятно, содержится небольшое количество микроорганизмов, рекомендуется использовать обогащенную культуру. Перед культивированием образцы осторожно гомогенизируют после измельчения в измельчителе тканей или мацерации и растирают в «Stomacher» или в электрическом блендере с добавлением соответствующего объема

(без излишнего разведения) стерильного ФБР. Культивируют поверхностные слои (корку и лежащие ниже части), а также центральную часть продукта. По мере роста, выживания или достаточно быстрого исчезновения бруцелл, их распределение по разным частям продукта меняется в зависимости от местных физико-химических условий, обусловленных спецификой технологического процесса.

#### **1.2.3.5. Синовиальная жидкость артритных суставов/жидкость из гигромы – содержимое абсцесса**

Такие образцы собирают в асептических условиях и наносят непосредственно на твердые селективные среды.

Все пробы охлаждают (до 4°C-10°C) сразу после забора и как можно скорее доставляют в лабораторию. При невозможности быстрой доставки в лабораторию пробы замораживают, чтобы не допустить снижения жизнеспособности бактерий. По прибытии в лабораторию молоко и ткани и другие биологические жидкости замораживают, если они не подлежат немедленному культивированию.

Лабораторных животных следует использовать только в случае крайней необходимости, когда это является единственным способом обнаружения присутствия бруцелл, например, в случаях сильной контаминации проб или низкой концентрации микроорганизмов. Заражение животных проводят внутривенно или внутрибрюшинно у мышей или внутримышечно, подкожно или внутрибрюшинно у морских свинок. Эта работа должна проводиться в соответствующих условиях биобезопасности, описанных в Главе 1.1.4. Селезенки зараженных животных культивируют через 7 дней (мыши) или 3-6 недель (морские свинки) после заражения. Пробы сыворотки морских свинок забирают методом пункции сердца перед забоем и исследуют в реакции с забуференным антигеном *Brucella* (ВВАТ), при этом положительный результат данного теста свидетельствует о высокой вероятности наличия бруцеллеза (Alton et al., 1988).

### **1.3. Идентификация и типирование**

При обнаружении колоний с морфологией, характерной для бруцелл, исследуют мазки окрашенной по Граму агаровой культуры с колониями. Поскольку серологические свойства, красители и чувствительность к фагам обычно изменены в негладких фазах, в тестах по типированию, описанных выше, следует обратить особое внимание на морфологию колоний. Рекомендованными методами для наблюдения морфологии колоний являются метод Henry при помощи непрямо отраженного света, акрифлавиновый тест, описанный Braun и Bonestell, или метод окрашивания колоний кристаллическим фиолетовым, описанный White и Wilson (Alton et al., 1988).

Идентификацию микроорганизмов *Brucella* проводят с помощью комбинации следующих тестов: оценка морфологии микроорганизма после окрашивания по Граму или Стампу, непосредственное наблюдение морфологии колоний, оценка характеристик роста, тесты на уреазу и оксидазу и реакция пластинчатой агглютинации с поликлональной противобруцеллезной сывороткой. Идентификация биоваров и видов требует тщательно разработанных тестов (таких как лизис фагов и агглютинация с моноспецифическими сыворотками против антигенов А, М или R), выполнением которых занимаются референтные лаборатории, имеющие соответствующую аккредитацию. Одновременное использование нескольких фагов, например Тбилиси (Тб), Уэйбридж (Уб),

Изатнагар (Из) и R/C создает такую систему типирования фагов, которая в опытных руках позволяет осуществлять практическую идентификацию видов *Brucella*. Тем не менее, ряд характеристик, например, необходимость в обогащении атмосферы углекислым газом для роста бактерий, продукция H<sub>2</sub>S (обнаруживаемого бумагой с ацетатом свинца), рост в присутствии основного фуксина и тионина определяют обычными тестами, которые можно провести в хорошо оборудованных неспециализированных лабораториях (см. Таблицы 2 и 3).

Для поддержания штаммов *B. abortus*, *B. melitensis* или *B. suis*, а также для отправки их в референтные лаборатории с целью типирования, необходимо отбирать только гладкие колонии. Культуры можно поддерживать в течение небольшого периода времени при температуре 5°C ± 3°C, но для хранения в течение более длительного времени их необходимо лиофилизировать или хранить в пробирке с закручивающейся крышкой при температуре не выше -16°C в триптозном бульоне с 15% (в объемном соотношении) глицерином. Для транспортировки культуры лиофилизируют и запечатывают в ампулы, упакованные в ёмкости с закручивающейся крышкой, или пересевают на подходящие питательные скошенные агары, помещенные во флаконы с завинчивающейся крышкой. Штаммы так же можно перевозить растворенными в среде для транспортировки (например, Amies), однако, это может привести к диссоциации.

Согласно требованиям Ассоциации международных воздушных перевозок (ИАТА) для транспортировки опасных грузов (ИАТА, 2013) при транспортировке культур бруцелл крышки флаконов или емкостей должны быть плотно закручены и опечатаны пленкой ПВХ; флаконы должны быть обернуты в фильтровальную бумагу или вату, запечатаны в полиэтиленовые пакеты и упакованы в жесткий контейнер (тройная упаковка). Эти регламенты приведены в Главе 1.1.2. Сбор, представление и хранение диагностических образцов и в Главе 1.1.3. Транспортировка образцов животного происхождения и подлежат обязательному исполнению.

#### 1.4. Методы распознавания нуклеиновой кислоты

ПЦР, включая формат в реальном времени, дает дополнительные возможности для обнаружения и идентификации видов *Brucella*. (Bricker, 2002; Lopez-Goñi et al., 2011; Ocampo-Sosa et al., 2005; Whatmore & Gopaul, 2011). Несмотря на высокую степень гомологии ДНК внутри рода *Brucella*, разработаны несколько молекулярных методов, включая ПЦР, ПЦР с определением полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP) и сазерн-блоттинг, с целью дифференциации (до определенной степени) видов бруцелл и некоторых из биоваров (обзор см. Bricker, 2002; Moreno et al., 2002; Whatmore & Gopaul, 2011). Для дифференциации некоторых видов *Brucella* разработан метод гель-электрофореза в пульсирующем поле. ПЦР подходит для идентификации видов бруцелл и вакцинных штаммов, однако, для прямой диагностики валидировано пока мало методов ПЦР.

Первый видоспецифический метод мультиплексной ПЦР для дифференциации *Brucella* был описан Bricker и Halling. Анализ, названный AMOS-ПЦР, основан на полиморфизме, вытекающем из видоспецифической локализации последовательности вставки IS711 в хромосоме *Brucella*, и включает пять олигонуклеотидных праймеров, которые могут идентифицировать без дифференцирования биовары 1, 2 и 4 *B. abortus*, но не могут идентифицировать биовары 3, 4, 6 и 9 *B. abortus*. Со временем появились модификации этого метода, позволившие улучшить его эффективность, а также были включены дополнительные штамм-специфические праймеры для идентификации вакцинных штаммов *B. abortus* и других биоваров и видов (Ocampo-Sosa et al., 2005). Для

быстрой и простой одноэтапной идентификации *Brucella* предложен новый метод мультиплексной ПЦР (*Bruce-ladder*). Основным преимуществом данного метода перед ранее описанными методами ПЦР является то, что он позволяет за один этап идентифицировать и дифференцировать большинство видов бруцелл, а также вакцинные штаммы S19 *B. abortus*, RB51 *B. abortus* и Rev. 1 *B. melitensis*. В отличие от других ПЦР метод *Bruce-ladder* способен обнаруживать также ДНК *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* и *B. ceti*. Кроме того, с помощью этой новой мультиплексной ПЦР можно идентифицировать эталонные биовары 3, 5, 6, 7, 9 *B. abortus* и биовары 2, 3, 4, 5 *B. suis*. Представлен обновленный протокол оригинального метода ПЦР *Bruce-ladder*. Новая версия (*Bruce-ladder*, v2.0) позволяет дифференцировать *B. microti*. Кроме того, новый метод мультиплексной ПЦР (*Suis-ladder*) для быстрой и точной идентификации штаммов *B. suis* на уровне биовара (Lopez-Goñi et al., 2011).

Другой продвинутой метод мультиплексной ПЦР также способен дифференцировать *B. suis* и *B. canis*, а также *B. suis* и *B. microti* всего за один этап, и вакцинные штаммы S19 *B. abortus*, RB51 *B. abortus* и Rev.1 *B. melitensis* (Kang et al., 2011). Данный метод также позволяет дифференцировать два вида бруцелл у морских животных, но требует дополнительной валидации на полевых штаммах.

Существуют также другие тесты, например, ПЦР-ПДФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) *omp25*, 2a и 2b, которые можно использовать для идентификации некоторых видов *Brucella*.

Недавно были описаны альтернативные подходы к идентификации всех видов *Brucella*, биоваров *B. suis* и вакцинных штаммов на основании дифференциации единичного нуклеотидного полиморфизма (SNP) путем удлинения праймеров или методом ПЦР или в лигазной цепной реакции. Такие быстрые, простые и точные тесты основаны на надежном популяционном генетическом анализе, позволяющем обеспечить видо-/биовар-специфичность используемых маркеров (Whatmore & Gopaul, 2011).

В последнее время описан целый ряд других методов, которые позволяют получить полезную эпизоотологическую информацию. К ним относятся метод мультилокусного секвенирования (Whatmore & Gopaul, 2011) и несколько методов типирования, основанных на применении анализа с множественными локусами, варьирующими по числу tandemных повторов (MLVA) (Bricker et al., 2003; Le Flèche et al., 2006; Whatmore & Gopaul, 2011). В зависимости от выбора конкретного маркера эти методы позволяют идентифицировать изоляты на видовом уровне или получать ценную эпизоотологическую информацию на уровне подвида.

### 1.5. Идентификация вакцинных штаммов

Идентификацию вакцинных штаммов S19 *B. abortus*, Rev.1 *B. melitensis* и RB51 *B. abortus* осуществляют с помощью специфичных методов ПЦР (Kang et al., 2011; Lopez-Goñi et al., 2011) или по их ростовым характеристикам в ходе культивирования.

Штамм S19 *Brucella abortus* обладает типичными свойствами биовара 1 штамма *B. abortus*, но не требует для роста CO<sub>2</sub>, не растет в присутствии бензилпенициллина (3 мкг/мл = 5 МЕ/мл), тионина синего (2 мкг/мл) и эритритола (1 мг/мл) (все в конечных концентрациях) и характеризуется высоким потреблением L-глутамата (Alton et al., 1988).

Штамм Rev.1 *B. melitensis* обладает типичными свойствами биовара 1 штамма *B. melitensis*, но образует более мелкие колонии на твердой среде, не растет в присутствии основного фуксина, тионина (оба в концентрации 20 мкг/мл) или

бензилпенициллина (3 мкг/мл), но растет в присутствии стрептомицина в концентрации 2,5 или 5 мкг/мл (5 МЕ/мл) (Alton et al., 1988).

Вакцинный штамм RB51 *B. abortus* отличается от гладкого биовара 1 *B. abortus* следующими характеристиками: шероховатая морфология, рост в присутствии рифампицина (250 мкг/мл среды).

**Таблица 2. Отличительные особенности видов рода *Brucella***

Виды	Морфология колоний <sup>b</sup>	Необходимость в сыворотке	Лизис фагами <sup>a</sup>				Оксидаза	Активность уреазы	Предпочтительный хозяин	
			Tb	Wb	Iz <sub>1</sub>	R/C				
			RTD <sup>c</sup>	10 <sup>4</sup> RTD	RTD	RTD	RTD			
<i>B. abortus</i>	S	- <sup>d</sup>	+	+	+	+	-	(+) <sup>e</sup>	(+) <sup>f</sup>	КРС и другие Bovidae
<i>B. melitensis</i>	S		-	-	(-) <sup>i</sup>	+	-	+	+ <sup>h</sup>	Овцы и козы
<i>B. suis</i>	S	-	-	+	(+) <sup>i</sup>	(+) <sup>i</sup>	-	+	+ <sup>j</sup>	Биовар 1: свиньи Биовар 2: свиньи, зайцы Биовар 3: свиньи Биовар 4: северные олени Биовар 5: грызуны
<i>B. neotomae</i>	S	-	- <sup>k</sup>	+	+	+	-	-	+ <sup>j</sup>	Пустынная крыса <sup>l</sup>
<i>B. ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Овцы
<i>B. canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+ <sup>j</sup>	Собаки
<i>B. ceti</i>	S	НО	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+	Китообразные
<i>B. pinnipedialis</i>	S	НО	(-)	+	+	+	НО	+	+ <sup>h</sup>	Ластоногие
<i>B. microti</i>	S	-	-	+	+	+	НО	+	+ <sup>h</sup>	Обыкновенная полевка
<i>B. inopinata</i>	S	НО	-	PL <sup>m</sup>	НО	НО	НО	НО	+ <sup>j</sup>	Не установлен
<i>B. papionis</i>	S		PL <sup>m</sup>	PL <sup>m</sup>	+	НО	-	-	+ <sup>j</sup>	Не установлен

Из Alton et al. (1988), Совместный экспертный комитет ФАО/МЭБ по бруцеллезу (1986), Whatmore (2009) и Whatmore et al. (2014)

(+)/(-) большинство изолятов положительно/отрицательно

- a Фаги: Тбилиси (Tb), Уэйбридж (Wb), Изатнагар (Iz<sub>1</sub>) и R/C
- b Обычно встречающаяся фаза: S: гладкий, R: шероховатый
- c RTD: разведение для стандартного теста
- d Для первичного выделения методом культивирования биовара 2 *Brucella abortus* обычно необходима сыворотка
- e Некоторые африканские изоляты биовара 3 *Brucella abortus* являются отрицательными
- f Промежуточная скорость реакции, за исключением штамма 544 и некоторых полевых штаммов, являющихся отрицательными
- g Некоторые изоляты лизируются фагами Wb
- h Низкая скорость реакции кроме некоторых штаммов, характеризующихся высокой скоростью реакции в тесте на активность уреазы
- i Некоторые изоляты биовара 2 *B. suis* не лизируются или только частично лизируются фагом Wb или Iz<sub>1</sub>
- j Высокая скорость реакции
- k Минутные бляшки
- l *Neotoma lepida*
- m Частичный лизис
- НО Не определяли

**Таблица 3. Отличительные особенности биоваров видов *Brucella***

Виды	Биовар	Необходимость в CO <sub>2</sub>	Продукция H <sub>2</sub> S	Рост на красителях <sup>a</sup>		Агглютинация с моноспецифической сывороткой			Референтный штамм <sup>2</sup>		
				Тионин	Основной фуксин	A	M	R	Штамм	ATCC	NCTC
<i>B. abortus</i>	1	(+) <sup>b</sup>	+	-	+	+	-	-	544	23448	10093
	2	(+) <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-	86/8/59	23449	10501
	3 <sup>c</sup>	(+) <sup>b</sup>	+	+	+	+	-	-	Tulya	23450	10502
	4	(+) <sup>b</sup>	+	-	(+)	-	+	-	292	23451	10503
	5	-	-	+	+	-	+	-	B3196	23452	10504
	6 <sup>c</sup>	-	(-)	+	+	+	-	-	870	23453	10505
	9	+/-	+	+	+	-	+	-	C68	23455	10507
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-	16M	23456	10094
	2	-	-	+	+	+	-	-	63/9	23457	10508
	3	-	-	+	+	+	+	-	Ether	23458	10509
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	(-)	+	-	-	1330	23444	10316
	2	-	-	+	-	+	-	-	Thomsen	23445	10510
	3	-	-	+	+	+	-	-	686	23446	10511
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	40	23447	11364
	5	-	-	+	-	-	+	-	513	/	11996
<i>B. neotomae</i>		-	+	- <sup>d</sup>	-	+	-	-	5K33	23459	10084
<i>B. ovis</i>		+	-	+	(-)	-	-	+	63/290	25840	10512
<i>B. canis</i>		-	-	+	(-)	-	-	+	RM6/66	23365	10854
<i>B. ceti</i>		(-)	-	(+)	(+)	+	(-)	-	B1/94	/	12891
									BCCN 94-74	/	
<i>B. pinnipedialis</i>		(+)	-	+	(+)	(+)	(-)	-	B2/94	/	12890
									BCCN 94-73	/	
<i>B. microti</i>		-	-	+	+	-	+	-	CCM4915	/	/
									BCCN 07-01	/	/
<i>B. inopinata</i>		-	+	+	+	-	+ <sup>e</sup>	-	CAPM 6434	/	/
									BO1	/	/
<i>B. papionis</i>		-	-	-	-	+	-	-	BCCN 09-01	/	/
									CAPM 6436	/	/
<i>B. papionis</i>		-	-	-	-	+	-	-	F8/08-60	/	13660
									CIRMBP	/	
									0958		

Из Alton et al. (1988), Совместный экспертный комитет ФАО/МЭБ по бруцеллезу (1986), Whatmore (2009) и Whatmore et al. (2014)

(+)(-) большинство изолятов положительно/отрицательно

- a Концентрация красителя в сывороточно-декстрозном агаре: 20 мкг/мл
- b Обычно требуется при первичном выделении
- c Для более точной дифференциации биовара 3 и 6 также добавляют тионин в концентрации 40 мкг/мл: биовар 3 = +, биовар 6 = -
- d Рост при концентрации тионина 10 мкг/мл
- e Слабая агглютинация
- НО Не определяли

## 2. Серологические тесты

Не существует единого серологического теста, который подходил бы для всех эпизоотологических ситуаций и для всех видов животных; все тесты имеют ограничения,

<sup>2</sup> <http://www.the-icsp.org/taxa/Brucellalist.htm>

особенно, в случае скрининга отдельных животных. Необходимо уделить внимание всем факторам, которые влияют на актуальность метода исследования и на его результаты с точки зрения специфической диагностической интерпретации или применения. В тех эпизоотологических единицах, в которых практикуется вакцинация гладкими *Brucella*, в зависимости от метода вакцинации (доза/способ введения) у вакцинированных животных возможны положительные реакции из-за перекрестной реакции антител на заражение дикими штаммами. Кроме того, ряд бактерий, например, *Yersinia enterocolitica* O:9, могут индуцировать гуморальный ответ, виновный в появлении ложноположительных реакций в серологических исследованиях на бруцеллез, что препятствует точной постановке диагноза. Ложноположительные реакции могут наблюдаться у всех животных с разной частотой в зависимости от времени и региона.

Реакция сывороточной агглютинации (SAT), как правило, считается не пригодной для целей международной торговли. Реакция связывания комплемента (CFT) отличается более высокой специфичностью, чем SAT, а так же имеет стандартизованную систему активности в международных единицах. Диагностические характеристики некоторых твердофазных иммуноферментных анализов (ИФА) и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPA) вполне сопоставимы или даже превосходят таковые реакции связывания комплемента, и поскольку они технически проще в исполнении и более надежны, то предпочтительнее использовать их. Диагностические характеристики таких тестов сравнивали на КРС, мелких жвачных и свиньях.

Удобными скрининговыми тестами для контроля бруцеллеза на национальном или местном уровне являются тесты с забуференным антигеном *Brucella* (ВВАТ), то есть роз-бенгал тест (РБТ) и реакция пластинчатой агглютинации с забуференным антигеном (ВРАТ), а так же ИФА и FPA. В зависимости от цели исследования положительные результаты следует проверять подходящим подтверждающим и/или дополнительным методом.

