

ГЛАВА 3.4.4.

ГЕНИТАЛЬНЫЙ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗ КРС

РЕЗЮМЕ

Описание болезни: Генитальный кампилобактериоз КРС (ГК КРС) – это венерическое заболевание, также известное как венерический кампилобактериоз КРС. Возбудителем этого передаваемого половым путем заболевания является бактерия *Campylobacter fetus subsp. venerealis*, один из трех подвидов *C. fetus*. Заражение ГК КРС становится причиной бесплодия, ранней гибели эмбрионов и аборт, что приводит к существенным экономическим потерям. Инфекции *C. fetus subsp. fetus* у КРС также ассоциируются с абортами, но встречаются намного реже.

Бактерия *Campylobacter fetus subsp. venerealis* характеризуется выраженной тропностью к органам половой системы мужских и женских особей КРС. Инфицирование происходит, преимущественно, во время спаривания. Болезнь также может распространяться при искусственном осеменении со спермой от инфицированных быков.

Идентификация возбудителя: Возбудитель инфекции можно обнаружить в образцах, отобранных у быков, коров или из абортированных плодов. Бактерия *Campylobacter* представляют собой род грамотрицательных изогнутых палочек, образующих колонии в форме буквы S, в форме силуэта летящей чайки и в форме спирали. Микроорганизм можно вырастить в селективной среде при температуре 37°C в течение не менее чем 2 дней в микроаэробной атмосфере. Подтверждение идентичности микроорганизма и дифференциацию подвидов *C. fetus* осуществляют с использованием биохимических или молекулярных методов, хотя в последнем случае требуется анализ с достаточным уровнем специфичности. Для идентификации микроорганизма также применяют реакцию иммунофлуоресценции, однако, она не позволяет дифференцировать различные подвиды.

Для обнаружения *C. fetus* в транспортной обогащенной среде Кларка также используют твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с захватом антигена моноклональными антителами. Как и реакция иммунофлуоресценции, ИФА не позволяет с точностью дифференцировать два подвида *C. fetus*, поэтому она служит в качестве скринингового метода, положительный результат которого необходимо подтвердить традиционными методами культивирования. Однако по сравнению с реакцией иммунофлуоресценции ИФА обладает более высокой чувствительностью и специфичностью в отношении идентификации *C. fetus* и более высокой производительностью как в случае с отрицательными, так и в случае с положительными результатами исследований большого объема проб.

Серологические тесты: Для оценки иммунитета стада можно использовать ИФА, однако, данный метод не подходит для диагностики инфекции у отдельных животных, так как не способен дифференцировать два подвида *C. fetus*: *C. fetus subsp. venerealis* и *C. fetus subsp. fetus*.

Требования к вакцинам: Вакцину производят как на основе *C. fetus subsp. venerealis*, так и на основе *C. fetus subsp. fetus*, поскольку оба подвида, по-видимому, обладают общими защитными антигенами. Вакцину инактивируют формалином и дополняют масляным адъювантом.

А. ВВЕДЕНИЕ

1. Описание болезни и ее влияние

Генитальный кампилобактериоз КРС (ГК КРС, также известный как венерический кампилобактериоз КРС), это венерическое заболевание, характеризующееся бесплодием, ранней гибелью эмбрионов и абортами. Возбудителем этого передаваемого половым путем заболевания является бактерия *Campylobacter fetus subsp. venerealis* (Cfv), которую обнаруживают в половых путях КРС (например, в препуциальной смазке, вагинальной слизи) или во внутренних органах абортированных плодов. Заражение ГК КРС становится причиной проблем с фертильностью и существенных экономических потерь. Cff можно выделить из кишечного тракта КРС и других видов животных (Garcia et al., 1983); бактерию также можно выделить из абортированных плодов КРС, что свидетельствует о том, что у КРС этот микроорганизм имеет клиническую значимость. С заражением Cff связаны спорадические случаи абортов у КРС, в то время как Cfv вызывает эндемический аборт и проблемы с фертильностью в определенных регионах.