У других видов, например, буйволов (*Bubalus bubalus*), американских и европейских бизонов (*Bison bison*, *Bisonbonasus*), яков (*Bos grunniens*), лосей/вапити (*Cervus elaphus*), верблюдов (*Camelus bactrianus* и *C. dromedaries*) и животных семейства верблюдовые Южной Америки, инфекции, вызванные *Brucella sp.*, протекают таким же, как и у КРС. Для этих животных можно использовать такие же серологические методы, но каждый метод необходимо валидировать для конкретного вида животного.

## 2.1. Эталонные сыворотки

Стандартные образцы МЭБ – это образцы, с которыми сравнивают и по которым стандартизируют другие стандарты. Эти стандартные образцы доступны для всех национальных референтных лабораторий и должны использоваться для создания вторичных или национальных стандартов, на базе которых можно приготовить рабочие стандартные образцы, ежедневно используемые диагностическими лабораториями.

Эти сыворотки разработаны МЭБ в качестве Международных стандартных сывороток<sup>3</sup>. Их использование способствует международной гармонизации диагностических исследований и стандартизации антигенов:

- i) Для роз-бенгал теста, CFT, SAT и кольцевого теста в молоке (MRT) используется международная стандартная сыворотка МЭБ (OIEISS, ранее – Вторая международная сыворотка ВОЗ против *Brucella abortus*, ВОЗ, 1953). Эта сыворотка получена от КРС и содержит 1000 МЕ (SAT) и 1000 МЕ CFT (международных единиц для реакции связывания комплемента).
- ii) Для непрямого ИФА (нИФА), конкурентного или блокирующего вариантов ИФА (кИФА) и FPA для КРС имеются три стандартных сыворотки МЭБ для

<sup>3</sup> Доступны в Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллезу в Великобритании

ИФА. Они также получены от КРС и состоят из сильно положительной (OIEELISA<sub>SPSS</sub>), слабоположительной (OIEELISA<sub>WPSS</sub>) и отрицательной (OIEELISA<sub>NSS</sub>) стандартной сыворотки.

- iii) Для нИФА, кИФА и FPA для овец и коз используют международную стандартную сыворотку против *B. melitensis* (ISaBmS) (McGiven et al., 2011).
- iv) Для нИФА, кИФА и FPA для свиней на данный момент не существует международной стандартной сыворотки.

## 2.2. Производство антигенов

Для производства антигенов для ВВАТ, SAT, CFT и FPA всегда следует использовать штамм 99 *Brucella abortus* (Уэйбридж) (S99)<sup>3</sup> или штамм 1113-3 *B. abortus* (Департамент сельского хозяйства США (USDA)) (S1119-3)<sup>4</sup>. Эти штаммы *B. abortus* также могут служить источником растворимых экстрактов антигенов (гладкого липополисахарида [S-ЛПС] или O-специфического полисахарида [ОПС]) для ИФА или реакций для обнаружения нативного гаптена, хотя для данной цели также подходит штамм 16М *B. melitensis*. Следует отметить, что антиген, приготовленный на основе одного из двух штаммов *B. abortus* или штамма 16М *B. melitensis*, используют для тестирования на любую инфекцию, вызванную гладкими штаммами бруцелл.

Штаммы должны быть полностью гладкими и не должны самоагглютинировать в физрастворе и 0,1% (в отношении массы к объему) акрифлавине. Это должны быть чистые культуры, обладающие соответствующими характеристиками CO<sub>2</sub>-независимых штаммов, таких как биовар 1 *B. abortus* или биовар 1 *B. melitensis*. Оригинальный посевной материал размножают до получения маточной серии клеток, обладающей свойствами, характерными для этих штаммов, и хранят в лиофилизированном виде или подвергают замораживанию в жидком азоте.

Для производства антигена посевной материал высевают на несколько скошенных картофельных агаров, которые инкубируют при 37°C ± 2°C в течение 48 часов. Декстрозный агар Сабуро и триптозо-соевый агар с добавлением 5% лошадиной сыворотки или сыворотки новорожденного теленка или 0,1% экстракта дрожжей считаются подходящими твердыми средами при условии использования посевного материала, соответствующего указанным выше рекомендациям. Полученную культуру проверяют на чистоту, восстанавливают в стерильном ФБР, рН 6,4, и высевают на слои картофельного агара или глицериново-декстрозного агара в матрасы Ру. Матрасы инкубируют при 37°C ± 2°C в течение 72 часов культурой вниз. Каждый матрас проверяют на чистоту методом окрашивания по Граму образцов культуры; микроорганизмы собирают после добавления 50-60 мл фенольного раствора (0,5% фенол в 0,85% растворе хлорида натрия) в каждый матрас. Матрасы слегка встряхивают, суспензию сцеживают и бактерии инактивируют нагреванием до 80°C в течение 90 минут. После проверки на жизнеспособность микроорганизмов антиген хранят при 5°C ± 3°C.

Маточную серию клеток также можно произвести в биореакторе с открытой или закрытой системой культивирования. В этом случае используют жидкую среду, содержащую (на литр очищенной воды) декстрозу (30 г), пептон высокой степени очистки (30 г), экстракт дрожжей (Difco) (10 г), дигидрофосфат натрия (9 г) и гидрофосфат натрия (3,3 г). Первоначальный рН составляет 6,6 (± 0,2) с тенденцией к повышению до рН 7,2 (± 0,2) во время цикла роста. Следует обязательно проверять серии пептона и экстракта дрожжей на способность продуцировать хороший рост клеток без образования аномальных или диссоциированных клеток. Во время роста необходимо обеспечить обильное

<sup>4</sup> Доступен в Лабораториях Национальных ветеринарных служб Департамента сельского хозяйства США, 1800 Dayton Road, Эймс, шт. Айова, Соединенные Штаты Америки.

аэрирование и перемешивание с коррекцией pH до 7,2 ( $\pm 0,2$ ) путем добавления 0,1 моль HCl, при необходимости. Посевной материал готовят так, как описано выше. Культуры инкубируют при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 48 часов. Культивирование в открытой системе занимает больше времени, но требует навыков для поддержания требуемых условий. В процессе культивирования проводят проверки культуры, выращенной на твердой или жидкой среде, на чистоту, адекватное число жизнеспособных микроорганизмов и отсутствие диссоциации, характерной для шероховатых форм. Клетки, используемые для производства всех антигенов, проверяют на чистоту и гладкость на стадии сбора.

Культуры собирают центрифугированием, во время которого происходит осаждение микроорганизмов, с последующим ресуспендированием в фенольном растворе. Бактерии инактивируют нагреванием до  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 90 минут и хранят при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Бактерии должны образовывать стабильные суспензии в физрастворе без признаков самоагломинации. Суспензии клеток проверяют на жизнеспособность: рост бактерий должен отсутствовать после 10 дней инкубирования при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Объем осажденных клеток в инактивированной суспензии можно определить центрифугированием 1 мл суспензии в пробирке Винтроба со скоростью 3000 g в течение 75 минут.

## **2.3. Тесты с забуференным антигеном *Brucella* (BBAT)**

### **2.3.1. Роз-бенгал тест (RBT)**

Данный тест представляет собой простую кровяную реакцию агглютинации с использованием антигена, окрашенного бенгальским розовым и забуференного до низкого pH, обычно  $3,65 \pm 0,05$  (Morgan et al., 1969).

#### **2.3.1.1. Получение антигена**

Антиген для RBT готовят путем осаждения инактивированных клеток S99 или S1119-3 *B. abortus* центрифугированием со скоростью 23 000 g в течение 10 минут при температуре  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  с последующим однородным ресуспендированием в фенольном растворе (0,5%) в соотношении 1 г на 22,5 мл. (Примечание: если в качестве осаждающего агента во время приготовления клеточного концентрата используется натрий карбоксиметилцеллюлоза, то перед окрашиванием нерастворимый осадок следует удалить фильтрованием суспензии через префильтр AMF-CUNO Zeta-plus [тип CPR 01A]). К каждому 35 мл данной суспензии добавляют 1 мл 1% (в соотношении массы к объему) бенгальского розового (кат. № 45440) в стерильной очищенной воде, затем смесь помешивают в течение 2 часов при комнатной температуре. Смесь фильтруют через стерильную вату и центрифугируют при 10 000 g до осаждения окрашенных клеток, которые затем однородно ресуспендируют в соотношении 1 г клеток на 7 мл разбавителя (21,1 г гидроксида натрия растворяют в 353 мл стерильного фенольного раствора, добавляют 95 мл молочной кислоты и доводят до 1056 мл фенольным раствором). Цвет данной суспензии должен быть ярко-розовым, а супернатант центрифугированного образца не должен содержать красителя; показатель pH должен быть  $3,65 \pm 0,05$ . После фильтрования через вату суспензию фильтруют дважды через стекловолоконный префильтр Sartorius № 13430, доводя до объема осажденных клеток приблизительно 8%, в ожидании окончательной стандартизации с сывороткой, стандартизированной по OIEISS, и хранят при температуре  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  в темном месте. Антиген нужно хранить в соответствии с рекомендациями производителя. Антиген не подвергают замораживанию.

### 2.3.1.2. Стандартизация антигена

При использовании в стандартной процедуре тестирования антиген RBT должен давать явно положительную реакцию с международной стандартной сывороткой МЭБ (OIEISS), разведенной 1/45, но не 1/55, в 0,5% фенольном растворе или нормальном физрастворе.

Возможно проведение дополнительных проверок с использованием ISaVmS. Наивысшее разведение (в отрицательной козьей сыворотке) этого стандартного образца, которое должно давать положительный результат, и наименьшее разведение (в отрицательной козьей сыворотке), которое должно давать отрицательный результат, составляют 1/16 и 1/20, соответственно (McGiven et al., 2011).

Также рекомендуется сравнивать реактивность новых и ранее стандартизированных серий антигена с использованием панели эталонных сывороток.

Однако вышеуказанная стандартизация против OIEISS является, вероятно, причиной сниженной чувствительности некоторых серий антигенов RBT для диагностики инфекции *B. melitensis* у мелких жвачных, а также расхождений в результатах с CFT (Blasco et al. 1994a). При исследовании образцов от мелких жвачных расхождения в результатах с CFT можно свести к минимуму за счет использования соотношения сыворотки и антигена 3:1 (например, 75 мкл и 25 мкл, соответственно) вместо соотношения 1:1, как рекомендовано в стандартном описании процедуры теста. Однако такая модификация RBT не рекомендуется для исследований образцов от КРС и свиней.

### 2.3.1.3. Процедура тестирования

- i) Пробы сыворотки и антиген доводят до комнатной температуры ( $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ); из холодильника следует доставать только то количество антигена, которое необходимо для проведения тестов в течение дня.
- ii) 25-30 мкл каждого образца сыворотки переносят на белый керамический, эмалированный или пластиковый планшет или на планшет для гемагглютинации ВОЗ.
- iii) Флакон с антигеном хорошо, но осторожно встряхивают и помещают равный объем антигена рядом с каждой каплей сыворотки.
- iv) Сразу после того, как последняя капля будет перенесена на планшет, сыворотку и антиген тщательно смешивают (используя чистую стеклянную или пластиковую палочку для каждого теста) до получения круглой или овальной области диаметром приблизительно 2 см.
- v) Смесь осторожно взбалтывают 4 минуты при комнатной температуре ( $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ) на качалке или на мешалке, работающей в трех направлениях, (в зависимости от формы зоны реакции: овальной или круглая, соответственно).
- vi) Результаты реакции агглютинации учитывают сразу по истечении 4-минутного периода. Любая визуальная реакция считается положительной. Каждый день перед проведением тестов следует протестировать контрольную сыворотку, дающую минимальную положительную реакцию, с целью проверки чувствительности условий теста.

Роз-бенгал тест считается очень чувствительным. Однако, как и все другие серологические тесты, иногда он может давать положительный

результат из-за вакцинации штаммом S19 *B. abortus* или ложноположительный результат. Такой же феномен встречается у мелких жвачных или свиней, склонных к ложноположительным реакциям, и у мелких жвачных, вакцинированных штаммом Rev.1 *B. melitensis*. Поэтому положительные реакции нужно проверять с использованием соответствующих подтверждающих или дополнительных методов (включая проведение эпизоотологического расследования). Ложноотрицательные реакции встречаются редко. Тем не менее, роз-бенгал тест вполне подходит в качестве скринингового теста для обнаружения инфицированных стад или для подтверждения отсутствия инфекции в стаде, свободном от бруцеллеза.

### **2.3.2. Реакция пластинчатой агглютинации с забуференным растворителем (ВРАТ)**

#### **2.3.2.1. Получение антигена**

Антиген для ВРАТ готовят из *B. abortus* S1119-3 согласно процедуре, описанной Agnus и Barton (1984).

Необходимо два окрашивающих раствора: бриллиантовый зеленый (2 г/100 мл) и кристаллический фиолетовый (1 г/100 мл), оба сертифицированных красителя растворяют в дистиллированной воде. После приготовления оба раствора хранят отдельно в течение 24 часов, а затем смешивают вместе в равных объемах в темном флаконе и хранят в холодильнике не менее 6 месяцев до использования. Смешанный краситель можно использовать через 6 по 12 месяц после первичного приготовления.

Забуференный разбавитель готовят путем медленного растворения гидроксида натрия (150 г) в 3-4 л стерильного фенольного раствора. В этот раствор добавляют молочную кислоту (675 мл), и конечный объем доводят до 6 литров путем добавления стерильного фенольного раствора. рН раствора должен составлять  $3,65 \pm 0,05$ .

Осажденные клетки S1119-3 *B. abortus* разводят до концентрации 250 г/л в фенольном растворе, добавляют 6 мл красителя на литр клеточной суспензии и хорошо встряхивают смесь перед фильтрацией через стерильную гигроскопическую вату. Клетки центрифугируют при 10 000 g при 4°C, затем осажденные клетки ресуспендируют в концентрации 50 г/100 мл в забуференном растворителе (состав описан выше). Эту смесь встряхивают в течение 2 часов, а затем разбавляют путем добавления 300 мл забуференного разбавителя на 100 мл суспендированных клеток (т.е. конечная концентрация составит 50 г осажденных клеток/400 мл забуференного разбавителя). Смесь помешивают при комнатной температуре в течение 20-24 часов, затем концентрацию клеток доводят до 11% (соотношение массы к объему) в забуференном разбавителе. Эту суспензию перемешивают в течение ночи перед тестированием. В ожидании итоговых испытаний контроля качества антиген хранят при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  до того, как он понадобится для использования. Антиген не подлежит замораживанию.

рН антигена должен составлять  $3,70 \pm 0,03$ , а рН смеси сыворотка-антиген в соотношении 8:3 должен составлять  $4,02 \pm 0,04$ . 11% суспензия окрашенных клеток должна иметь сине-зеленый цвет. Каждую серию антигена проверяют путем тестирования не менее 10 слабо реактивных сывороток с последующим сравнением результатов с результатами одной или более предыдущих серий антигена. По

возможности, серии антигена нужно сравнивать со стандартным антигеном, произведенным Лабораториями национальных ветеринарных служб Департамента сельского хозяйства США (адрес см. в сноске 2). Однако не существует никакой международной процедуры стандартизации, установленной для применения с OIEISS или ISaVmS.

### **2.3.2.2. Процедура тестирования**

- i) Пробы сыворотки и антиген доводят до комнатной температуры ( $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ); из холодильника следует доставать только то количество антигена, которое необходимо для проведения тестов в течение дня.
- ii) Образец сыворотки хорошо встряхивают. 80 мкл каждого образца сыворотки переносят на стеклянный планшет, маркированный квадратами размером  $4 \times 4$  см.
- iii) Флакон с антигеном хорошо, но осторожно встряхивают и 30 мкл антигена помещают с каждой каплей сыворотки.
- iv) Сразу после того как последняя капля будет перенесена на планшет, сыворотку и антиген смешивают
- v) Тщательно (используя чистую стеклянную или пластиковую палочку для каждого теста) до получения круглой области диаметром приблизительно 3 см.
- vi) После первоначального смешивания планшет помещают на ротор и встряхивают 3 раза с опрокидыванием для обеспечения ровной дисперсии реактивов, а затем инкубируют 4 минуты во влажной камере при температуре окружающей среды.
- vii) Планшет снимают и встряхивают, как указано выше, а затем повторно инкубируют в течение 4 минут.
- viii) Результаты реакции агглютинации учитывают сразу по истечении 8-минутного периода. Любая визуальная реакция считается положительной. Каждый день перед проведением тестов тестируют контрольную сыворотку, дающую минимальную положительную реакцию, с целью проверки чувствительности условий теста.

Как и роз-бенгал тест, этот тест очень чувствителен у КРС, особенно для обнаружения поствакцинальных антител, однако, положительные реакции нужно проверять с использованием соответствующих подтверждающих или дополнительных методов. Возможны ложноотрицательные реакции, в основном, из-за образования «прозонов»; этого можно избежать путем разведения сыворотки или повторного тестирования после определенного периода времени. Хотя в некоторых странах ВРАТ широко применяют с достаточно удовлетворительными результатами у мелких жвачных и свиней, диагностическая ценность данного теста у этих видов животных не определена на международном уровне.

### **2.4. Реакция связывания комплемента (СФТ)**

Реакция связывания комплемента (СФТ) является широко используемым тестом, хотя и сложным для проведения и требующим хорошего лабораторного оборудования и персонала, прошедшего соответствующее обучение, для проведения точного титрования и поддержания реактивов. Существует большое количество различных вариантов СФТ, но данный тест удобнее всего проводить на микропланшетах. Для инкубирования сыворотки, антигена и комплемента используют либо теплую, либо холодную фиксацию: при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30

минут, или при 4°C в течение 14-18 часов. На выбор метода влияют несколько факторов: антикомплементарная активность в пробах сывороток низкого качества наиболее явно проявляется при холодной фиксации, в то время как фиксация при 37°C повышает частоту и интенсивность прозонов, и каждый образец можно тестировать в нескольких разведениях.

Для CFT было предложено несколько методов с применением различных концентраций свежих или консервированных эритроцитов барана (ЭБ) (обычно рекомендуется 2, 2,5% или 3% суспензия), сенсibilизированных равным объемом кроличьей анти-ЭБ сыворотки, разбавленной так, чтобы она содержала концентрацию, в несколько (обычно от двух до пяти раз) раз превышающую минимальную концентрацию, необходимую для получения 100% лизиса ЭБ в присутствии титрованного раствора комплемента морской свинки. Последний титруют отдельно (в присутствии или в отсутствии антигена в зависимости от метода) для определения объема комплемента, необходимого для достижения 50% или 100% лизиса сенсibilизированных ЭБ в единице объема стандартизированной суспензии; эти значения считают 50% или 100% гемолитической единицей комплемента/минимальной гемолитической дозы (С'Н или MHD<sub>50</sub> или С'Н или MHD<sub>100</sub>), соответственно. Как правило, комплемент рекомендуется титровать до проведения каждой серии тестов, предпочтение отдается макрометоду для оптимального определения С'Н<sub>50</sub>. Обычно в тесте используют 1,25-2 С'Н<sub>100</sub> или 5-6 С'Н<sub>50</sub>.