Хотя бактерии *C. fetus* впервые выделили у животных, в некоторых случаях Cff становится оппортунистическим патогеном у человека. Инфекции Cff, которые, как правило, выявляют у беременных женщин или у лиц со сниженным иммунитетом, носят системный характер и сопровождаются различными осложнениями в зависимости от локализации (Wagenaar et al., 2014). Лабораторные процедуры следует проводить с соблюдением необходимых мер биобезопасности и биозащиты, определенных по результатам анализа биологических рисков (см. Главу 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Руководство по управлению биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и вивариях).

2. Таксономия

Campylobacter fetus – один из 27 видов бактерий рода *Campylobacter*, обнаруженных к настоящему времени (<http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>). Распознаны также три подвида *C. fetus*: *C. fetus subsp. testudinum* (Cft), *C. fetus subsp. fetus* (Cff) и *C. fetus subsp. venerealis* (Cfv), при этом Cft встречается только у земноводных, а Cff и Cfv – у млекопитающих. Хотя клинические признаки инфекций Cfv и Cff частично совпадают, первоначально, два этих возбудителя различали именно по клиническим проявлениям (Florent et al., 1959; Veron & Chatelain, 1973). Дифференцировать Cfv и Cff также можно по результатам теста на толерантность к 1% глицину и измерения продукции H₂S в среде, богатой цистеином: бактерия Cfv не растет в присутствии 1% глицина и не продуцирует H₂S в среде, богатой цистеином, в то время как Cff характеризуется толерантностью к 1% глицину и продуцирует H₂S (Florent et al., 1959; Veron & Chatelain, 1973). Cfv включает вариант, обозначаемый как биовар Cfv intermedius (Florent et al., 1959; Veron & Chatelain, 1973). Явных различий между Cfv и Cff не удалось выявить ни с помощью метода ДНК-

ДНК гибридизации (Harvey & Greenwood, 1983), ни по характеру расположения полос в результате исследования клеточных белков методом электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE) (Vandamme et al., 1990). Для определения вида *C. fetus* используют метод MALDI-TOF (время-пролётная ионизация лазерной десорбцией с использованием матрицы) (Bessede et al., 2011), однако, с помощью этого анализа невозможно дифференцировать Cff и Cfv. Из всех описанных молекулярных тестов только полимеразная цепная реакция (ПЦР), нацеленная на ген *nahE*, как в традиционном формате, так и в формате реального времени, а также мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) и метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (AFLP) (van Bergen et al., 2005a; Wagenaar et al., 2001) способны надежно определить вид *C. fetus* (Abril et al., 2007; van der Graaf et al., 2013). Описано несколько молекулярных методов, с помощью которых, предположительно, можно дифференцировать Cff и Cfv, в том числе ПЦР (Abril et al., 2007; Hum et al., 1997; Tu et al., 2005; van Bergen et al., 2005c; Wang et al., 2002), гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) (On & Harrington, 2001), MLST (van Bergen et al., 2005a) и AFLP (Wagenaar et al., 2001) (см. также Раздел В.1.9), однако, ни один из этих молекулярных методов не способен с точностью идентифицировать изолят *C. fetus* до уровня подвида (Iraola et al., 2015; van der Graaf et al., 2013). Метод ПЦР, описанный McGoldrick et al. (2013) для идентификации *C. fetus* subsp. *venerealis*, обладает 98,7% чувствительностью и 99,8% специфичностью. Для дифференциации штаммов *C. fetus*, ассоциированных с млекопитающими, можно использовать секвенирование полного генома (различия определяются на уровне генома кора) (van der Graaf et al., 2014), хотя этот метод не подходит для определения фенотипа штаммов *C. fetus*.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследования для диагностики генитального кампилобактериоза КРС и их цель

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельного животного до перемещения	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции–надзор	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Посев (включая характеристик у фенотипа)	+++	+++	+++	+++	+++	-
IFAT	++	++	++	++	++	-
ИФА с МАТ	++	++	++	++	++	-

¹ При исследовании образца рекомендуется использовать комбинацию методов идентификации агента.

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельного животного до перемещения	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции–надзор	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
MALDI-TOF	+	+	+	+	+	-
MLST	+	+	+	+	+	-
ПЦР для определения вида <i>C. fetus</i> (<i>nahE</i>)	+	+	+	+	+	-
Обнаружение иммунного ответа						
ИФА с антителами	-	-	-	-	-	+

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.

Хотя не все тесты, включенные в категории +++ или ++, прошли формальную валидацию, их рутинный характер и факт их широкого применения без получения сомнительных результатов делает их достаточно приемлемыми.

IFAT = непрямая реакция флюоресцирующих антител; MAT = моноклональные антитела; ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; MALDI-TOF = время-пролётная ионизация лазерной десорбцией с использованием матрицы; MLST = мультилокусное секвенирование; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

В целях сертификации отдельных животных перед перемещением проводят посев с идентификацией микроорганизма. Однако стандартные процедуры культивирования требуют много времени. С помощью валидированного скринингового метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с захватом антигена моноклональными антителами (Brooks et al., 2004; Devenish et al., 2005) можно с точностью обнаружить *C. fetus* subsp. в транспортной обогащенной среде Кларка. Образцы, положительные в ИФА, отправляют на посев с целью подтверждения присутствия конкретных подвидов с применением стандартных методов выделения и идентификации. К преимуществам данной процедуры относится сокращение времени до получения результата и простота выполнения по сравнению с традиционными методами культивирования.

1. Выделение и идентификация агента

1.1. Сбор образцов

1.1.1. Самцы: препуциальная смазка и сперма

Препуциальную смазку быков можно получить различными способами: соскоб (Tedesco et al., 1977), аспирационный метод (Campero et al., 2003) и смыв (Clarke & Dufty, 1978). Соскоб смазки используют для выделения микроорганизма или смывают в пробирку фосфатно-буферным раствором

(ФБР) в объеме примерно 5 мл с добавлением 1% формалина и проводят реакцию иммунофлуоресценции. Препуциальную смазку также можно собрать с помощью искусственной вагины после сбора спермы, промыв искусственную вагину 20-30 мл ФБР.

Чтобы получить образец препуциальной смазки методом смыва, 20-30 мл ФБР вводят в препуциальный мешок. После интенсивного массажа в течение 15-20 секунд введенную жидкость собирают.

Сперму собирают с соблюдением строгих асептических условий. Образцы спермы разводят в ФБР и вносят непосредственно в культуральную среду или в транспортную обогащенную среду.

1.1.2. Самки: цервикальная слизь

Образцы цервикальной слизи собирают методом аспирации или влагалищного смыва.

Для сбора слизи методом аспирации область вульвы очищают, затем во влагалище вводят катетер для искусственного осеменения или катетер Кассу (с синей оплеткой) так, чтобы его передний конец касался шейки матки (Campero et al., 2003). Двигая катетер вперед и назад, проводят осторожные аспирационные движения. Затем катетер удаляют, и собранную слизь вносят непосредственно в культуральную среду или в транспортную обогащенную среду.

Цервикально-вагинальную слизь также можно собрать методом смыва из влагалища: 20-30 мл ФБР вводят во влагалище с помощью шприца, прикрепленного к катетеру для искусственного осеменения. Жидкость отсасывают и повторно вводят во влагалище 4-5 раз, затем собирают и вносят непосредственно в культуральную среду или в транспортную обогащенную среду. Влагалищный смыв также можно собрать тампоном или марлей, оставив их на 5-10 минут во влагалище после инфузии ФБР. Образцы цервикально-вагинальной слизи, полученные методом аспирации, можно развести в ФБР или высеять сразу на культуральную среду или на транспортную обогащенную среду.

Для IFAT цервикально-вагинальную слизь переносят примерно в 5 мл ФБР с добавлением 1% формалина.

1.1.3. Абортированные плоды, плаценты

Образцы плаценты, а также печени, легких и содержимого желудка плодов лучше всего подходят для выделения бактерии-возбудителя. Патологический материал собирают в асептических условиях и вносят в транспортную и обогащенную среду или в ФБР с добавлением 1% формалина для исследования в непрямой реакции с флуоресцирующими антителами.