Стандартным разбавителем для CFT является физраствор, забуференный барбиталом (вероналом). Его готовят из имеющихся в продаже таблеток или путем смешивания исходного раствора хлорида натрия (42,5 г), барбитуровой кислоты (2,875 г), диэтилбарбитурата натрия (1,875 г), сульфата магния (1,018 г) и хлорида кальция (0,147 г) в 1 литре очищенной воды с последующим разведением путем добавления 4-х объемов 0,04% раствора желатина до использования. Однако этот буфер содержит производные барбитуровой кислоты, которые запрещены в некоторых странах. Хорошие результаты также можно получить с использованием раствора хлорида натрия 0,85% без содержания барбитуровой кислоты, но с добавлением кальция и магния, который готовят следующим образом: 1 мл исходного раствора 1 моль хлорида магния и 0,3 моль хлорида кальция (безводный MgCl<sub>2</sub>: 9,5 г; CaCl<sub>2</sub>: 3,7 г; очищенная вода: до 100 мл) (хранить небольшими объемами при 5°C ± 3°C) переносят в 1 л солевого раствора (Alton et al., 1988). Показатель pH имеет важное значение и должен составлять 7,35 (± 0,05). Процесс валидации замены вероналового буфера на буфер без содержания барбитуровой кислоты прошел в Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллезу во Франции<sup>5</sup>.

#### 2.4.1. Получение антигена

Существуют различные варианты теста, но вне зависимости от того, какая процедура выбрана, в тесте следует использовать антиген, приготовленный из утвержденного гладкого штамма *B. abortus*, например, S99 или S1119-3, стандартизированного против OIEISS. Антиген для CFT может получить, следуя стандартной процедуре (Alton et al., 1988), а цельноклеточный антиген можно использовать после разведения маточной суспензии, таким образом, чтобы перед стандартизацией с OIEISS объем осажденных клеток концентрированной суспензии антигена для CFT составлял приблизительно 2%.

#### 2.4.2. Стандартизация антигена

---

<sup>5</sup> Можно получить в Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллезу во Франции.

Антиген должен быть стандартизирован с тем, чтобы давать 50% фиксацию с OIEISS в разведении 1/200, при этом при более низких разведениях сыворотки должна наблюдаться полная фиксация, поскольку в очень низкой (или очень высокой) концентрации антиген может не индуцировать 100% фиксацию при более низких разведениях сыворотки. Когда в наличии имеется два разведения антигена, следует выбрать более концентрированную суспензию в целях предотвращения появления прозонов. По внешнему виду антиген, разведенный 1/10, должен представлять собой однородную, плотную суспензию белого цвета без видимой агрегации или осадка после инкубирования при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 18 часов. Рабочая концентрация антигена для теста не должна производить антикомплементарного эффекта. Антиген хранят при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , не допуская замораживания.

### 2.4.3. Процедура тестирования (пример)

Неразведенные исследуемые сыворотки и соответствующие рабочие стандарты инактивируют в течение 30 минут на водяной бане при  $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Если сыворотки заранее уже развели равным объемом вероналового буфера, то их можно инактивировать при  $58^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 50 минут. Как правило, тестируют только одно разведение сыворотки (в основном, 1/4 или 1/5 в зависимости от выбранной процедуры связывания комплемента), однако, в целях торговли или в случае наличия клинических признаков с целью обнаружения прозонов рекомендуется тестировать серийные разведения образцов сывороток.

При использовании стандартных круглодонных 96-луночных планшетов для микротитрования процедуру обычно выполняют следующим образом:

- i) По 25 мкл разведенной инактивированной исследуемой сыворотки помещают в лунку первого, второго и третьего рядов. Первый ряд является антикомплементарным контролем для каждой сыворотки. По 25 мкл буфера для СФТ добавляют в лунки первого ряда (антикомплементарные контроли) для компенсации отсутствия антигена. По 25 мкл буфера для СФТ добавляют во все оставшиеся лунки за исключением второго ряда. Затем делают серийные дублирующие разведения путем переноса 25 мкл сыворотки из третьего ряда далее. 25 мкл полученной смеси в последнем ряду выбрасывают.
- ii) По 25 мкл антигена, разведенного до рабочей концентрации, вносят в каждую лунку кроме первого ряда.
- iii) По 25 мкл комплемента, разведенного до необходимого количества единиц, добавляют в каждую лунку.
- iv) Контрольные лунки, содержащие:
  - a) только разбавитель,
  - b) комплемент + разбавитель,
  - c) антиген + комплемент + разбавитель,доводят до содержания 75 мкл общего объема в каждом случае.

Для проверки чувствительности условий теста в каждой серии испытаний тестируют контрольную сыворотку, которая дает минимальную положительную реакцию.

- v) Планшеты инкубируют при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут или при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, затем в каждую лунку вносят

сенсibilизированные эритроциты барана (в объеме 25 или 50 мкл в зависимости от метода). Планшеты повторно инкубируют при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут.

vi) Результаты учитывают после центрифугирования планшетов при 1000 g в течение 10 минут при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  или после инкубирования в спокойном состоянии при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  в течение 2-3 часов для осаждения нелизированных клеток. Степень гемолиза сравнивают со стандартами, соответствующими 0, 25, 50, 75 и 100% лизису. Для каждой сыворотки из первого ряда проверяют отсутствие антикомплементарной активности.

vii) Стандартизация результатов CFT:

Для стандартизации результатов существует система единиц, основанная на OIEISS. Если сыворотку тестируют данным методом и в результате получают титр, например, 200 (50% гемолиз), то фактор для неизвестной сыворотки, протестированной тем же методом, можно рассчитать по формуле:  $1000 \times 1/200 \times \text{титр исследуемой сыворотки} = \text{количество международных единиц CFT антител в исследуемой сыворотке на 1 мл}$ . OIEISS содержит специфический IgG; специфическую комплемент-фиксирующую активность национальных стандартных сывороток должны определять на основе этого изотопа. Трудности со стандартизацией возникают в результате того, что разные методы стимулируют связывание комплемента различными изотопами иммуноглобулина. Рекомендуются, чтобы в стране, использующей CFT на национальном уровне, лаборатории, осуществляющие такие испытания, договорились использовать один и тот же метод с целью получения одинакового уровня чувствительности. Для облегчения сравнения результатов тестов между странами, результаты всегда нужно выражать в ICFTU (международных единицах для реакции связывания комплемента), рассчитанных на основании результатов параллельной титрации со стандартной сывороткой, которая в свою очередь может быть стандартизирована с OIEISS.

viii) Интерпретация результатов: Сыворотки, дающие титр, эквивалентный 20 ICFTU/мл или выше, считаются положительными.

Животные, вакцинированные штаммами S19 *B. abortus* или Rev.1 *B. melitensis* в возрасте 3-6 месяцев, считаются инфицированными, если сыворотка показывает положительную фиксацию с титром 30 ICFTU/мл или выше, когда животных тестируют в возрасте 18 месяцев и старше.

Эта процедура является примером, возможен выбор других объемов и количеств реагентов при условии, что тест стандартизирован с OIEISS, как описано выше, а результаты выражены в ICFTU/мл.

CFT является очень специфичным, но менее чувствительным тестом, чем RBT и ИФА, особенно, в случае со свиньями, так как комплемент свиного происхождения взаимодействует с комплементом морской свинки с образованием прокомплементарной активности, снижающей чувствительность. Таким образом, чувствительность CFT ниже в случае диагностики инфекции *B. suis*, при этом проблему ложноположительных результатов преодолеть невозможно, и поэтому CFT у свиней

применяют только в качестве дополнительного диагностического теста. Кроме того, подобно другим серологическим тестам, СФТ иногда может давать положительные результаты у жвачных животных, вакцинированных штаммами S19 *B. abortus* или Rev.1 *B. melitensis*, и не обладает достаточной специфичностью вследствие возможности ложноположительных серологических реакций. Поэтому результаты СФТ нужно проверять с использованием подходящих подтверждающих и/или дополнительных методов.

## **2.5. Твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА)**

### **2.5.1. Непрямой ИФА**

Описано много вариантов непрямого ИФА (НИФА) для КРС, мелких жвачных животных и свиней с применением различных препаратов антигена, антиглобулинов, меченных ферментами, и субстратов/хромогенов. Для производства этих антигенов используют штамм 99 *Brucella abortus* (Уэйбридж) (S99)<sup>3</sup> или 1119-3 *B. abortus* (USDA) (S1119-3)<sup>4</sup>, хотя для этой цели подходит штамм 16М *B. melitensis*. В продаже есть несколько коммерческих наборов НИФА, в которых в качестве антигена используются цельные клетки, гладкие липополисахариды (S-ЛПС) или О-специфический полисахарид (ОПС), валидированных в обширных полевых испытаниях, и уже широко применяющихся. Тем не менее, используемый метод и интерпретация результатов должны быть валидированы в соответствии с принципами, изложенными в Главе 1.1.6 Принципы и методы валидации тестов для диагностики инфекционных заболеваний.

#### **2.5.1.1. Стандартизация метода НИФА (ЕС, 2008; McGiven et al., 2011)**

##### **2.5.1.1.1. Бруцеллезная инфекция у КРС:**

- i) Предварительное разведение слабоположительной OIEELISA<sub>WPSS</sub> 1/2 или предварительное разведение сильно положительной OIEELISA<sub>SPSS</sub> 1/16 в отрицательной телячьей сыворотке (или в отрицательном пуле телячьих сывороток) должны давать положительную реакцию;

и

- ii) Предварительное разведение OIEELISA<sub>WPSS</sub> 1/8 или предварительное разведение OIEELISA<sub>SPSS</sub> 1/64 в отрицательной телячьей сыворотке (или в отрицательном пуле телячьих сывороток) должны давать отрицательную реакцию;

и

- iii) Отрицательная стандартная сыворотка OIEELISA<sub>NSS</sub> всегда должна давать отрицательную реакцию.

##### **2.5.1.1.2. Бруцеллезная инфекция у овец и коз:**

- i) Предварительное разведение ISaBmS 1/64 в отрицательной козьей сыворотке (или в отрицательном пуле козьих сывороток) должно давать положительную реакцию;

и

- ii) Предварительное разведение ISaBmS 1/750 в отрицательной козьей сыворотке (или в отрицательном пуле козьих сывороток) должно давать отрицательную реакцию;

и

- iii) Вышеуказанная отрицательная козья сыворотка (или отрицательный пул козьих сывороток) всегда должна показывать отрицательную реакцию.

#### 2.5.1.1.3. Бруцеллезная инфекция у свиней:

- i) Учитывая отсутствие международной стандартной сыворотки для бруцеллеза свиней, метод подлежит соответствующей валидации с установлением точек раздела для исследуемой популяции соответствующими методами валидации (см. Главу 1.1.6).

Методы НИФА, в которых в качестве антигена используют S-ЛПС или О-специфический полисахарид, обладают высокой чувствительностью для обнаружения антител к бруцеллам у КРС, мелких жвачных животных и свиней, но не способны полностью решить проблему дифференциации противоифекционных антител от антител в ответ на вакцинацию штаммом S19 *B. abortus* или Rev.1 *B. melitensis*. Поствакцинальные антитела после иммунизации RB51 *B. abortus* также могут интерферировать с противоифекционными антителами в НИФА на основе S-ЛПС.

Как и в случае с ВВАТ и СФТ, положительные результаты необходимо подтверждать с помощью подходящих подтверждающих или дополнительных тестов.

Диагностическая чувствительность метода НИФА, стандартизированного с описанной выше стандартной сывороткой МЭБ, не уступает или превосходит таковую ВВАТ (РВТ/ВРАТ) или СФТ при исследовании инфицированного КРС, мелких жвачных и свиней. Однако специфичность данного метода, как правило, будет ниже (Praud et al., 2012).

Проблему ложноположительных серологических реакций можно частично решить (в частности, для исследования сывороток крови свиней) путем проведения НИФА с использованием в качестве антигена экстрактов шероховатых штаммов бруцелл. Большинство ложноположительных серологических реакций – это результат перекрестной реакции с ОПС частью молекулы S-ЛПС, при этом перекрестная реакция между эпитопами коровых антигенов возникает реже. Применение хаотропных НИФА или методов с использованием в качестве антигенов гетерологичных экстрактов или цитозольных белков бруцелл не позволяет решить данную проблему, по крайней мере, в случае с КРС (Muñoz et al., 2005). Кроме того, в контексте ложноположительных реакций самым специфичным диагностическим методом остается кожный тест с бруцеллином (см. Раздел В.3.1 ниже).

Использование меченных ферментами моноклональных или поликлональных антиглобулинов, гликопротеина или антиглобулинов возможно в зависимости от их наличия и требований к эффективности. Моноклональные антитела, специфичные для тяжелой цепи бычьего IgG<sub>1</sub>, могут немного повысить специфичность теста за счет некоторой потери чувствительности, в то время как белок G или антиглобулин-ферментные конъюгаты могут стать полезным реактивом для тестирования различных видов млекопитающих.

В продаже имеется несколько коммерческих наборов для НИФА. Одни протоколы обладают более низкой чувствительностью или специфичностью, чем другие, поэтому результаты, полученные с применением разных методов не всегда сопоставимы. Метод НИФА для обнаружения противобруцеллезных антител у мелких жвачных и свиней, в целом, совпадает с методом, описанным для КРС, но требует установления точек раздела с помощью соответствующих методов валидации (см. Главу 1.1.6).

Кроме того, метод нИФА для овец и коз подлежит стандартизации с ISaBmS (McGiven et al., 2011).

Вне зависимости от используемого формата нИФА:

- i) В каждый планшет включают положительный и отрицательный контроли. Определяют диапазон ОП (оптической плотности) для этих двух контролей с целью установки критериев для валидации результатов по каждому планшету. ОП для положительного контроля – это показатель, с которым сравнивают ОП каждой исследуемой сыворотки для определения конечного результата (отрицательный или положительный).
- ii) В каждый планшет включают дополнительную положительную сыворотку (внутренний контроль) для валидации воспроизводимости теста на любом планшете и в любой день.

## 2.5.2. Конкурентный ИФА

Описано несколько вариантов кИФА с S-ЛПС или ОПС в качестве антигенов для применения у КРС, мелких жвачных и свиней с использованием различных антиглобулинов, меченных ферментном, субстратов или хромогенов и антигенов, полученных из различных гладких штаммов бруцелл. Тем не менее, используемый метод и интерпретация результатов требуют валидации в соответствии с принципами, изложенными в Главе 1.1.6.

### 2.5.2.1. Стандартизация кИФА (ЕС, 2008; McGiven et al., 2011)

#### 2.5.2.1.1. Бруцеллезная инфекция у КРС:

- i) Предварительное разведение OIEELISA<sub>wpSS</sub> 1/2 или предварительное разведение OIEELISA<sub>spSS</sub> 1/16 в отрицательной телячьей сыворотке (или в отрицательном пуле телячьих сывороток) должны давать положительную реакцию;
- и
- ii) Предварительное разведение OIEELISA<sub>wpSS</sub> 1/8 или предварительное разведение OIEELISA<sub>spSS</sub> 1/64 в отрицательной телячьей сыворотке (или в отрицательном пуле телячьих сывороток) должны давать отрицательную реакцию;
- и
- iii) OIEELISA<sub>nSS</sub> всегда должна давать отрицательную реакцию.

#### 2.5.2.1.2. Бруцеллезная инфекция у овец и коз:

- i) Предварительное разведение ISaBmS 1/8 в отрицательной козьей сыворотке (или в отрицательном пуле козьих сывороток) должно давать положительную реакцию;
- и
- ii) Предварительное разведение ISaBmS 1/300 в отрицательной козьей сыворотке (или в отрицательном пуле козьих сывороток) должно давать отрицательную реакцию;
- и
- iii) Вышеуказанная отрицательная козья сыворотка (или отрицательный пул козьих сывороток) всегда должна показывать отрицательную реакцию.

### 2.5.2.1.3. Бруцеллезная инфекция у свиней:

- i) Учитывая отсутствие международной стандартной сыворотки для бруцеллеза свиней, метод подлежит соответствующей валидации с установлением точек раздела для исследуемой популяции соответствующими методами валидации (см. Главу 1.1.6).

Доказано, что конкурентный ИФА (кИФА) с использованием моноклональных антител, специфичных к одному из эпитопов О-специфического полисахарида *Brucella* sp., как правило (но не во всех случаях) обладает более высокой специфичностью, но более низкой чувствительностью по сравнению с ВВАТ или нИФА, при тестировании КРС, овец и свиней (Muñoz et al., 2005; 2012; Nielsen et al., 1995; Praud et al., 2012; Stack et al., 1999).

Однако было показано, что кИФА позволяет устранить некоторые, но не все ложноположительные реакции, связанные с присутствием перекрестно реагирующих бактерий у КРС (Muñoz et al., 2005) и у свиней (Praud et al., 2012). В некоторых случаях, в частности, у жвачных и свиней, ложноположительные реакции могут возникать в кИФА, но не наблюдаться в других тестах на основе S-ЛПС, включая нИФА. Кроме того, кИФА снижает, но не полностью исключает реакции, связанные с антителами, индуцированными в ответ на вакцинацию.

С большой долей вероятности можно утверждать, что повышение специфичности происходит, преимущественно, за счет снижения чувствительности кИФА по сравнению с ВВАТ и нИФА, поэтому, как и в случае с ВВАТ, СФТ и нИФА, положительные результаты кИФА необходимо подтверждать с помощью подходящих подтверждающих или дополнительных тестов.

От выбора моноклонального антитела и его более или менее высокой и уникальной специфичности и аффинности будут зависеть показатели диагностической эффективности анализа. Как и в случае с любым тестом на основе моноклональных антител, в целях признания на международном уровне и широкого применения следует учитывать повсеместную доступность моноклонального антитела или гибридомы.

В продаже имеется несколько коммерческих наборов для кИФА. Одни протоколы обладают более низкой чувствительностью или специфичностью, чем другие, поэтому результаты, полученные с применением разных методов не всегда сопоставимы. Метод кИФА для обнаружения противобруцеллезных антител у мелких жвачных и свиней, в целом, совпадает с методом, описанным для КРС, но требует установления точек раздела с помощью соответствующих методов валидации (см. Главу 1.1.6). Кроме того, метод кИФА для овец и коз подлежит стандартизации с ISaVMS (McGiven et al., 2011).

Вне зависимости от используемого формата кИФА:

- i) В каждый планшет включают положительный и отрицательный контроли. Определяют диапазон ОП (оптической плотности) для этих двух контролей с целью установки критериев для валидации результатов по каждому планшету. ОП для положительного контроля – это показатель, с которым сравнивают ОП каждой исследуемой сыворотки для определения конечного результата (отрицательный или положительный).

- ii) В каждый планшет включают дополнительную положительную сыворотку (внутренний контроль) для валидации воспроизводимости теста на любом планшете и в любой день.

## 2.6. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (FPA)

FPA является простым способом для оценки взаимодействия антиген/антитело. Это гомогенная аналитическая реакция, не требующая разделения аналитов, и, следовательно, очень быстрая. Однако в отличие от других гомогенных реакций (например, RBT) перед добавлением антигена для каждого образца необходимо проводить корректировку сигнала по бланковому/фоновому раствору. Анализ проводят в два этапа.

Для диагностики бруцеллеза в качестве антигена используют фрагмент с низкой молекулярной массой (в среднем, 22 кДа) O-специфического полисахарида S-ЛПС штамма 1119-3 *B. abortus*, меченный флуоресцеина изотиоцианатом (FITC). После учета сигнала бланкового/фоновых растворов (2-3 минуты) данный антиген вносят в разведенную сыворотку, и примерно через 2 минуты после добавления антигена измеряют уровень антител с помощью анализатора поляризации флуоресценции (Nielsen et al., 1996).

### 2.6.1. Подготовка антигена (пример)

O-специфический полисахарид липополисахарида гладкого штамма S1119-35 *B. abortus* массой 5 г (сухого вещества) или 50 г (сырого вещества) готовят путем добавления 400 мл 2% (в весовом отношении) уксусной кислоты с последующим автоклавированием суспензии в течение 15 минут при 121°C и удалением клеточного остатка центрифугированием в течение 10 минут при 10 000 g при температуре 5°C ± 3°C. Затем раствор супернатанта обрабатывают 20 г трихлоруксусной кислоты для осаждения всех белков и нуклеиновых кислот. Преципитат снова удаляют центрифугированием при 10 000 g в течение 10 минут при 5°C ± 3°C. Надосадочную жидкость подвергают диализу с использованием не менее 100 объемов очищенной воды, а затем лиофилизируют; 3 мг O-специфического полисахарида растворяют в 0,6 мл 0,1 моль натрия гидроксида (4 г NaOH/литр) и инкубируют при 37°C ± 2°C в течение часа с последующим добавлением 0,3 мл изомера 1 FITC в концентрации 100 мг/мл в диметилсульфоксиде, а затем снова инкубируют при 37°C ± 2°C в течение 1 часа. FITC-меченный ОПС переносят в колонку 1 × 10 см, заполненную ДЭАЭ (диэтиламиноэтил) Sephadex A 25, уравновешенным в 0,01 моль фосфатного буфера, pH 7,4 ± 0,2. Первая фракция (после 10-15 мл буфера) будет ярко-зеленого цвета, после чего буфер меняют на 0,1 моль фосфата, pH 7,4 ± 0,2. В результате 10-15 мл буфера элюируют с последующим образованием 25-40 мл флуоресцентного материала зеленого цвета. Этот материал и представляет собой антиген для FPA. Препарат антигена можно пропорционально увеличить.

Объем антигена, необходимый для теста, определяют путем разведения материала, описанного выше, до достижения в анализаторе поляризационной флуоресценции общей интенсивности флуоресценции равной 250 000-300 000.

Антиген можно хранить в жидком виде несколько лет при 5°C ± 3°C во флаконе темного цвета или в лиофилизованном виде во флаконах темного цвета. Меченый антиген в ограниченном количестве также можно приобрести в свободной продаже.

### 2.6.2. Стандартизация метода FPA (ЕС, 2008; McGiven et al., 2011)

### **2.6.2.1. Бруцеллезная инфекция у КРС**

- i) OIEELISA<sub>WPSS</sub> и OIEELISA<sub>SPSS</sub> неизменно должны давать положительную реакцию;
- и
- ii) Предварительное разведение OIEELISA<sub>WPSS</sub> 1/8 или предварительное разведение OIEELISA<sub>SPSS</sub> 1/64 в отрицательной телячьей сыворотке (или в отрицательном пуле телячьих сывороток) должно давать отрицательную реакцию;
- и
- iii) OIEELISA<sub>NSS</sub> всегда должна давать отрицательную реакцию.

### **2.6.2.2. Бруцеллезная инфекция гладкими штаммами у овец и коз**

- i) Предварительное разведение ISaBmS 1/16 в отрицательной козьей сыворотке (или в отрицательном пуле козьих сывороток) должно давать положительную реакцию;
- и
- ii) Предварительное разведение ISaBmS 1/200 в отрицательной козьей сыворотке (или в отрицательном пуле козьих сывороток) должно давать отрицательную реакцию;
- и
- iii) Вышеуказанная отрицательная козья сыворотка (или отрицательный пул козьих сывороток) всегда должна показывать отрицательную реакцию.

### **2.6.2.3. Бруцеллезная инфекция у свиней**

- i) Учитывая отсутствие международной стандартной сыворотки для бруцеллеза свиней, метод подлежит соответствующей валидации с установлением точек раздела для исследуемой популяции соответствующими методами валидации (см. Главу 1.1.6).

Диагностическая чувствительность и специфичность FPA для диагностики бруцеллеза КРС практически не уступает чувствительности и специфичности КИФА. Метод FPA для обнаружения противобруцеллезный антител у мелких жвачных животных и свиней практически не отличается от такового для КРС, но требует установления точек раздела для данных видов животных с помощью соответствующих методов валидации (см. Главу 1.1.6). Кроме того, метод FPA подлежит стандартизации с соответствующими международными стандартными сыворотками, указанными выше.

FPA позволяет снизить, но не полностью устранить реакции, связанные с присутствием остаточных поствакцинальных антител (Nielsen et al., 1996). Кроме того, пока не установлена специфичность FPA в условиях ложноположительных реакций у КРС и мелких жвачных животных, но было четко показано, что FPA не позволяет полностью решить проблему ложноположительных реакций у свиней (Praud et al., 2012).

Как и в случае с другими серологическими тестами, положительные результаты в FPA требуют подтверждения подходящими подтверждающими и/или дополнительными методами.

### **2.6.3. Процедура тестирования (Nielsen et al., 1996)**

FPA можно проводить в стеклянных пробирках или на 96-луночных планшетах.

Сыворотки КРС разводят 1/10 (для планшета) или 1/100 (для пробирки).

Сыворотки овец или коз, а также сыворотки свиней разводят 1/10 для планшета и 1/25 (козья и свиная сыворотка) и 1/40 (овечья сыворотка) для пробирки.

В качестве разбавителя используют 0,01 моль трис буфера (1,21 г), содержащего 0,15 хлорида натрия (8,5 г), 0,05% Igepal CA630 (500 мкл) (бывший NP40), 10 ммоль EDTA (3,73 г) на литр очищенной воды, pH  $7,2 \pm 0,2$  (трис буфер).

После смешивания в анализаторе поляризации флуоресценции проводят первую реакцию для оценки рассеивания света. Затем добавляют титрованный антиген, меченный соответствующим образом, перемешивают и проводят вторую реакцию примерно через 2 минуты.

Наличие поляризации флуоресценции (в единицах микрополяризации, мП) выше диапазона установленных пороговых значений свидетельствует о положительной реакции.

Типичный диапазон пороговых значений – это 90-100 единиц мП, однако, данный метод требует стандартизации на местном уровне с соответствующей эталонной сывороткой МЭБ (как описано выше) с включением сильно положительной, слабоположительной и отрицательной рабочей стандартной сыворотки (стандартизированной по вышеуказанным эталонным сывороткам МЭБ).

#### **2.6.3.1. Пример для сывороток КРС**

- i) Разбавитель в объеме 1 мл переносят в пробирку из боросиликатного стекла размером  $10 \times 75$  мм и добавляют 10 мкл сыворотки или 20 мкл крови, обработанной EDTA. При проведении теста на 96-луночном планшете 20 мкл сыворотки смешивают с 180 мкл буфера. Тщательное перемешивание очень важно. Рассеяние света оценивают в анализаторе поляризации флуоресценции.
- ii) Затем в пробирку добавляют тот объем антигена, при котором общая интенсивность поляризации достигает  $250-300 \times 10^3$ , и тщательно перемешивают. Для разных серий этот объем может варьировать, но, как правило, он составляет примерно 10 мкл. После инкубирования смеси при комнатной температуре ( $22^\circ\text{C} \pm 4^\circ\text{C}$ ) в течение примерно 2 минут (сыворотка) и 15 секунд (кровь, обработанная EDTA) проводят вторую реакцию в анализаторе.
- iii) Наличие поляризации выше установленного диапазона пороговых значений свидетельствует о положительной реакции.

### **2.7. Реакция сывороточной агглютинации (SAT) (только для КРС)**

В течение многих лет SAT успешно используют в программах надзора и контроля бруцеллеза КРС, особенно, в северной Европе. Специфичность этого теста значительно повышается при добавлении EDTA к антигену (McMillan & Cockrem, 1985).

Антиген представляет собой бактериальную суспензию штамма 99 *B. abortus* или штамма 1119-3 *B. abortus* в фенольном растворе (NaCl 0,85% [в отношении массы к объему] и фенол в концентрации 0,5% [в объемном отношении]). Формальдегид использовать нельзя. Антигены доставляют в концентрированном виде с указанием необходимого фактора разведения на этикетке флакона. К суспензии антигена, разведенного до конечного разведения 5 ммоль, можно добавить EDTA

для снижения количества ложноположительных результатов. После этого рН суспензии антигена снова доводят до  $7,2 \pm 0,2$ .

OIEISS содержит 1000 МЕ агглютинации. Антиген готовят без учета клеточной концентрации, однако, его чувствительность необходимо стандартизировать относительно OIEISS таким образом, чтобы антиген давал либо 50% агглютинации с конечным разведением сыворотки от 1/600 до 1/1000 или 75% агглютинации с конечным разведением сыворотки от 1/500 до 1/750. Также рекомендуется сравнить реактивность новых и ранее стандартизированных серий антигена с использованием панели определенных сывороток.

Тест проводят либо в пробирках, либо на микропланшетах. Смесь антигена и разведенной сыворотки инкубируют в течение 16-24 часов при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Если тест проводят на микропланшетах, время инкубирования можно сократить до 6 часов. Для каждой сыворотки следует приготовить, как минимум, три разведения с целью опровержения эффекта прозоны. Разведения сыворотки от животного с подозрением на инфекцию следует делать таким образом, чтобы учет результатов реакции при ограничении положительного результата происходил в средней пробирке (или лунке в случае использования микропланшетов).

*Интерпретация результатов:* Степень агглютинации бруцелл в сыворотке выражают в МЕ на мл. Сыворотка, содержащая 30 и более МЕ на мл, считается положительной.

## **2.8. Пробы с использованием нативного гаптена и на основе белка цитозоли (только для жвачных животных)**

Тесты с использованием нативного гаптена<sup>6</sup> обладают высокой специфичностью в контексте вакцинации штаммом S19 *B. abortus* и успешно применялись в сочетании с роз-бенгал тестом в качестве скринингового метода. Оптимальной чувствительности (сопоставимой с чувствительностью CFT, но существенно уступающей RBT и ИИФА на основе S-ЛПС) можно добиться в системе обратной радиальной иммунодиффузии, в которой сыворотка диффундирует в гипертонический гель, содержащий полисахарид, хотя процедура двойной диффузии в гель также может быть полезной (Muñoz et al., 2005). Телята, вакцинированные в 3-5-месячном возрасте стандартной дозой S19 *B. abortus* подкожно, как правило, остаются отрицательными в течение 2 месяцев после вакцинации, а у взрослых животных, вакцинированных подкожно 4-5 месяцев назад сниженной дозой S19 *B. abortus*, положительная реакция должна отсутствовать, если только не произошло инфицирование, в результате которого вакцинный штамм начал проникать в молоко. Вакцинация в конъюнктиву (и у телят, и у взрослых) значительно сокращает период, в течение которого реакция с использованием нативного гаптена будет отрицательной. Характерной чертой реакции с использованием нативного гаптена является то, что положительный результат совпадает с периодом выделения бруцелл в среду, что продемонстрировано у скота, инфицированного экспериментальным и естественным путем (Jones et al., 1980). В тех случаях, когда ложноположительные результаты серологических тестов у КРС связаны с интерференцией с *Yersinia enterocolitica* O:9 или возникают по неустановленным причинам, реакции преципитации в агаровом геле с использованием нативного гаптена или белков цитозоли бруцелл, как правило, показывают отрицательный результат (Muñoz et al., 2005).

---

<sup>6</sup> С подробным описанием процедуры можно ознакомиться в Лаборатории по изучению бруцеллеза, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria / Gobierno de Aragón, Avenida Montañana 930, 50059, Saragoca, Испания.

Такие методы с использованием нативного гаптена также подходят для исследований образцов от овец и коз, поскольку они с высокой степенью специфичности позволяют дифференцировать серологический ответ инфицированного (положительного) животного от реакции у животных, вакцинированных Rev.1 *B. melitensis* (обычно отрицательных в течение определенного периода времени после вакцинации). Оптимальную диагностическую чувствительность (около 90%) обеспечивают методы двойной диффузии в гель или радиальной иммунодиффузии для овец и коз, соответственно.

## **2.9. Реакции в молоке**

Эффективными способами скрининга молочных стад является исследование сборного молока из цистерны. При получении положительного результата, у всех коров, молоко которых поступило в данную цистерну, следует взять пробы крови на анализ. ИИФА для молока является чувствительным и специфичным тестом, который великолепно подходит для проверки крупных стад. Кольцевая реакция с молоком считается подходящей альтернативой в случае отсутствия ИИФА, хотя данный метод не подходит для исследования молока от мелких жвачных.

### **2.9.1. ИИФА на молоке (только КРС и овцы и козы)**

Как и в случае с ИИФА в сыворотке, существует большое количество вариантов ИИФА в молоке. В продаже имеется несколько наборов для ИИФА, которые прошли валидацию в обширных полевых испытаниях и получили широкое распространение в настоящее время. В интересах гармонизации на международном уровне национальные референтные лаборатории должны использовать три стандартных сыворотки МЭБ для ИФА для проверки или стандартизации определенного метода с целью применения у КРС.

#### **2.9.1.1. Стандартизация теста ИИФА в молоке для молочного КРС**

Метод ИИФА для КРС нужно стандартизировать таким образом, чтобы сильно положительная стандартная сыворотка МЭБ для ИФА, разведенная 1/125 в отрицательной сыворотке с последующим разведением 1/10 в отрицательном молоке, неизменно давала положительный результат (ЕС, 2008).

Образцы сборного молока обычно тестируют в значительно более низких разведениях, чем сыворотки, то есть без разведения или в разведении 1/2 - 1/10 в буфере для разведения, при этом остальную часть анализа проводят так же, как это описано для сыворотки.

При проведении ИИФА в молоке возможно получение ложноположительных реакций, хотя это происходит реже, чем в случае с анализами крови.

Метод ИИФА для обнаружения противобруцеллезных антител в овечьем или козьем молоке, в целом, не отличается от метода ИИФА для КРС, но требует установления точек раздела с помощью соответствующих методов валидации (см. Главу 1.1.6). Международные рекомендации по стандартизации ИИФА в молоке с использованием соответствующей ISaVmS отсутствуют.

### **2.9.2. Кольцевая реакция с молоком (только для КРС)**

Для скрининга стад КРС на бруцеллез можно применять кольцевую реакцию с молоком у лактирующих животных.

В крупных стадах (> 100 лактирующих коров) чувствительность теста становится менее надежной. Кольцевую реакцию можно скорректировать для компенсации фактора разведения образцов сборного молока от крупных стад. Образцы корректируют по следующей формуле: размер стада < 150 животных – использовать 1 мл сборного молока, 150-450 животных – 2 мл молока, 451-700 животных – 3 мл молока.

Ложноположительные реакции могут встречаться среди КРС, вакцинированного менее чем за 4 месяца до исследования, в пробах, содержащих нестандартное молоко (например, молозиво) или у животных с маститом. Поэтому данный тест не рекомендуется использовать в очень маленьких хозяйствах, где эти проблемы могут сильно повлиять на результаты исследования.

### 2.9.2.1. Получение антигена

Антиген для кольцевой реакции в молоке (MRT) готовят из концентрированной суспензии инактивированных клеток S99 или S1119-3 *B. abortus*, выращенных как описано ранее. Суспензию центрифугируют со скоростью, например, 23 000 g в течение 10 минут при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  с последующим ресуспендированием в растворе гематоксилина. Удовлетворительных результатов можно получить с помощью различных методов, например: 100 мл 4% (в отношении массы к объему) гематоксилина (каталожный № 75290), растворенного в 95% этаноле, добавляют в раствор алюминиево-аммониевых квасцов (5 г) в 100 мл очищенной воды и 48 мл глицерина. К раствору добавляют 2 мл свежеприготовленного 10% (в отношении массы к объему) натрия йодата. После инкубирования в течение 30 минут при комнатной температуре ( $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ) раствор темно-пурпурного цвета переносят в 940 мл 10% (в отношении массы к объему) раствора алюминиево-аммониевых квасцов в очищенной воде. pH данной смеси доводят до  $3,1 \pm 0,2$ , и раствор выдерживают при комнатной температуре в темном месте в течение 45-90 суток.

Перед использованием окрашивающий раствор встряхивают и фильтруют через вату. Осажденные клетки суспендируют в окрашивающем растворе в соотношении 1 г на 30 мл красителя и хранят при комнатной температуре ( $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ) в течение 48 часов (некоторые лаборатории вместо этого предпочитают нагревать до  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут). Окрашенные клетки затем осаждают центрифугированием и трижды промывают в растворе натрия хлорида (6,4 г), 84% молочной кислоты (1,5 мл) и 10% натрия гидроксида (4,4 мл) в 1,6 литра очищенной воды, конечная pH  $3,0 \pm 0,2$ . Отмытые клетки ресуспендируют в соотношении 1 г в 27 мл разбавителя, содержащего 0,5% фенольного раствора с показателем pH, доведенным до  $4,0 \pm 0,2$  путем прибавления 0,1 моль лимонной кислоты (приблизительно 2,5 мл) и 0,5 моль вторичного кислого фосфата натрия (приблизительно 1 мл), и выдерживают в течение 24 часов при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Смесь фильтруют через вату, проверяют pH, определяют объем осажденных клеток и доводят приблизительно до 4%.

### 2.9.2.2. Стандартизация антигена

Антиген необходимо стандартизировать с использованием OIEISS таким образом, что разведение 1/500 давало положительный результат, а разведение 1/1000 – отрицательный. Чувствительность новой серии также сравнивают с таковой ранее стандартизированной серии с

использованием панели образцов с разной степенью реакции, приготовленных путем разведения положительной сыворотки в молоке.

Антиген следует хранить при условиях, указанных производителем: как правило, при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Показатель рН антигена должен составлять  $3,5 (\pm 0,2)$ , а цвет – темно-синий. Допускается присутствие небольшого количества несвязанного красителя в супернатанте центрифугированного образца. При разведении в молоке от животного, не инфицированного бруцеллезом, антиген должен вызывать однородное окрашивание молочного слоя без осадка при отсутствии окрашивания слоя сливок.

### 2.9.2.3. Процедура тестирования

Тест проводят на образцах сборного молока. При необходимости, до использования пробы можно предварительно обработать консервантом (0,1% формалин или 0,02% бронепоп) в течение 2-3 дней при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

- i) Температуру проб молока и антигена доводят до комнатной ( $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ); из холодильника можно доставать только то количество антигена, которое необходимо для проведения тестов в течение дня.
- ii) Флакон с антигеном осторожно встряхивают.
- iii) Реакцию проводят путем добавления 30-50 мкл антигена к 1-2 мл цельного молока (в случае с образцами сборного молока от более крупного стада объем молока можно увеличить – см выше).
- iv) Уровень молока в пробирке должен быть не менее 25 мм. Пробы молока нельзя замораживать, нагревать, резко встряхивать или хранить более 72 часов.
- v) Смеси молока/антигена обычно инкубируют при  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа вместе с положительными и отрицательными рабочими стандартными образцами. Однако инкубирование при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  в течение ночи повышает чувствительность теста и упрощает учет результатов реакции.
- vi) Сильно положительная реакция проявляется образованием темно-синего кольца выше столбика белого молока. Любой синий слой на поверхности молока и сливок следует считать положительной реакцией, поскольку он может иметь значимость, особенно для крупных стад.
- vii) Тест считается отрицательным, если цвет находящегося снизу молока оказывается более ярким, чем цвет слоя сливок.
- viii) Если кольцевую реакцию с молоком корректируют для крупных стад (используют 2 или 3 мл молока), в пробирку для теста вносят 0,1 мл пула отрицательных сливок, а затем 30-50 мкл антигена для кольцевой реакции. После смешивания компоненты инкубируют, а результаты учитывают так же, как для нескорректированной реакции. Пул отрицательных сливок собирают путем сепарирования от составного непастеризованного молока от отрицательного по бруцеллезу стада численностью 25 или более коров.