1.2. Транспортировка патологического материала

При транспортировке патологического материала использование транспортной среды является обязательным в тех случаях, когда материал не подлежит обработке

в лаборатории в течение суток после его сбора. Для отправки в лабораторию образцы помещают в герметичный контейнер (при температуре 4-8°C), обеспечивающий защиту от света, и как можно скорее отправляют в лабораторию, желательно в день отбора.

Существует несколько транспортных и обогащенных сред, например, среда Кларка, среда Ландера, SBL, среда Фоля и среда Кларка, среда Уэйбриджа, среда Кэри-Блэра (Garcia et al., 1984; Hum et al., 1994; Monke et al., 2002).

Некоторые из вышеупомянутых транспортных и обогащенных сред содержат циклогексимид. Ввиду его потенциальной токсичности в качестве альтернативы можно использовать амфотерицин В.

1.3. Обработка проб

После получения образцов лабораторией их высевают в культуральную среду в том виде, в котором они поступили, или, если результаты нужны срочно, подвергают дополнительной обработке.

1.3.1. Образцы жидкостей из половых путей

Смывы препуциальной смазки центрифугируют (3500 g) с целью концентрирования. Подготовленную пробу (объем образца сокращается до 20 мкл) вносят в культуральную среду (непосредственно или с фильтрованием).

Если образец цервикально-вагинальной слизи не слишком вязкий, его можно внести в среду в таком виде или развести равным объемом ФБР. Если образец слишком вязкий, возможно, потребуется его разбавить путем добавления равного объема раствора L-цистеина (100 ммоль N-ацетил-L-цистеина, номер CAS 616-91-1², растворенного в ФБР и стерилизованного фильтрацией через микропористую мембрану). Через 15-20 минут разведенную и разжиженную слизь уже можно вносить в среду для выделения микроорганизмов.

Метод фильтрования: стерильные мембраны из ацетилцеллюлозы с шириной пор 0,45-0,65 мкм помещают на поверхность неселективного агара с добавлением 5% крови. Суспензию образца готовят в ФБР или физрастворе, а затем 10-15 капель суспензии помещают на мембрану и оставляют для пассивного фильтрования при 37°C (не требуется обеспечения микроаэробных условий). Через 30-40 минут мембраны убирают, а чашки с культурой инкубируют в течение 1-2 суток при 37°C при микроаэробных условиях (Steele et al., 1984).

1.3.2. Абортированные плоды, плаценты

Содержимое желудков плодов вносят непосредственно в культуральную среду. Внутренние органы или кусочки органов опалаяют для дезинфекции поверхности, а затем гомогенизируют. Полученный гомогенат вносят в культуральную среду.

² Уникальный номер для данного химического вещества присвоен Химической реферативной службой (CAS)

После отмывки плацентарных оболочек в ФБР для удаления большей части поверхностной контаминации с помощью скребка соскребают хориальные ворсинки, и полученный материал вносят в культуральную среду.

1.4. Выделение *Campylobacter fetus*

1.4.1. Культуральная среда для выделения микроорганизма

В настоящее время для диагностики ГК КРС методом микробиологического посева используют различные среды. Следует отметить, что ряд сред, используемых для выделения *Campylobacter spp.*, не подходят для выделения *C. fetus* из-за содержащихся в них противомикробных веществ (например, цефалоспорина), которые подавляют рост данного микроорганизма (van Bergen et al., 2005b). Большинство культуральных сред содержат циклогексимид. Ввиду потенциальной токсичности этого противомикробного вещества, его можно заменить амфотерицином В. Рекомендованной селективной средой для выделения *C. fetus* считают среду Скирроу. Среда Скирроу – это кровяной агар с 5-7% содержанием (лизированной) дефибринированной крови, который включает следующие селективные агенты: полимиксина В сульфат (2,5 МЕ/мл), триметоприм (5 мкг/мл), ванкомицин (10 мкг/мл) и циклогексимид (50 мкг/мл).

Также можно использовать неселективный кровяной агар (5-7% крови) в сочетании с методом фильтрации (0,65 мкм), однако, данная среда менее чувствительна по сравнению с селективной средой.