## 2.10. Серологические тесты для диких животных

Серологические исследования у диких животных обычно проводят с целью скрининга. В данных обстоятельствах важнейшее значение имеет адекватная специфичность метода. Роз-бенгал тест рекомендован в качестве универсального диагностического теста для всех видов диких животных. Реакция связывания комплемента могла бы тоже считаться универсальным методом, если бы выбор температуры инактивации комплемента и титров для точки отсечения был надлежащим образом задокументирован для всех видов диких животных. Для обоих тестов образцы сыворотки должны быть высокого качества, что нелегко обеспечить в исследованиях в дикой природе. В случае исследования образцов сыворотки низкого качества в роз-бенгал тесте или в реакции связывания комплемента результаты, как правило, невозможно интерпретировать. Непрямой или конкурентный варианты ИФА, по-видимому, больше подходят для эпизоотологических исследований среди диких животных по данным серологического скрининга, поскольку они более надежны, чем RBT и CFT, и позволяют использовать сыворотку низкого качества или гемолизированную сыворотку (Stack et al., 1999). Еще одним преимуществом методов ИФА считается возможность использования для теста образцов мясного сока при отсутствии сыворотки. Особое внимание следует обратить на конъюгат, используемый в нИФА, который должен обладать удовлетворительной аффинностью для соответствующих изоформ антител исследуемых диких животных. В то же время, интерпретация результатов ИФА у диких животных представляет определенные трудности в связи с отсутствием валидационных исследований. При каждой возможности необходимо устанавливать точку отсечения для ИФА для каждого конкретного вида животного с применением соответствующих методов валидации (см. Главу 1.1.6). Тем не менее, при выявлении положительных или сомнительных результатов серологических тестов следует, по возможности, провести бактериологическое исследование с целью уточнения диагноза.

### 3. Тесты для определения клеточного иммунитета

#### 3.1. Кожная проба с бруцеллином

Альтернативным иммунологическим тестом является кожная проба с бруцеллином, которую можно использовать для скрининга невакцинированных стад, при условии применения очищенного (свободного от S-ЛПС) и стандартизированного антигена. Кожные пробы с бруцеллином обладают высокой специфичностью, позволяющей считать серонегативных невакцинированных животных с положительной реакцией на кожную пробу с бруцеллином инфицированными (Pouillot et al., 1997). Кожная проба с бруцеллином также обладает высокой чувствительностью для диагностики заражения *B. melitensis* у мелких жвачных и, при условии что вакцинацию не проводили, считается одним из самых специфичных диагностических методов.

Бруцеллин был разработан для применения у мелких жвачных, однако, он также эффективен для подтверждения инфекции у свиней на уровне стада. Полевые испытания продемонстрировали хорошую чувствительность метода у свиней, инфицированных *Brucella* (Dieste-Pérez et al., 2014). Так же, результаты этого теста могут помочь в интерпретации серологических реакций, считающихся ложноположительными из-за заражения перекрестно-реагирующими бактериями, поскольку животные с ложноположительными результатами серологических тестов всегда показывают отрицательные результаты в кожной пробе (Dieste-Pérez et al., 2014; Pouillot et al., 1997).

Животные, вакцинированные Rev.1 *B. melitensis*, S19 или RB51 *B. abortus*, могут годами показывать положительные результаты в этом тесте (Pouillot et al., 1997; De Massis et al., 2005), поэтому данный метод не подходит в качестве единственного диагностического теста или для целей международной торговли в

регионах, в которых практикуют иммунизацию против бруцеллеза. Кроме того, не у всех зараженных животных наблюдается реакция, поэтому кожную пробу с бруцеллином нельзя рекомендовать в качестве единственного диагностического теста или для целей международной торговли, хотя благодаря своей высокой специфичности и достаточной чувствительности на уровне стада он подходит для целей надзора в регионах, свободных от бруцеллеза.

Обязательно следует использовать стандартизированный, хорошо изученный препарат бруцеллина, очищенный от гладкого липополисахарида, поскольку последний может вызывать неспецифические воспалительные реакции или интерференцию в серологических тестах. Одним из таких препаратов является имеющийся в продаже бруцеллин INRA, приготовленный из шероховатого штамма *B. melitensis* (штамм B115), однако, в ближайшем будущем возможно появление подходящих альтернативных препаратов из шероховатых мутантов бруцелл (Dieste-Pérez et al., 2014).

Хотя кожная проба с бруцеллином является, вероятно, самым специфичным непрямым анализом на бруцеллез (у невакцинированных животных), окончательный диагноз можно поставить только на основании выявления положительных результатов у нескольких животных в стаде с обязательным подтверждением с помощью дополнительного диагностического теста. У некоторых видов животных внутрикожное введение бруцеллина вызывает временную анаergieю клеточно-опосредованного иммунного ответа (Blasco et al., 1994b), поэтому две кожные пробы одному и тому же животному ставят с интервалом не менее 6 недель.

### **3.1.1. Процедура тестирования**

#### **3.1.1.1. Бруцеллезная инфекция у КРС**

- i) Бруцеллин (2000 единиц/мл) в объеме 0,1 мл вводят внутрикожно в хвостовую складку, кожу на боку, или в боковую часть шеи животного.
- ii) Реакцию учитывают через 48-72 часа.
- iii) Толщину кожи в месте инъекции измеряют штангенциркулем со шкалой-нониусом до инъекции и при повторном обследовании.
- iv) Сильно положительную реакцию легко узнать по отеку и уплотнению. Однако в сомнительных случаях следует отнестись к интерпретации более внимательно. Утолщение кожи на 1,5-2 мм считают положительной реакцией.

#### **3.1.1.2. Бруцеллезная инфекция у овец и коз**

- i) Бруцеллин (2000 единиц/мл) в объеме 0,1 мл вводят внутрикожно в нижнее веко животного.
- ii) Реакцию учитывают через 48 часов.
- iii) Видимая или очевидная на ощупь реакция гиперчувствительности в виде отека, при котором наблюдается отечность кожи или утолщение века ( $\geq 2$  мм), указывает на положительный результат теста.

#### **3.1.1.3. Бруцеллезная инфекция у свиней**

В качестве диагностического агента свиньям вводят суспензию аллергена (2000 единиц/мл) в объеме 0,1 мл. Инъекцию вводят внутрикожно в кожу в основании уха или, предпочтительно, рядом с основанием хвоста. Последний вариант более практичен и менее опасен. Реакцию учитывают визуально или на ощупь через 48 часов; положительная реакция характеризуется покраснением

непигментированного участка кожи и отеком. В некоторых случаях возможно присутствие кровоизлияний/некроза.

### 3.2. Тест с индукцией гамма-интерферона

Тест с индукцией интерферона-гамма основан на стимуляции лимфоцитов в цельной крови подходящим антигеном, например, бруцеллином. Продукцию индуцированного гамма-интерферона (INF- $\gamma$ ) измеряют методом ИФА с захватом. Этот тест может быть полезным для дифференциации ложноположительных результатов серологических тестов, однако, необходимы более специфичные антигены, а также стандартизация и валидация протоколов у разных видов животных и в разных эпизоотологических условиях. На данный момент не существует полностью валидированного протокола.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОПРЕПАРАТАМ

### 1. Вакцины

Как упоминалось ранее, бруцеллез – одна из самых заразных лабораторных инфекций, требующая соблюдения строгих мер предосторожности. Лабораторные манипуляции с живыми культурами бруцелл, включая вакцинные штаммы, опасны и должны проводиться в соответствующих условиях биобезопасности и биозащиты, уровень которых определяют по результатам анализа риска (см. Главу 1.1.4). Вакцины на основе S19, RB51 и Rev.1 обладают некоторой степенью вирулентности для человека, поэтому на этикетке контейнера готового препарата следует указывать предупреждение об опасности. В случае случайного самовведения или воздействия необходимо срочно обратиться к врачу (см. Раздел С.1.2.3.2.3 Меры предосторожности) (Ashford et al., 2004; Совместный экспертный комитет FAO/МЭБ по бруцеллезу, 1986; USDA, 2003).

#### 1.1. Основная информация

##### 1.1.1. Вакцина на основе штамма 19 *Brucella abortus*

Наиболее широко распространенной вакциной для профилактики бруцеллеза у КРС является вакцина на основе штамма S19 *Brucella abortus*, которая также считается эталонным препаратом, с которым обязательно сравнивают все остальные вакцины. Это живая вакцина, которую обычно вводят телятам женского пола в возрасте от 3 до 6 месяцев в виде однократной подкожной инъекции в дозе  $5-8 \times 10^{10}$  жизнеспособных микроорганизмов. Сниженную дозу от  $3 \times 10^8$  до  $3 \times 10^9$  микроорганизмов можно вводить подкожно взрослым особям, однако, у некоторых животных возможна выработка персистирующих титров антител; такие животные могут абортить и выделять вакцинный штамм с молоком. С другой стороны, вакцину можно вводить КРС в любом возрасте одной или двумя дозами, содержащими  $5-10 \times 10^9$  жизнеспособных микроорганизмов, через конъюнктиву. Вакцинация обеспечивает защиту против *B. abortus* (Nicoletti et al., 1978) и *B. melitensis* (Jiménez de Bagües et al., 1991) без выработки персистирующих антител и снижает риск абортов и выделения возбудителя с молоком у вакцинированного взрослого КРС.

Вакцина S19 *Brucella abortus* индуцирует хороший иммунитет против контрольного заражения вирулентными организмами *B. abortus* или *B. melitensis* в умеренных дозах. Вакцина должна быть произведена из посевного материала, предоставляемого Департаментом сельского хозяйства США (адрес см. в сноске 4), и каждая серия подлежит проверке на чистоту (отсутствие посторонних микроорганизмов), жизнеспособность (количество живых бактерий на дозу) и гладкость (определение фазы диссоциации). Серии посевного материала для производства вакцины S19

*B. abortus* следует регулярно тестировать на остаточную вирулентность и иммуногенность на мышах.

Процедуры контроля для данной вакцины подробно описан в Разделе С.1.2.2.3 Контроль в процессе производства.

### 1.1.2. Вакцина на основе RB51 *Brucella abortus*

С 1996 года в нескольких странах вакцина на основе штамма RB51 *Brucella abortus* стала официальной вакциной для профилактики бруцеллеза у КРС. Однако все еще существуют сомнения относительно степени защитного эффекта вакцины на основе штамма RB51 по сравнению с защитой, обеспечиваемой вакциной на основе штамма S19, у КРС (Moriyón et al., 2004). Способы введения этой вакцины в разных странах немного отличаются. В США (в стране, почти свободной от бруцеллеза КРС до введения вакцинации RB51) телят вакцинируют подкожно в возрасте от 4 до 12 месяцев дозой  $1-3,4 \times 10^{10}$  жизнеспособных микроорганизмов. Вакцинацию скота в возрасте старше 12 месяцев проводят только с разрешения органов охраны здоровья животных на уровне штата или на федеральном уровне; рекомендованная доза составляет  $1-3 \times 10^9$  жизнеспособных организмов (USDA, 2003). В других странах вводят телятам (в возрасте 4-12 месяцев) вакцинируют в дозе  $1-3,4 \times 10^{10}$  с последующей ревакцинацией в возрасте от 12 месяцев и старше такой же дозой для усиления эффекта вакцинации и повышения иммунитета.

Сообщалось, однако, что внутривенное введение КРС полной дозы вакцины на основе штамма RB51 вызывает у большинства вакцинированных животных тяжелый плацентит и инфекцию плаценты, а у некоторого числа вакцинированных животных так же наблюдается выделение организмов с молоком. Полевой опыт также показывает, что в некоторых случаях применение вакцины у стельных животных ассоциировалось с абортами и повышенной частотой перинатальной смертности. С учетом этих фактов рекомендуется избегать вакцинации беременных животных штаммом RB51 *B. abortus*. Одним из способов уменьшения побочных эффектов RB51 *B. abortus* является снижение дозы. При введении сниженной дозы данной вакцины ( $1 \times 10^9$  колониеобразующих единиц [КОЕ]) стельным животным на поздних сроках беременности не отмечалось поражений плаценты или абортов, однако, значительная часть вакцинированных животных может выделять вакцинный штамм. Тем не менее, такая уменьшенная доза не защищает от *Brucella abortus* в случае вакцинации телят, а в случае вакцинации взрослых особей степень защиты против *B. abortus* считается достаточно умеренной. Уровень защиты, обеспечиваемый вакциной на основе штамма RB51 *B. abortus*, против инфекции *B. melitensis* не установлен.

Процесс контроля для данной вакцины подробно описан в Разделе С.1.2.2.3.

### 1.1.3. Вакцина на основе штамма Rev.1 *Brucella melitensis*

В странах с высокой превалентностью бруцеллеза у мелких жвачных *B. melitensis* также нередко выделяют у КРС (Veget, 1985). По поводу защитной эффективности вакцины S19 *B. abortus* против заражения КРС *B. melitensis* возникали споры, однако, опубликованы данные, свидетельствующие о том, что эта вакцина может защищать КРС от инфекции *B. melitensis*. Предполагается, что в этих условиях вакцина Rev.1 *B. melitensis* будет более эффективной вакциной, чем S19 *B. abortus*, хотя по данному вопросу информации не достаточно (Совместный экспертный

комитет ФАО/МЭБ по бруцеллезу, 1986), и не проводилось экспериментов по оценке эффективности Rev.1 против инфекции *B. melitensis* у коров. Кроме того, безопасность вакцины Rev.1 у КРС практически не изучена, поэтому до тех пор, пока не будет подтверждена безопасность Rev.1 у КРС с различным физиологическим статусом и не будут проведены исследования эффективности против *B. melitensis* в строго контролируемых условиях, данную вакцину нельзя рекомендовать для применения у КРС.

Rev.1 *B. melitensis* – это самая часто используемая вакцина для профилактики бруцеллеза у овец и коз, и даже несмотря на ее недостатки она считается эталонным препаратом, с которым сравнивают все остальные вакцины. В отличие от вакцина Rev.1 вакцина на основе шероховатого штамма RB51 *B. abortus* не эффективна против инфекции *B. melitensis* у овец. Вакцина Rev.1 представляет собой лиофилизированную суспензию живых бактерий *B. melitensis*, штамм Rev.1, и предназначена для иммунизации овец и коз. Вакцину вводят ягнятам и козлятам однократно в 3-5-месячном возрасте в виде подкожной инъекции или конъюнктивальным методом (если вакцина в форме капель), при этом возраст 5 месяцев является максимальным с точки зрения индукции гуморального ответа на вакцинацию, совместимого с будущими серологическими тестами. Вне зависимости от способа введения стандартная доза составляет от  $0,5 \times 10^9$  до  $2,0 \times 10^9$  жизнеспособных микроорганизмов. Уменьшенная доза обеспечивает значительно более низкий уровень защиты, чем стандартная доза, и не рекомендуется для вакцинации овец и коз. Введение вакцины подкожно индуцирует стойкий серологический ответ, активно интерферирующий с ответом, возникающим в ходе серологического исследования, поэтому иммунизация этой вакциной не рекомендуется в рамках комбинированных программ эрадикации. Однако в случае введения стандартной дозы через конъюнктиву вакцина обеспечивает схожий уровень защитного иммунного ответа без выработки персистирующих антител, что не препятствует осуществлению кампаний по эрадикации наряду с применением этой вакцины. В ходе иммунизации вакциной на основе Rev.1 *B. melitensis* следует принимать особые меры предосторожности, чтобы не допустить контаминации окружающей среды или заражения людей. Во многих развивающихся странах и эндемичных регионах наилучшим способом контроля болезни является вакцинация всей популяции (Blasco, 1997). Однако известно, что вакцина Rev.1 может вызывать аборт и выделение микроорганизмов с молоком в случае применения в полной или даже в уменьшенной дозе у суягных животных (Blasco, 1997). Проявление таких побочных эффектов можно существенно снизить путем вакцинации взрослых особей в период суягности, лактации или до спаривания через конъюнктиву (полной дозой). Следовательно, в тех случаях, когда массовая вакцинация – единственный способ контроля заболевания, вакцину Rev.1 рекомендуется вводить в стандартной дозе через конъюнктиву несуюгным животным или животным на поздних сроках суягности или в предслучной сезон (Blasco, 1997).

Подкожная вакцинация молодых особей и иммунизация взрослых животных даже в уменьшенной дозе может привести к стойкой персистенции поствакцинальных антител у большинства животных, вакцинированных Rev.1, что существенно осложняет серологическую диагностику бруцеллеза. Как описано выше, введение вакцины через конъюнктиву позволяет значительно уменьшить эти проблемы (особенно, когда максимальный возраст иммунизации составляет 5 месяцев), поэтому

такой способ введения является методом выбора для комбинированных программ эрадикации. В связи с этим серологическая диагностика бруцеллеза должна осуществляться с учетом вакцинального статуса стада и общей превалентности антител в исследуемой группе животных.

Процедуры контроля для данной вакцины подробно описан в Разделе С.1.2.2.3.

#### **1.1.4. Вакцинация свиней**

Предпринимались попытки разработать подходящую вакцину для иммунизации свиней против *B. suis*, однако, ни одна из этих попыток не закончилась успехом. Всего одна вакцина, на основе штамма 2 *Brucella suis* (S2), продемонстрировала свою эффективность в обширных полевых испытаниях в Китае (Китайская народная республика), хотя данные по эффективности вакцины против инфекции *B. suis* при применении в строго контролируемых условиях отсутствуют. Также сообщалось, что вакцина на основе штамма RB51 *B. abortus* не эффективна для защиты свиней от заражения *B. suis* (Stoffregen et al., 2006).

### **1.2. Описание процесса производства и требований к нему**

#### **1.2.1. Характеристики посевного материала**

##### **1.2.1.1. Биологические характеристики исходного посевного материала**

Исходный посевной материал S19 *Brucella abortus* для производства вакцины получают из USDA (адрес см. в сноске 4) и используют для производства серии посевного материала, который консервируют путем лиофилизации или замораживания при температуре жидкого азота. Свойства данной серии посевного материала должны соответствовать свойствам чистой культуры CO<sub>2</sub>-независимого биовара 1 *Brucella abortus*, чувствительного к бензилпенициллину (3 мкг [5 МЕ]/мл), тионину синему (2 мкг/мл) и эритрололу (1 мкг/мл) и демонстрирующего минимальную патогенность у морских свинок.

Исходный посевной материал RB51 *Brucella abortus* для производства вакцины имеется в продаже. Его также можно получить в USDA (адрес см. в сноске 4). RB51 *Brucella abortus* обладает нормальными свойствами биовара 1 штамма *Brucella abortus*, но на 100% относится к шероховатым формам и не растет в присутствии рифампицина (250 мкг/мл).

Исходный посевной материал штамма Rev.1 *B. melitensis* для производства вакцины имеется в продаже. Европейский эталонный штамм Rev.1, обладающий свойствами исходного посевного материала Rev.1, также можно получить в Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллезу во Франции (адрес см. в сноске 5). Штамм Rev.1 должен соответствовать характеристикам биовара 1 *B. melitensis* за исключением того, что он должен расти медленнее. Кроме того, при инкубировании на воздухе (атмосфера, содержащая CO<sub>2</sub> влияет на результаты) при 37°C ± 2°C он должен расти на агаре, содержащем стрептомицин (2,5 мкг/мл), и не поддаваться ингибированию в результате внесения в подходящую культуральную среду бензилпенициллина натрия (3 мкг [5 МЕ]/мл), тионина синего (2 мкг/мл) и основного фуксина (20 мкг/мл).

Для дополнительной характеристики вакцин на основе S19, RB51 и Rev.1 используют ПЦР и молекулярные методы (см. Раздел В.1.4).

Особым требованием для производства вакцин S19 и Rev.1 является то, что от исходного посевного материала до каждой серии посевного материала (то есть культуры, которую вносят в среду для производства вакцины) должно быть проведено не более трех пассажей, а сбор вакцинного штамма должен быть произведен после не более чем трех пассажей серии посевного материала или исходного посевного материала. Перед применением исходный посевной материал следует обязательно проверять на отсутствие диссоциации. Рекомендованный метод подготовки посевного материала описан у Alton et al. (1988).

### 1.2.1.2. Критерии качества

Исходные посевные материалы *Brucella abortus* S19 и RB51 и *B. melitensis* Rev.1 подлежат проверке на чистоту, идентичность и, если применимо, гладкость или шероховатость. Серии посевного материала S16 и Rev.1 также должны соответствовать исходному посевному вирусу по показателям остаточной вирулентности и иммуногенности у мышей.

#### 1.2.1.2.1. Чистота

Испытания биологических материалов на чистоту и свободу от контаминации описаны в Главе 1.1.9 Испытания биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации.

#### 1.2.1.2.2. Безопасность

Вакцины S19 и Rev.1 характеризуются сниженной вирулентностью, но должны сохранять минимальную вирулентность, чтобы быть эффективными (см. Раздел С.1.2.1.2.3 Иммуногенность). Тем не менее, тест на безопасность проводят не всегда. При желании, в случае запуска нового процесса производства, и если ожидается изменения в отношении безвредности препаратов вакцин S19 и Rev.1, испытание на безопасность проводят на КРС (S19) и овцах и козах (Rev.1) следующим образом: для теста используют 12 телят женского пола или овец/коз, соответственно, в возрасте 4-6 месяцев. Шести животным вводят вакцину в однократной или трехкратной рекомендованной дозе. Каждую партию из шести животных содержат отдельно. Всех животных наблюдают в течение 21 дня. Не должно наблюдаться значимых местных или системных реакций. Если репрезентативная серия вакцины в данной дозе и при данном способе введения показывает удовлетворительные результаты в этом испытании, испытание не обязательно повторять на сериях посевного материала или сериях вакцины, приготовленных с использованием того же исходного посевного материала и в результате того же производственного процесса. Испытание на безопасность вакцины S19/Rev.1 также можно проводить на морских свинках. Группам животных, состоящим не менее чем из 10 особей, внутримышечно вводят разные дозы вакцины, разведенной в ФБР, рН  $7,2 \pm 0,2$ , содержащей  $5 \times 10^9$  жизнеспособных микроорганизмов. У животных должны отсутствовать явные нежелательные эффекты и смертельные исходы.

Если репрезентативная серия вакцины в данной дозе и при данном способе введения показывает удовлетворительные результаты в этом испытании, испытание не обязательно повторять на сериях посевного материала или сериях вакцины, приготовленных с использованием того же исходного посевного материала и в результате того же производственного процесса.

Испытание на безопасность вакцины RB51 можно проводить следующим образом: 8-10-недельным мышам Balb/c женского пола вводят внутрь брюшины  $1 \times 10^8$  КОЕ; селезенки животных культивируют через 6 недель после введения. Селезенки не должны содержать RB51, а у мышей должны отсутствовать антител к О-специфическому полисахариду.

#### 1.2.1.2.3. Иммуногенность

##### i) Вакцина S19

Вакцина S19 является эффективной, если обладает характеристиками исходного штамма S19, то есть если она удовлетворяет критериям в отношении подлинности и гладкости. Кроме того, вакцина должна быть произведена из определенного посевного материала с надлежащей иммуногенностью и остаточной вирулентностью (Grilló et al., 2000).

##### a) Идентичность

Наличие микроорганизмов *Brucella abortus* в вакцине устанавливают с помощью соответствующих морфологических, серологических и биохимических тестов и методом культивирования: S19 *Brucella abortus* имеет обычные свойства биовара 1 штамма *Brucella abortus*, но не требует для роста  $\text{CO}_2$ , не растет в присутствии бензилпенициллина (3 мкг/мл = 5 МЕ/мл), тионина синего (2 мкг/мл) и эритритола (1 мг/мл) (все в конечных концентрациях). Описаны методы ПЦР и другие молекулярные методы для идентификации вакцинного штамма S19 (см. Раздел В.1.4).

##### b) Гладкость (определение фазы диссоциации)

Восстановленную в очищенной воде вакцину S19 наносят штрихом на шесть планшетов с агаром (сывороточно-декстрозный агар или триптиказо-соевый агар (ТСА)) с добавлением 5% сыворотки [в объемном отношении] или 0,1% экстракта дрожжей [в отношении массы к объему]) таким образом, чтобы колонии находились близко друг к другу в определенных местах, а на других участках были почти или полностью разделены. Незначительные различия во внешнем виде становятся более очевидными у колоний, расположенных вблизи друг друга, чем у колоний, располагающихся на значительном расстоянии. Планшеты инкубируют при  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 5 дней и осматривают при непрямо отраженном свете (метод Генри) до и после окрашивания (три планшета) кристаллическим фиолетовым (метод окрашивания White и Wilson).

*Внешний вид колоний до окрашивания:* По внешнему виду колонии S представляют собой круглые, блестящие колонии синего или сине-зеленого цвета. Колонии R имеют сухую, зернистую структуру, цвет имеют тусклый, желтовато-белый. Мукоидные колонии (M) – это прозрачные сероватые колонии, отличающиеся вязкой консистенцией при прикосновении петлей. Промежуточные колонии (I), которые сложнее всего классифицировать, по внешнему виду представляют собой

нечто среднее между формами S и R: они слегка мутные и более зернистые, чем колонии S.

*Внешний вид колоний после окрашивания кристаллическим фиолетовым:* Колонии S не накапливают краситель. Диссоциированные колонии (I, M или R) окрашиваются в различные оттенки красного и лилового, а на поверхности могут быть видны радиальные трещины. Иногда окрашенная поверхностная пленка соскальзывает с окрашенных колоний и видна рядом с ними.

Фазу колонии можно подтвердить реакцией агглютинации с акрифлавином (Alton et al., 1988). S колонии остаются в суспендированном виде, в то время как R колонии сразу агглютинируют, а, в случае с мукоидными колониями, будут образовывать нити. Промежуточные колонии могут остаться в суспендированном виде или образовать мелко-зернистую агглютинацию.

Не менее 99% клеток посевного материала должны быть в гладкой фазе.

- с) Остаточная вирулентность (50% времени персистенции или 50% времени восстановления) (Grilló et al., 2000; Pouillot et al., 2004)
- 1) Готовят соответствующие суспензии исследуемой серии посевного материала S19 *Brucella abortus* (исследуемая вакцина) и культуры исходного посевного материала S19 (в качестве эталонного штамма). Для этой цели материал каждого из штаммов, выросший за 24-48 часов, собирают в стерильный забуференный солевой раствор (ЗСР: NaCl 8,5 г;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0 г;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,0 г; очищенная вода 1000 мл; pH  $6,8 \pm 0,2$ ) и доводят суспензию в ЗСР до концентрации  $10^9$  КОЕ/мл с помощью спектрофотометра (0,170 ОП при считывании при 600 нм). Точное количество КОЕ/мл проверяют после этого путем посева серийных десятикратных разведений на соответствующую культуральную среду (рекомендуются основа кровяного агара или триптиказо-соевый агар).
  - 2) Суспензию, содержащую исследуемую вакцину, вводят подкожно самкам мышей линии CD1 5-6 недельного возраста (32 особи) в объеме 0,1 мл ( $10^8$  КОЕ/мышь). Параллельно, также иммунизируют другую группу из 32 мышей суспензией, содержащей эталонный штамм S19. Исходный посевной штамм S19 с подтвержденными удовлетворительными показателями иммуногенности и/или остаточной вирулентности, можно получить из Департамента сельского хозяйства США (адрес см. в сноске 4).
  - 3) Мышей умерщвляют смещением шейных позвонков группами по восемь произвольно выбранных животных через 3, 6, 9 и 12 недель.
  - 4) Селезенки мышей удаляют и гомогенизируют отдельно в асептических условиях с использованием стеклянного гомогенизатора (или в соответствующих стерильных

пакетах в гомогенизаторе Stomacher) в 1 мл стерильного забуференного солевого раствора.

- 5) Каждую суспензию цельной селезенки *in toto* распределяют по нескольким планшетам, содержащим подходящую культуральную среду, и инкубируют в стандартных условиях для *Brucella* в течение 5-7 дней (нижний предел обнаружения: 1 бактерия на селезенку). Животное считается зараженным, если из селезенки выделена хотя бы 1 КОЕ бактерии.
- 6) Рассчитывают 50% времени персистенции или 50% времени восстановления ( $BB_{50}$ ) с помощью статистического метода SAS®, специально разработанного для расчетов  $BB_{50}$  (адрес для получения специального SAS® см. в сноске 7). Для этого определяют количество защищенных мышей (колоний в селезенке не выделено) в каждый момент убоя (8 мышей на период времени) и подсчитывают процент защищенных мышей нарастающим итогом за единицу времени с помощью метода Reed и Muench (описан у Grilló et al., 2000). Функция распределения значения данного процента представляет собой сигмоидальную кривую, которую преобразовывают к линейному виду для расчета значений  $BB_{50}$  с использованием компьютеризированной процедуры PROBIT статистического программного обеспечения SAS®.
- 7) Проводят статистическое сравнение параллелизма (отрезок и наклон) между линиями распределения, полученными и для исследуемого и для эталонного штаммов S19 с использованием файла SAS®, разработанного специально для этой цели. Оба значения  $BB_{50}$  можно статистически сравнивать только тогда, когда они происходят из параллельных линий распределения. Если параллелизм отсутствует, остаточную вирулентность исследуемого штамма считают недостаточной, а сам штамм – непригодным для производства вакцины.
- 8) Если параллелизм подтвержден, проводят статистическое сравнение значений  $BB_{50}$ , полученных для исследуемого и для эталонного штаммов S19, с использованием файла SAS®, разработанного специально для этой цели. Для того чтобы штамм считался пригодным для производства вакцины, значение  $BB_{50}$ , полученное для исследуемого штамма, не должно значительно отличаться от значения, полученного для эталонного штамма S19 ( $BB_{50}$  и доверительные интервалы обычно составляют около  $7,0 \pm 1,3$  недели).

Обоснование статистической процедуры для проведения вышеуказанных расчетов остаточной вирулентности подробно описано (описан у Grilló et al., 2000). В ином случае, статистические подсчеты, описанные на этапах с 6 до 8, можно не проводить, а заменить простой в использовании специальной программой HTML-JAVA (Rev2), доступной бесплатно (адрес указан в сноске 5) (Pouillot et al., 2004).

Если репрезентативная серия посевного материала показала хорошие результаты в данном тесте, испытание не нужно повторять в отношении других посевных материалов или серий вакцины, приготовленных из того же посевного штамма с использованием такого же производственного процесса.

d) Иммуногенность у мышей (Grilló et al., 2000)

Это испытание проводят в трех группах из шести выбранных произвольно самок мышей линии CD1 5-7-недельного возраста.

- 1) Суспензии вакцины готовят и доводят до нужного состояния с помощью спектрофотометрии как описано ранее.
- 2) Суспензию, содержащую  $10^5$  КОЕ исследуемой вакцины, подкожно вводят каждой из шести мышей первой группы (в объеме 0,1 мл/мышь).
- 3) Суспензию, содержащую  $10^5$  КОЕ живых бактерий из эталонной вакцины S19, вводят подкожно каждой из шести мышей второй группы. Третья группа, которой вводят 0,1 мл забуференного солевого раствора, служит невакцинированным контролем.
- 4) Точное количество введенных КОЕ проверяют позже путем посева серийных десятикратных разведений на соответствующую культуральную среду (рекомендуется основа кровяного агара или триптиказо-соевый агар).
- 5) Всех мышей подвергают контрольному заражению через 30 дней после вакцинации (сразу после 16-часового голодания) путем введения внутрибрюшинно суспензии (0,1 мл на мышь), содержащей  $2 \times 10^5$  КОЕ штамма 544 *Brucella abortus* (CO<sub>2</sub>-независимого), приготовленной, доведенной до нужного состояния и проверенной ретроспективным способом, как описано выше.
- 6) Через 15 дней мышей умерщвляют смещением шейных позвонков.
- 7) Селезенки иссекают в асептических условиях, удаляют жир, взвешивают и гомогенизируют.
- 8) Также селезенки можно заморозить и хранить при -20°C в течение периода от 24 часов до 7 недель.
- 9) Каждую селезенку гомогенизируют в асептических условиях с использованием стеклянного гомогенизатора (или в соответствующих стерильных пакетах с помощью гомогенизатора Stomacher) в объеме забуференного солевого раствора, pH 6,8, в 9 раз превышающем массу селезенки, и три серийных десятикратных разведения (1/10, 1/100 и 1/1000) каждого гомогената выполняют в таком же разбавителе. По 0,2 мл каждого разведения в четырех экземплярах распределяют на агаровые планшеты и инкубируют два планшета в атмосфере с 10% CO<sub>2</sub> (для стимуляции роста как вакцинного штамма, так штамма контрольного заражения), а два других планшета оставляют на воздухе (для подавления роста

CO<sub>2</sub>-независимого штамма контрольного заражения 544 *Brucella abortus*), оба в течение 5 дней при температуре 37°C ± 2°C.

- 10) Колонии микроорганизмов *Brucella* (*B. abortus* 544) подсчитывают в разведениях, соответствующих планшетам, показывающим менее 300 КОЕ. Если на планшетах, соответствующих разведению 1/10, колонии отсутствуют, то селезенку считают зараженной пятью бактериями. Это количество бактерий *Brucella* на селезенку сначала обозначают как X и выражают как Y после следующей трансформации:  $Y = \log (X/\log X)$ . Затем подсчитывают среднее и стандартное отклонения, которые являются ответами каждой группы из шести мышей.
- 11) Условия контрольного эксперимента считают удовлетворительными, если: i) ответ у невакцинированных мышей (среднее значение Y) равен не менее 4,5; ii) ответ у мышей, вакцинированных эталонной вакциной S19, составляет менее 2,5; iii) стандартное отклонение, рассчитанное для каждой группы из шести мышей, составляет менее 0,8.
- 12) Проводят статистическое сравнение (рекомендуется тест для определения минимального значимого различия) значений иммуногенности, полученных у мышей, вакцинированных исследуемой вакциной на основе штамма S19, с полученными у мышей, вакцинированных эталонной вакциной, и у мышей в невакцинированной контрольной группе. Исследуемая вакцина считается удовлетворительной, если значение иммуногенности, полученное для мышей, вакцинированных данной вакциной, будет значительно ниже значения, полученного для невакцинированных контрольных мышей, и, кроме того, не будет значительно отличаться от значения, полученного для мышей, вакцинированных эталонной вакциной (адрес для получения более подробной информации о процедуре см. в сноске 5).

Если репрезентативная серия посевного материала показала хорошие результаты в данном тесте, испытание не требуется повторять в отношении других серий посевного материала или серий вакцины, приготовленных из того же посевного штамма с использованием такого же производственного процесса.

ii) Вакцина RB51

Посевной материал вакцины RB51 должен обладать характеристиками исходного штамма RB51 по показателям идентичности, шероховатости и иммуногенности.

a) Идентичность

Восстановленная вакцина RB51 не должна содержать чужеродных микроорганизмов. Наличие микроорганизмов *Brucella abortus* в вакцине устанавливают с помощью соответствующих морфологических, серологических и биохимических тестов и методом культивирования: RB51

*Brucella abortus* обладает обычными свойствами биовара 1 штамма *Brucella abortus*, но на 100% находится в шероховатой фазе и не растет в присутствии рифампицина (250 мкг/мл). Описаны методы ПЦР и другие молекулярные методы для идентификации вакцинного штамма RB51 (см. Раздел В.1.4).

b) Шероховатость (определение фазы диссоциации)

К вакцине RB51 применяют те же технические процедуры, что и для вакцины S19 (см. Раздел С.1.2.1.2.3.i Вакцина S19 выше). 100% клеток RB51 должны быть в шероховатой фазе. Кроме того, все колонии RB51 должны быть отрицательными по результатам дот-блоттинга с применением моноклональных антител к О-специфическому полисахариду.

c) Иммуногенность

Поскольку при получении разрешения на применение вакцины RB51 у КРС в США было указано, что степень защиты зависит от дозы (КОЕ) исходного посевного материала, для серий вакцины RB51 испытания иммуногенности *in vivo* обычно не проводят. В США в качестве способа оценки иммуногенности утверждены процедуры определения количества жизнеспособных микроорганизмов посевом в чашках Петри (этот подход аналогичен испытанию на иммуногенность для вакцины S19 в США (USDA, 2003)). Обсуждались также противобруцеллезные вакцины на основе шероховатых штаммов (Moriyón et al., 2004).

iii) Вакцина Rev.1

a) Идентичность

Наличие микроорганизмов *Brucella melitensis* в вакцине устанавливают с помощью соответствующих морфологических, серологических и биохимических тестов и методом культивирования: в условиях инкубирования на воздухе при температуре  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  подавление штамма Rev.1 происходит в результате внесения в подходящую культуральную среду бензилпенициллина натрия (3 мкг (5 МЕ) на 1 мл), тионина (20 мкг/мл) или основного функсина (20 мкг/мл); данный штамм растет на агаре, содержащем стрептомицин в концентрации 2,5 мкг/мл. Для идентификации вакцинного штамма Rev.1 описаны методы ПЦР и другие молекулярные методы (см. Раздел В.1.4).

b) Гладкость (определение фазы диссоциации)

В отношении вакцины Rev.1 применяют те же технические процедуры, что и для вакцины S19 (Раздел С.1.2.1.2.3.i выше).

Иногда колонии Rev.1 могут незначительно и почти незаметно для глаза отличаться друг от друга по размеру. Для Rev.1 характерны мелкие колонии (1-2 мм в диаметре), хотя возможно развитие и более крупных колоний Rev.1 в зависимости от используемой среды, степени остаточной влажности в атмосфере инкубатора и присутствия или отсутствия  $\text{CO}_2$ . Крупные колонии появляются гораздо реже, чем мелкие, обычно, в соотношении 1 к  $10^3$ . Оба варианта Rev.1 относятся к гладкому (S) типу. Чтобы избежать

вариаций в размере колоний во время последовательных пассажей, при подготовке серий посевного материала следует отбирать только мелкие колонии.