Контроль качества каждой серии среды проводят с использованием контрольных штаммов.

1.4.2. Условия инкубирования

Чашки инкубируют при 37°C в микроаэробной атмосфере с содержанием 5-10% кислорода, 5-10% углекислого газа и, желательна, 5-9% водорода для оптимального роста (Vandamme, 2000). Соответствующие микроаэробные условия можно обеспечить различными методами. В некоторых лабораториях подходящую атмосферу создают путем замены газа в сосуде. В продаже имеются наборы для газогенераторов. Также используют различные инкубаторы, позволяющие создавать заданную атмосферу.

Условия культивирования и инкубирования систематически проверяют путем использования контрольных штаммов *C. fetus* subsp. *fetus* и *C. fetus* subsp. *venerealis*. Такие контрольные штаммы следует включать при каждой процедуре выделения.

1.5. Идентификация видов *Campylobacter*

1.5.1. Морфология колоний

Колонии *C. fetus*, как правило, появляются в культуральной среде через 2-5 суток. Для подавления избыточного роста контаминирующих микроорганизмов рекомендуется просматривать среды ежедневно и

пересевать подозрительные колонии. Спустя 3-5 дней инкубирования диаметр колоний должна составлять примерно 1-3 мм, цвет – серовато-розовый, форма – округлая, выпуклая, гладкая и блестящая с ровными краями.

1.5.2. Макроскопическая морфология

Бактерии *Campylobacter* относятся к подвижным микроорганизмам, хотя данное свойство может исчезать после пересева. Бактерии *Campylobacter* часть приобретают форму тонких, изогнутых бацилл, 0,3-0,4 мкм в ширину и 0,5-0,8 мкм в длину. Одновременно в живом состоянии можно наблюдать короткие формы (в форме «запятой»), формы среднего размера (в форме буквы S) и длинные формы (в форме винтовой спирали). Старые культуры могут содержать коккоидные тельца.

1.5.3. Биохимические тесты

См. Таблицу 2.

1.5.4. Атмосфера

Бактерии *Campylobacter* не растут в аэробных условиях.

1.6. Идентификация *Campylobacter fetus* иммунологическими методами

Для идентификации микроорганизма непосредственно в образце или для подтверждения идентификации штамма после его выделения применяют непрямую реакцию с флуоресцирующими антителами (IFAT), однако, данный метод не позволяет дифференцировать различные подвиды.

1.6.1. Подготовка иммунных сывороток

Штаммы *Campylobacter*, желательно, эталонные штаммы из признанных коллекций культур (*C. fetus* subsp. *venerealis* или *C. fetus* subsp. *fetus*) выращивают в кровяной среде при 37°C в микроаэробной атмосфере в течение 3 дней. Микроорганизмы собирают в ФБР и дважды отмывают центрифугированием. Трехмесячным крольчатам внутримышечно вводят по 2 мл восстановленных в ФБР бактерий подвида *C. fetus* в концентрации 10^{11} микроорганизмов/мл с добавлением неполного адьюванта Фрейнда. Инокулят вводят в 4 точки по 0,5 мл в каждую точку. У животных берут пробы крови перед введением препарата, а затем еженедельно. Как только титр антител в сыворотке достигнет высокого уровня по результатам реакции иммунофлуоресценции или реакции агглютинации, животным внутривенно вводят жизнеспособные микроорганизмы в объеме 0,1-1,0 мл и в концентрации 10^{10} микроорганизмов/мл. Пробы крови берут через 7 дней. Затем сыворотки кроликов объединяют в пул. В поведенном недавно исследовании в качестве альтернативы кроличьим антителам описывали куриный иммуноглобулин IgY. Для детекции *C. fetus* также использовали моноклональные антитела (Brooks et al., 2002).

1.6.2. Подготовка конъюгатов

Подготовка конъюгатов осуществляется в соответствии с Harlow & Lane (1988). Рабочее разведение конъюгата определяют по результатам титрования методом "шахматной доски" с мазками культуры *C. fetus* и с использованием разведений положительных и отрицательных контролей с последующим двукратным выбором минимальной концентрации, продуцирующей бриллиантовую флуоресценцию с бактериями *C. fetus*.