Не менее 99% клеток посевного материала должны быть в гладкой фазе.

- с) Остаточная вирулентность (50% времени персистенции или 50% времени восстановления) (Grilló et al., 2000; Pouillot et al., 2004)

Расчет  $BB_{50}$  для штамма Rev.1 производят согласно той же технической процедуре, что и для вакцины S19 (см. выше), за исключением того, что исследуемый посевной материал *B. abortus* S19 и исходную посевную культуру S19 (используемую в качестве эталонного штамма) заменяют исследуемым посевным материалом *B. melitensis* Rev.1 (исследуемая вакцина) и исходной посевной культурой *B. melitensis* Rev.1 (эталонный штамм), соответственно.  $BB_{50}$  эталонного исходного штамма Rev.1 и границы доверительного интервала составляют  $7,9 \pm 1,2$  недели. Указанный посевной материал вакцины Rev.1 или серия вакцины должны сохранять остаточную вирулентность, обеспечивающую эффективность вакцины.

Если репрезентативная серия посевного материала показала хорошие результаты в данном тесте, испытание не требуется повторять в отношении других посевных материалов или серий вакцины, приготовленных из того же посевного штамма с использованием такого же производственного процесса.

- d) Иммуногенность у мышей (Grilló et al., 2000)

Оценку иммуногенности Rev.1 проводят согласно той же технической процедуре, что и для вакцины S19 (см. выше), за исключением того, что исследуемый посевной материал *B. abortus* S19 и исходную посевную культуру S19 (используемую в качестве эталонного штамма) заменяют исследуемым посевным материалом *B. melitensis* Rev.1 (исследуемая вакцина) и исходной посевной культурой *B. melitensis* Rev.1 (эталонный штамм), соответственно.

Условия контрольного эксперимента считают удовлетворительными, если: i) ответ у невакцинированных мышей (среднее значение  $Y$ ) равен не менее 4,5; ii) ответ у мышей, вакцинированных эталонной вакциной Rev.1, составляет менее 2,5; iii) стандартное отклонение, рассчитанное для каждой партии из шести мышей, составляет менее 0,8.

Если репрезентативная серия посевного материала показала хорошие результаты в данном тесте, испытание не требуется повторять в отношении других серий посевного материала или серий вакцины, приготовленных из того же посевного штамма с использованием такого же производственного процесса.

### 1.2.1.3. Валидация в качестве вакцины

Многочисленные независимые исследования подтвердили значение S19 в качестве вакцины для защиты КРС от бруцеллеза, эту вакцину также

использовали (в сочетании с серологическими тестами и выбраковкой животных) для эрадикации бруцеллеза КРС во многих из тех стран, которые теперь считаются свободными от этого заболевания. При введении неполовозрелым животным микроорганизм ведет себя как аттенуированный штамм. В редких случаях, при введении полных доз вакцины подкожным способом, иммунизация может вызывать локализованные инфекции половых путей, особенно, у особей мужского пола. По этой причине вакцинация особей мужского пола противопоказана. Антительный ответ, персистирующий в течение 6 месяцев и более, вероятнее всего, будет наблюдаться у значительной части животных, вакцинированных подкожно стандартной дозой уже во взрослом возрасте. У некоторых животных, вакцинированных подкожно в возрасте телят, может позднее развиться артропатия, особенно, бедренно-большеберцовых суставов. Вакцина безопасна для большинства животных при введении телятам в 3-6-месячном возрасте. Ее также можно использовать для взрослых животных в сниженной дозе; в этом случае дополнительным преимуществом также является снижение интерференции в серологических тестах. Вакцина обеспечивает стойкий иммунитет при контрольном заражении вирулентными штаммами *Brucella abortus* в умеренной дозе, однако, точная его продолжительность не установлена. Продолжительность защиты против заражения *B. melitensis* у КРС также не установлена. Вакцинный штамм стабилен, а возврат к вирулентности наблюдается чрезвычайно редко. Случаи возврата к вирулентности связаны с возникновением штаммов, использующих эритролит, при случайном введении вакцины беременным животным. Бактерии ведут себя как аттенуированный штамм у мышей, и даже при введении в большом объеме быстро выводятся из тканей.

Отчеты как по экспериментальным исследованиям с контрольным заражением, так и по полевым исследованиям не позволяют прийти к однозначному выводу в отношении ценности штамма RB51 *Brucella abortus* для защиты КРС от бруцеллеза (см. выше). У телят микроорганизм ведет себя как аттенуированный штамм, однако, у взрослых особей возможны проблемы с безопасностью. *Brucella abortus* RB51 содержит минимально экспрессированный O-специфический полисахарид, и у вакцинированных животных в роз-бенгал тесте и в СФТ сероконверсии не наблюдается. К тому же, RB51 не индуцирует выработку антител к O-специфическому полисахариду, которые удалось бы обнаружить с помощью существующих методов исследования (USDA, 2003). Однако присутствие общих эпитопов корового белка как у гладких, так и шероховатых бруцелл не всегда позволяет отличить иммунный ответ на RB51 от иммунного ответа на полевые гладкие штаммы *Brucella* вне зависимости от того, какой метод непрямого ИФА используется: ИФА на основе S-ЛПС или ОПС. Эффективность вакцины RB51 против бруцеллезной инфекции у КРС невозможно оценить однозначно (Moriyón et al., 2004), хотя заявлено, что она защищает от умеренного контрольного заражения вирулентными штаммами *B. abortus*, продолжительность такой защиты неизвестна. Эффективность этой вакцины против заражения *B. melitensis* у КРС также не установлена. Вакцина очень стабильна, и не было описано никакого возврата к гладкости в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Микроорганизм ведет себя как аттенуированный штамм у различных животных, включая мышей, у которых он быстро выводится из тканей.

Многочисленные независимые исследования подтвердили ценность вакцины на основе штамма Rev.1 *B. melitensis* в качестве средства защиты овец и коз от бруцеллеза. Вирелунтность вакцины остается неизменной даже при введении суягным овцам и козам. Однако введение вакцины Rev.1 суягным овцам и козам может ассоциироваться с абортами и выделением бактерий с молоком. Абортов, связанных с применением вакцины, не удается избежать даже в случае введения уменьшенной дозы вакцины; аборты и выделение вакцинного штамма микроорганизмов с молоком регистрировали при введении подкожно или через конъюнктиву доз, не превышающих  $10^6$  микроорганизмов, суягным животным (Blasco, 1997).

## 1.2.2. Способ производства

### 1.2.2.1. Процедура

Живые противобруцеллезные вакцины производят в системе посевных материалов, описанной выше (Раздел В.2.2) для антигенов ВВАТ и СФТ.

Для производства S19 может применяться процедура, описанная выше, за исключением того, что клетки собирают в ФБР, pH  $6,3 \pm 0,2$ , и осаждают центрифугированием или добавлением натрий карбоксиметилцеллюлозы в конечной концентрации 1,5 г/литр. Сбор после одного цикла в биореакторе или собранный пул клеток из серии культур, выращенных в матрасах Ру, посев на которые был произведен в одно и то же время из одной и той же серии посевного материала, является одним сбором. Возможно объединение одного или более сборов в пул для формирования конечного балка, который используется для расфасовки серии вакцины в контейнеры для готового препарата. До объединения в пул каждый отдельный сбор исследуют на чистоту, концентрацию клеток, диссоциацию и подлинность. Такой же набор тестов проводят и в отношении конечного балка, количество жизнеспособных микроорганизмов в котором должно составлять от 8 до  $24 \times 10^9$  КОЕ/мл. Концентрацию корректируют до необходимого уровня путем добавления ФБР для вакцины, предназначенной для реализации в жидкой форме, или стабилизатора – для лиофилизированной вакцины. В случае со стабилизатором следует учесть потерю жизнеспособности при лиофилизации, которая не должна превышать 50%. Конечный высушенный продукт не должен подвергаться воздействию температур, превышающих  $35^{\circ}\text{C}$ , во время высушивания, а остаточная влажность должна составлять 1-2%. Содержимое герметично запечатывают под вакуумом или сухим азотом сразу после высушивания; температура хранения составляет  $4^{\circ}\text{C}$ .

Процесс производства вакцины на основе штамма RB51 *Brucella abortus* практически аналогичен таковому для производства вакцины на основе S19.

Для производства вакцины на основе штамма Rev.1 *B. melitensis* возможно применение описанных выше процедур получения антигенов (Alton et al., 1988) за исключением того, что клетки следует собирать в стабилизатор для лиофильной сушки с последующим осаждением с помощью центрифугирования. Сбор после одного цикла в биореакторе или собранный пул клеток из серии культур, выращенных в матрасах Ру, посев на которые был произведен в одно и то же время из одной и той же серии посевного материала, является одним сбором. Возможно объединение одного или более сборов в пул для формирования конечного балка, который используется для расфасовки серии вакцины

в контейнеры для готового препарата. До объединения в пул каждый отдельный сбор исследуют на чистоту, концентрацию клеток, диссоциацию и подлинность. Объем конечного балка доводят до необходимого путем добавления соответствующего количества стабилизатора с тем, чтобы каждая доза содержала надлежащее количество жизнеспособных микроорганизмов. После коррекции концентрации клеток в конечном балке проводят испытания на подлинность, диссоциацию и отсутствие контаминации посторонними микроорганизмами (см. ниже).

#### 1.2.2.2. Требования к ингредиентам

Штаммы следует культивировать в подходящей среде.

Штаммы S19 *Brucella abortus* и Rev.1 *B. melitensis*, предназначенные для производства вакцин, выращивают на среде, не содержащей сыворотку или другие продукты животного происхождения, при условиях, подобным тем, которые описаны выше для штаммов S99 или S1119-3 *B. abortus* (Alton et al., 1988). Фенольный раствор заменяют на стабилизатор для лиофильной сушки.

Для культивирования штамма Rev.1 *Brucella abortus* использовали схожие методы.

Сывороточно-декстрозный агар и триптиказо-соевый агар с добавлением 5% сыворотки или 0,1% экстракта дрожжей используют в качестве твердых сред, подтвердивших свою состоятельность для репродукции штамма Rev.1 (Alton et al., 1988). Однако данный штамм не достаточно хорошо растет на картофельном агаре: для начала размножения обычно требуется 3-5 дня.

Микроорганизмы, предназначенные для производства всех вакцин, не инактивируют, а хранят при температуре  $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  с регулярным проведением контроля качества, как описано выше.

Для производства лиофилизированных вакцин рекомендуют стабилизатор, содержащий 2,5% казеиновый перевар, например, триптон (Оксид), 5% сахарозу и 1% глутамат натрия, растворенный в очищенной воде и стерилизованный фильтрацией.

Для живых вакцин на основе штаммов S19 или RB51 *Brucella abortus* и на основе штамма Rev.1 *B. melitensis* в качестве консервантов нельзя применять антибиотики.

#### 1.2.2.3. Контроль в процессе производства

Во время приготовления отдельных сборов вакцины на основе штаммов S19 или RB51 *Brucella abortus*, а также на основе штамма Rev.1 *B. melitensis* исследуют на чистоту, подлинность и, если применимо, гладкость или шероховатость. Также проверяют концентрацию клеток в конечных балках путем измерения мутности, однако, определение количества жизнеспособных организмов проводят в готовых сериях, направляемых на фасовку. Испытание на подлинность готовых серий проводят в реакции агглютинации с использованием антисыворотки к антигену бруцелл А, R или М, соответственно.

Количество жизнеспособных микроорганизмов в препарате в конечной упаковке должно быть не менее рекомендованных значений (см. выше).

Для вакцин S19 и Rev.1: не менее 99% клеток в серии посевного материала и 95% клеток в серии готового препарата должны быть в

гладкой фазе; 100% клеток RB51 должны быть в шероховатой фазе. Кроме того, все колонии RB51 должны быть отрицательными в анализе методом дот-иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител против О-специфического полисахарида.

Для вакцин S19 и Rev.1 проводят определение иммуногенности и остаточной вирулентности (50% время персистенции или 50% время восстановления) на мышах. Если репрезентативная серия посевного материала показала хорошие результаты в данном тесте, испытание не требуется повторять в отношении других серий посевного материала или серий вакцины, приготовленных из того же посевного штамма с использованием такого же производственного процесса.

#### **1.2.2.4. Испытания серий готового препарата**

В случае с лиофилизированной вакциной контрольные испытания проводят после восстановления препарата в форму, предназначенную для применения (с использованием того же разбавителя).

##### **1.2.2.4.1. Чистота**

Испытания на чистоту и свободу от контаминации биологическими материалами описаны в Главе 1.1.9.

##### **1.2.2.4.2. Подлинность**

См. Раздел С.1.2.1.2.3 Иммуногенность

##### **1.2.2.4.3. Безопасность**

См. Раздел С.1.2.1.2.2 Безопасность

##### **1.2.2.4.4. Иммуногенность серии**

###### **i) Иммуногенность**

Иммуногенность вакцин S19 и Rev.1 также можно определять в готовом лиофилизированном препарате. Процедура описана выше (испытания на подлинность; гладкость; остаточную вирулентность и иммуногенность; см. Раздел С.1.2.1.2.3). Если репрезентативная серия посевного материала показала хорошие результаты в тестах на остаточную вирулентность и иммуногенность, испытания не требуется повторять в отношении других серий вакцины, приготовленных из того же посевного материала с использованием такого же производственного процесса.

###### **ii) Подсчет живых бактерий**

Готовую вакцину также оценивают с точки зрения количества жизнеспособных микроорганизмов. Для вакцин на основе штаммов S19, Rev.1 и RB51 применяют один и тот же метод. Разведение вакцины в объеме 0,1 мл наносят на не менее чем 5 планшетов с триптозным, сывороточно-декстрозным или другим подходящим агаром с помощью стерильного стеклянного, проволочного или пластикового шпателя. Определяют количество КОЕ на единицу объема вакцины.

Подходящими количествами КОЕ считают:

S19:

- a)  $0,5-1 \times 10^{11}$  КОЕ (стандартная доза; подкожный способ введения);

b)  $0,5-5 \times 10^9$  КОЕ (уменьшенная доза; подкожный способ введения);

с)  $5 \times 10^9$  КОЕ (уменьшенная доза; конъюнктивальный способ введения).

Rev.1:

a)  $0,5-2 \times 10^9$  КОЕ (стандартная доза; подкожный или конъюнктивальный способ введения).

RB51:

a)  $1-3,4 \times 10^{10}$  КОЕ (стандартная доза; подкожный способ введения).

### **1.2.3. Требования к получению регистрационного удостоверения/регистрации/лицензированию**

#### **1.2.3.1. Процесс производства**

Для регистрации вакцины в регуляторные органы предоставляют всю информацию, касающуюся производства препарата и испытаний по контролю качества (см. выше). Данная информация должна быть представлена по трем последовательным сериям вакцины объемом не менее 1/3 от типичного промышленного объема серии.

#### **1.2.3.2. Требования к безопасности**

##### **1.2.3.2.1. Безопасность у целевых и нецелевых видов животных**

Возможные побочные эффекты противобруцеллезных вакцин у животных с разным статусом см. в Разделе С.1.1. Основная информация.

##### **1.2.3.2.2. Возврат к вирулентности**

Вакцины на основе штаммов S19 *Brucella abortus* и Rev.1 *B. melitensis*, приготовленные из посевного материала, полученного из надлежащих источников, обладают стабильностью (при условии выполнения требований к контролю серии в процессе производства и серий готового препарата) без тенденции к возврату к вирулентности.

Штамм RB51 *Brucella abortus* не продемонстрировал тенденции к возврату к гладкой фазе микроорганизмов после многократных пассажей *in vitro* и *in vivo*. По-видимому, это связано с характером и местом мутаций, обнаруженных в данном штамме. Несмотря на то что штамм RB51 *Brucella abortus* является носителем гена *wboA*, разрушенного элементом IS711 (предположительного гена, кодирующего глюкозилтрансферазу), в числе других неустановленных мутаций, он накапливает лишь небольшие количества О-специфического полисахарида в цитоплазме.

##### **1.2.3.2.3. Меры предосторожности**

Штаммы S19 и RB51 *Brucella abortus*, хотя и являются аттенуированными штаммами, но все еще способны вызвать заболевание у человека. Следовательно, манипуляции с культурами клеток и суспензиями необходимо производить при соответствующих условиях биобезопасности (см. Главу 1.1.4). Восстановление и последующие манипуляции с восстановленной вакциной следует осуществлять с крайней осторожностью во избежание случайного введения или попадания на кожу или в глаза. Остатки вакцины и оборудование для инъекций следует деконтаминировать

соответствующим дезинфектантом (фенольным, йодофорным или альдегидным) в рекомендованной концентрации. В случае случайного воздействия следует обратиться за медицинской помощью. Эффективность антибиотикотерапии инфекций, вызванных S19, RB51 и Rev/1, у человека, до конца не изучена. Однако следует отметить, что в то время как штамм S19 не характеризуется выраженной антибиотикорезистентностью по сравнению с другими штаммами бруцелл, штаммы Rev.1 и RB51 отличаются резистентностью к стрептомицину и рифампицину, соответственно.

Вакцина считается патогенной для лиц, осуществляющих вакцинацию, поэтому с целью предупреждения об опасности таких лиц производитель должен указать в инструкции по применению/в листке-вкладыше препарата соответствующее предупреждение о том, что в случае самовведения или воздействия вакцины (включая вдыхание аэрозоля) необходимо срочно обратиться к врачу.

#### **1.2.3.3. Требования к эффективности**

Конечную серию препарата подвергают испытанию на иммуногенность, однако, если репрезентативная серия посевного материала или серия исследуемой вакцины показала хорошие результаты в тестах на безопасность/эффективность, испытания не требуется повторять в отношении других серий вакцины, приготовленных из того же посевного материала с использованием такого же производственного процесса.

#### **1.2.3.4. Продолжительность иммунитета**

Считается, что вакцинация телят полной дозой вакцины S19 обеспечивает длительный иммунитет без необходимости введения дополнительных доз. Тем не менее, в отсутствие достаточных доказательств этого в эндемичных регионах животным рекомендуют проводить ревакцинацию через 6-12 месяцев после первичной вакцинации.

Продолжительность иммунитета в ответ на введение КРС вакцины RB51 в разных дозах и в разном возрасте животных пока не установлена. В эндемичных регионах рекомендуется проводить ревакцинацию с целью усиления иммунного ответа через 6-12 месяцев после первичной вакцинации.

Доказано, что стандартные дозы вакцины Rev.1 при введении подкожно или в конъюнктивальный мешок обеспечивают напряженный и стойкий иммунитет у овец и коз. Хотя данные все большего количества полевых исследований свидетельствуют о постепенном снижении поствакцинального иммунитета, поэтому в эндемичных регионах животным рекомендуют проводить ревакцинацию через 6-12 месяцев после первичной вакцинации.

#### **1.2.3.5. Стабильность**

Вакцины на основе штаммов S19 *Brucella abortus* и Rev.1 *B. melitensis*, приготовленные из посевного материала, полученного из надлежащих источников, обладают стабильностью (при условии выполнения требований к контролю серии в процессе производства и серий готового препарата) без тенденции к возврату к вирулентности. В случае с лиофилизированной вакциной наблюдается постепенное снижение числа жизнеспособных микроорганизмов, однако, иммуногенность

препарата должна сохраняться на протяжении всего рекомендованного срока хранения. Для учета данного феномена число жизнеспособных микроорганизмов сразу после завершения лиофильной сушки должно существенно превышать минимальное требуемое количество. Поддержание холодовой цепи во время реализации вакцины – обязательное условие сохранения жизнеспособности микроорганизмов.

Штамм RB51 *Brucella abortus* не продемонстрировал тенденции к возврату к вирулентной гладкой форме микроорганизмов после многократных пассажей *in vitro* и *in vivo*. По-видимому, это связано с характером и местом мутаций, обнаруженных в данном штамме. Несмотря на то что штамм RB51 *Brucella abortus* является носителем гена *wboA*, разрушенного элементом IS711 (предположительного гена, кодирующего глюкозилтрансферазу), в числе других неуставленных мутаций, он накапливает лишь небольшие количества O-специфического полисахарида в цитоплазме.

## **2. Диагностические биопрепараты: бруцеллин**

### **2.1. Основная информация**

Бруцеллин-INRA является не содержащим липополисахарид экстрактом шероховатой формы штамма B115 *B. melitensis*, и однократное введение данного препарата не приводит к образованию антител, реагирующих в тестах с забуференным антигеном *Brucella*, в реакции связывания комплемента или ИФА. Тем не менее, поскольку данный шероховатый штамм содержит различные сахара в составе полисахаридного O-антигена бруцелл в цитозольном экстракте, многократное введение бруцеллина может индуцировать выработку антител, вызывающих интерференцию при проведении других диагностических тестов. По этой причине цитозольные экстракты получают из шероховатых мутантов *B. abortus*, лишенных генов, необходимых для синтеза перосамина, и, вследствие этого, неспособные индуцировать иммунный ответ к O-антигену у овец. Такие цитозольные экстракты успешно тестировали в сравнительных исследованиях с использованием бруцеллина для диагностики бруцеллеза у свиней (Dieste-Pérez et al., 2014). В ближайшем будущем эти экстракты смогут эффективно заменить классический бруцеллин.

### **2.2. Описание процесса производства и требований к нему**

#### **2.2.1. Характеристики посевного материала**

##### **2.2.1.1. Биологические характеристики и критерии качества исходного посевного материала**

Бруцеллин-INRA производят в системе посевных материалов, описанной для антигенов и вакцин. Первичный посевной материал штамма B115 *B. melitensis* для производства бруцеллина<sup>5</sup> размножают с целью получения серии посевного материала, который консервируют методом лиофилизации или замораживанием при температуре жидкого азота. Серия посевного материала должна соответствовать свойствам чистой культуры шероховатого штамма *B. melitensis* и не должна продуцировать гладкие липополисахариды бруцелл. Посевной материал должен давать хорошие урожаи смеси антигенов, вступающих в реакцию с антисыворотками к гладким и шероховатым штаммам бруцелл.

##### **2.2.1.2. Критерии качества**

Посевной материал штамма B115 *B. melitensis* подлежит проверке на чистоту.

Испытания на чистоту и свободу от контаминации биологических материалов описаны в Главе 1.1.9.

### **2.2.1.3. Валидация в качестве *in-vivo* диагностического реагента**

Лабораторные и полевые исследования во Франции подтвердили, что бруцеллин-INRA является безопасным, нетоксичным и специфичным по своему действию препаратом. Препарат содержит 50-75% белков, преимущественно с низкой молекулярной массой и 15-30% углеводов. Он не содержит липополисахаридов, характерных для гладких штаммов (S-ЛПС), не вызывает воспалительных реакций у несенсибилизированных животных, и сам по себе не является сенсибилизирующим агентом. После однократного введения бруцеллин не вызывает образования обнаруживаемых титров антител в стандартных серологических тестах на бруцеллез. У более 90% мелких жвачных, зараженных *B. melitensis*, на определенной стадии заболевания проявляется гиперчувствительность замедленного типа к бруцеллину-INRA. Препарат не рекомендован для диагностики заболевания у отдельных животных, но может быть полезным для скрининга стад. Введение бруцеллина-INRA мелким жвачным дозами по 100 мкг внутривенно вызывает местную реакцию гиперчувствительности замедленного типа, наблюдаемую у сенсибилизированных животных через 48-72 часа. Положительные реакции могут проявляться как у вакцинированных, так и у инфицированных животных (Pouillot et al., 1997).

## **2.2.2. Способ производства (Alton et al., 1988)**

### **2.2.2.1. Процесс производства и требования к ингредиентам**

Бруцеллин производят из штамма B115 *B. melitensis* в соответствии с описанием Alton et al., 1988.

### **2.2.2.2. Контроль в процессе производства**

Необработанный экстракт бруцеллина проверяют на стерильность после экстрагирования ацетона, для того, чтобы убедиться в инактивации клеток *Brucella*, и вновь в конце процесса производства для проверки возможной контаминации. Определяют рН и концентрацию белка, а контрольные испытания (описаны в Разделе С.2.2.2.3 ниже) проводят на нефасованном материале до расфасовки по контейнерам для готового препарата.

### **2.2.2.3. Испытания серии готового препарата**

#### **i) Стерильность**

Испытания препаратов бруцеллина на стерильность описаны в Главе 1.1.9.

#### **ii) Безопасность**

Препараты бруцеллина так же проверяют на аномальную токсичность. Дозы, эквивалентные 20 дозам для КРС (2 мл), вводят внутривенно паре здоровых морских свинок, которые ранее не подвергались воздействию микроорганизмов *Brucella* или их антигенов. Пяти здоровым мышам так же подкожно вводят исследуемый препарат бруцеллина в объеме 0,5 мл (2000 Ед/мл). Животных наблюдают в течение 7 дней, и в течение этого периода не должно наблюдаться местных или системных реакций на инъекцию.

Способность антигена оказывать дермонекротическое действие исследуют путем внутрикожного введения исследуемого препарата в объеме 0,1 мл в предварительно выбритую и продезинфицированную боковую часть трех здоровых морских свинок-альбиносов, которые ранее не подвергались воздействию микроорганизмов *Brucella* или их антигенов. Кожная реакция должна отсутствовать.

Отсутствие аллергической или серологической сенсибилизации проверяют внутрикожным введением исследуемого препарата, разведенного 1/10, в объеме 0,1 мл трем здоровым морским свинкам-альбиносам три раза каждые пять дней. Четвертую инъекцию препарата в том же объеме вводят через 15 дней тем же трем животным, а также еще трем контрольным морским свинкам такой же массы тела, которые ранее препарат не получали. У животных должна отсутствовать антитела в стандартных тестах на бруцеллез (роз-бенгал тест и CFT) в пробах сыворотки, отобранных через 24 часа после последней инъекции, а также реакция гиперчувствительности замедленного типа.

iii) Иммуногенность серии

Иммуногенность препаратов бруцеллина определяют путем внутрикожного введения возрастающих доз бруцеллина морским свинкам, предварительно сенсибилизированных подкожным введением эталонного бруцеллина<sup>7</sup> в полном адьюванте Фрейнда в объеме 0,5 мл за 1-6 месяцев до испытания (возможно использование живого штамма *Brucella*, например, штамма Rev.1, при условии если он обеспечивает такой же уровень сенсибилизации). Эритематозные реакции учитывают и оценивают через 24 часа, а титр рассчитывают путем сравнения с эталонным бруцеллином<sup>8</sup>. Этот метод подходит только для сравнения препаратов бруцеллина, изготовленных согласно протоколу, используемому для производства сенсибилизирующего аллергена. Описана первичная стандартизация серии аллергена и сенсибилизация и титрация на мелких жвачных (Alton et al., 1988).

## **2.2.3. Требования к получению регистрационного удостоверения/регистрации/лицензированию**

### **2.2.3.1. Процесс производства**

Для регистрации бруцеллина в регуляторные органы предоставляют всю информацию, касающуюся производства препарата и испытаний по контролю качества (см. выше), в соответствии с требованиями данных органов. Такая информация должна быть представлена по трем последовательным сериям препарата объемом не менее 1/3 от типичного промышленного объема серии.

### **2.2.3.2. Требования к безопасности**

i) Безопасность у целевых и нецелевых видов животных

У животных не наблюдалось побочных эффектов бруцеллина.

ii) Возврат к вирулентности

Не применимо.

iii) Меры предосторожности

<sup>7</sup> Эталонный бруцеллин ЕС (2000 Единиц/мл) можно получить из Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллезу во Франции.

<sup>8</sup> Статистический метод можно получить из Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллезу во Франции.

Бруцеллин не токсичен. Тем не менее, он может вызывать тяжелые реакции гиперчувствительности у сенсibilизированных лиц, случайно подвергшихся его воздействию. Следует принимать меры предосторожности во избежание случайного введения или воздействия бруцеллина через слизистые оболочки. Используемые контейнеры и оборудование для инъекций следует тщательно деконтаминировать или утилизировать путем сжигания в подходящем одноразовом контейнере.

Бруцеллин считается препаратом, представляющим потенциальную опасность для лиц, работающих с ним, поэтому с целью предупреждения об опасности таких лиц производитель должен указать в инструкции по применению/в листке-вкладыше препарата соответствующее предупреждение о том, что в случае самовведения или воздействия вакцины (включая вдыхание аэрозоля) необходимо срочно обратиться к врачу.

#### **2.2.3.3. Требования к эффективности**

Испытания на иммуногенность проводят на серии готового препарата. Процедура испытания описана выше.

#### **2.2.3.4. Длительность чувствительности**

Длительность сенсibilизации точно не установлена. Степень гиперчувствительности к бруцеллину у разных животных существенно варьирует. У животных на очень ранних стадиях болезни или при длительной инфекции реакция гиперчувствительности на внутрикожную инъекцию может не проявляться.

#### **2.2.3.5. Стабильность**

Лиофилизированный препарат сохраняет свою иммуногенность в течение нескольких лет. Коммерческий препарат в жидком виде должен сохранять свою иммуногенность в течение рекомендованного срока годности.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

ANGUS R.D. & BARTON C.E. (1984). The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, **56**, 349–356.

ASHFORD D.A., DI PIETRA J., LINGAPPA J., WOODS C., NOLL H., NEVILLE B., WEYANT R., BRAGG S.L., SPIEGEL R.A., TAPPERRRO J. & PERKINS B.A. (2004). Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, **22**, 3435–3439.

BLASCO J.M. (1997). A review on the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, **31**, 275–283.

BLASCO J.M., GARIN-BASTUJI B., MARÍN C.M., GERBIER G., FANLO J., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P. & CAU C. (1994a). Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.*, **134**, 415–420.

BLASCO J.M., MARÍN C.M., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P., BARBERAN M., HERNANDEZ A., MOLINA L., VELASCO J., DIAZ R. & MORIYÓN I. (1994b). Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection of sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1835–1840.

- BRICKER B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis, *Vet. Microbiol.*, **90**, 435–446.
- BRICKER B.J., EWALT D.R. & HALLING S.M. (2003). *Brucella* ‘HOOF–Prints’ strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.*, **3**, 15.
- DE MASSIS F., GIOVANNINI A., DI EMIDIO B., RONCHI G.F., TITTARELLI M., DI VENTURA M., NANNINI D. & CAPORALE V. (2005). Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet. Ital.*, **41** (4), 291–299.
- DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., MUÑOZ P.M., DIESTE L., GRILLÓ M.J. & BLASCO J.M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 1458–1463.
- DIESTE-PÉREZ L., BLASCO J.M., DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., BARBERÁN M., CONDE-ÁLVAREZ R., MORIYÓN I., MUÑOZ P.M. (2014). Performance of skin tests with allergens from *B. melitensis* B115 and rough *B. abortus* mutants for diagnosing swine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **168**, 161–168.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AGENCY (EFSA) (2009). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA J.*, **1144**, 1–112.
- EUROPEAN UNION (2008). Commission Decision of 10 December 2008 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) (Text with EEA relevance) (2008/984/EC). *Official Journal of the European Union*, L 352/38-45.
- FOSTER G., OSTERMAN B.S., GODFROID J., JACQUES I. & CLOECKAERT A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2688–2693.
- GRILLÓ M.J., BOSSERAY N. & BLASCO J.M. (2000). *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals*, **28**, 119–127.
- INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (IATA) (2013). Dangerous Goods Regulations, 54th Edition. International Air Transport Association, 800 Place Victoria, P.O. Box 113; Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada, 815 pp <http://www.iata.org/publications/dgr/Pages/manuals.aspx>.
- JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P., MARÍN C. & BLASCO J.M. (1991). Effect of antibiotic therapy and strain 19 vaccination on the spread of *Brucella melitensis* within an infected dairy herd. *Prev. Vet. Med.*, **11**, 17–24.
- JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) EXPERT COMMITTEE ON BRUCELLOSIS (1986). Technical Report Series 740, Sixth Report. WHO, Geneva, Switzerland.
- JONES L.M., BERMAN D.T., MORENO E., DEYOE B.L., GILSDORF M.J., HUBER J.D. & NICOLETTI P.L. (1980). Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 753–760.
- KANG S.I., HER M., KIM J.W., KIM J.Y., KO K.Y., HA Y.M. & JUNG S.C. (2011). Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6726–6728.
- LE FLECHE P., JACQUES I., GRAYON M., AL DAHOUK S., BOUCHON P., DENOEUDE F., NÖCKLER K., NEUBAUER H., GUILLOTEAU L.A. & VERGNAUD G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, **6**, 9.

- LÓPEZ-GOÑI I., GARCÍA-YOLDI D., MARÍN C.M., DE MIGUEL M.J., BARQUERO-CALVO E., GUZMÁN-VERRI C., ALBERT D., GARIN-BASTUJI B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol.*, **154**, 152–155.
- MCGIVEN J., TAYLOR A., DUNCOMBE L., SAYERS R., ALBERT D., BANAI M., BLASCO J.M., ELENA S., FRETIN D., GARIN-BASTUJI B., MELZER F., MUÑOZ P.M., NIELSEN K., NICOLA A., SCACCHIA M., TITTARELLI M., TRAVASSOS DIAS I., WALRAVENS K. & STACK J. (2011). The first International Standard anti-*Brucella melitensis* Serum. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **30**, 809–819.
- MACMILLAN A.P. & COCKREM D.S. (1985). Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. *Res. Vet. Sci.*, **38**, 288–291.
- MORENO E., CLOECKAERT A. & MORIYON I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, **90**, 209–227.
- MORGAN W.J.B., MACKINNON D.J., LAWSON J.R. & CULLEN G.A. (1969). The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.*, **85**, 636–641.
- MORIYÓN I., GRILLÓ M.J., MONREAL D., GONZALEZ D., MARÍN C.M., LÓPEZ-GOÑI I., MAINAR-JAIME R.C., MORENO E. & BLASCO J.M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, **35**, 1–38.
- MUÑOZ P.M., BLASCO J.M., ENGEL B., DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., DIESTE L., MAINAR-JAIME R.C. (2012). Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **146**, 150–158
- MUÑOZ P.M., MARIN C.M., MONREAL D., GONZALES D., GARIN-BASTUJI B., DIAZ R., MAINAR-JAIME R.C., MORIYON I. & BLASCO J. (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for the diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 141–151.
- NICOLETTI P., JONES L M & BERMAN D.T. (1978). Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **173**, 1450–1456.
- NIELSEN K., GALL D., JOLLEY M., LEISHMAN G., BALSEVICIUS S., SMITH P., NICOLETTI P. & THOMAS F. (1996). A homogenous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods*, **195**, 161–168.
- NIELSEN K., KELLY L., GALL D., NICOLETTI P. & KELLY W. (1995). Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **46**, 285–291.
- OCAMPO-SOSA A.A., AGÜERO-BALBÍN J. & GARCÍA-LOBO J.M. (2005). Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.*, **110**, 41–51.
- OLSEN S.C., GARIN-BASTUJI B., BLASCO J.M., NICOLA A.M., SAMARTINO L. (2012). Swine Brucellosis. In: Diseases of Swine, Zimmerman J.J., Karriker A.L., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. eds, 10th Edition, John Wiley & Sons, USA, 697–708.
- POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B. & MOUTOU F. (1997). The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.*, **28**, 365–374.
- POUILLOT R., GRILLÓ M.J., ALABART J.L., GARIN-BASTUJI B. & BLASCO J.M. (2004). Statistical procedures for calculating the residual virulence of *Brucella abortus* strain 19 (S19) and *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccines in mice: theoretical basis and practical applications. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22** (3), 1051–1063.

- PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L. & GARIN-BASTUJI B. (2012). Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Prev. Vet. Med.*, **104**, 94–100.
- SCHOLZ H.C., HUBALEK Z., SEDLACEK I., VERGNAUD G., TOMASO H., AL DAHOUK S., MELZER F., KÄMPFER P., NEUBAUER H., CLOECKAERT A., MAQUART M., ZYGMUNT M.S., WHATMORE A.M., FALSEN E., BAHN P., GÖLLNER C., PFEFFER M., HUBER B., BUSSE H.J. & NÖCKLER K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 375–382.
- SCHOLZ H.C., NÖCKLER K., GÖLLNER C., BAHN P., VERGNAUD G., TOMASO H., AL DAHOUK S., KÄMPFER P., CLOECKAERT A., MAQUART M., ZYGMUNT M.S., WHATMORE A.M., PFEFFER M., HUBER B., BUSSE H.J. & DE B.K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60**, 801–808.
- STACK J.A., HARRISON M. & PERRETT L.L. (2002). Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. *J. Appl. Microbiol.*, **92**, 724–728.
- STACK J.A., PERRETT L.L., BREW S.D. & MACMILLAN A.P. (1999). C-ELISA for bovine brucellosis suitable for testing poor quality samples. *Vet. Rec.*, **145**, 735–736.
- STOFFREGEN W.C., OLSEN S.C., BRICKER B.J. (2006). Parenteral vaccination of domestic pigs with *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.*, **67**, 1802–1808.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICES (APHIS) (2003). Availability of an Environmental Assessment for Licensing of *Brucella abortus* Vaccine, Strain RB-51, Live Culture. *Federal Register*, 18 Feb 2003, **68** (32), 7761.
- VERGER J.M. (1985). *B. melitensis* infection in cattle. In: *Brucella melitensis*, Plommet M. & Verger J.M., eds. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, Netherlands, 197–203.
- WHATMORE A.M. (2009). Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, **9**, 1168–1184.
- WHATMORE A.M. & GOPAUL K.K. (2011). Recent advances in molecular approaches to *Brucella* diagnostics and epidemiology. In: *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, López-Goñi I. & O’Callaghan D., eds, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 57–88.
- WHATMORE A.M., DAVISON N., CLOECKAERT A., AL DAHOUK S., ZYGMUNT M.S., BREW S.D., PERRETT L.L., KOYLASS M.S., VERGNAUD G., QUANCE C., SCHOLZ H.C., DICK E.J. Jr, HUBBARD G. & SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH N.E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 4120–4128.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1953). WHO Technical Report Series No. 68. Sixth report of the WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO, Geneva, Switzerland.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). WHO Laboratory Biosafety Manual, Third Edition. WHO, Geneva, Switzerland.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014, WHO/HSE/GCR/2012.12, WHO, Geneva, Switzerland. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/78075>.

**Примечание:** Существует Референтная лаборатория по изучению инфекции *Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis* (последний обновленный список см. в Таблице в Части 4 данного Руководства по наземным животным или на сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). По поводу получения

дополнительной информации по соответствующим диагностическим тестам, реактивам и вакцинам следует обращаться в Референтную лабораторию МЭБ.