1.6.3. Подготовка проб

Образцы жидкостей из половых органов (содержимое сычуга плода, препуциальная смазка или цервикально-вагинальная слизь) смывают в ФБР с 1% формалина (примерно 5 мл). Проводят два этапа центрифугирования. Сначала образцы центрифугируют при 600 g в течение 10 минут при 4°C для удаления дебриса. Затем супернатант центрифугируют при 8000 g в течение 30 минут при 4°C. Осадок растворяют в ~100 мкл оставшегося супернатанта.

1.6.4. Реакция иммунофлуоресценции (Mellick et al., 1965)

Образец объемом 20 мкл вносят в дублирующие лунки предметного стекла. Материал высушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне при -20°C в течение 30 минут или в этаноле при 18-25°C в течение 30 минут. Стеклообразные предметные стекла высушивают на воздухе, а затем вносят антисыворотку, конъюгированную с изомером флуоресцеина изотиоцианата (FITC), в соответствующем разведении. Окрашивание проводят во влажной камере при 37°C в течение 30 минут в темноте. Затем предметные стекла промывают ФБР трижды в течение 10 минут. Предметные стекла опускают в забуференный глицерин (90% глицерин: 10% ФБР). Покровные стекла запечатывают, чтобы не допустить высушивания, а затем предметные стекла просматривают при ультрафиолетовом свете под флуоресцентным микроскопом. В каждом тесте используют предметные стекла с положительными и отрицательными контролями. В качестве положительных контролей используют эталонные штаммы *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* и *C. fetus* subsp. *fetus*, а другой вид *Campylobacter* – в качестве отрицательного контроля. Образцы с флуоресцирующими бактериями, имеющими морфологию, типичную для *C. fetus*, считают положительными.

1.7. Идентификация подвидов *Campylobacter fetus* биохимическими методами

Тесты, описанные в Таблице 2, следует проводить в чистых культурах.

Таблица 2. Дифференцирующие характеристики видов *Campylobacter*, потенциально выделенных из половых путей КРС и из абортированных плодов (в соответствии с Определителем бактерий Берджи, 2 издание, 2005 г.)

	25°C	42°C	Оксидаза	Каталаза	NaCl 3,5%	Глицин 1%	H ₂ S цистеин
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	V	V ^(a)	+	V	-	-	-

<i>C. fetus subsp. fetus</i>	V	V ^(a)	+	+	-	+	+
<i>C. jejuni</i>	-	V ^(b)	+	V ^(c)	-	V	+
<i>C. hyointestinalis</i>	-	+	+	+	-	V	н.у.
<i>C. sputorum</i>	-	+	+	V	+	+	н.у.

(a) = Хотя *C. fetus* не относится к термофильным бактериям рода *Campylobacter*, значительное число штаммов данного вида растут при 42°C;

(b) *C. jejuni subsp. jejuni* положительна, *C. jejuni subsp. doylei* отрицательная;

(c) *C. jejuni subsp. jejuni* положительна, *C. jejuni subsp. doylei* варьирует;

(+) = положительная реакция или рост и (-) = отрицательная реакция или отсутствие роста штамма в подходящей среде при указанных условиях (см. Раздел В.1.4); V = результаты варьируют; н.у. = не установлено

1.7.1. Рост при 25°C и 42°C

Клеточную суспензию (~McFarland №1) вносят в две чашки с кровяным агаром. Каждую чашку инкубируют в описанных атмосферных условиях (см. Раздел В.1.4.2) при 25°C и 42°C. Параллельно тестируют контрольные штаммы.

1.7.2. Оксидаза и каталаза

Тесты проводят в соответствии со стандартным бактериологическим протоколом. Параллельно тестируют контрольные штаммы.

1.7.3. Рост в присутствии натрия хлорида

Клеточную суспензию вносят в кровяную среду, содержащую 3,5% NaCl (15 мл кровяной среды + 2,04 мл 5 моль раствора натрия хлорида), и в простую кровяную среду. Чашки инкубируют в описанных атмосферных условиях (см. Раздел В.1.4.2). Параллельно тестируют контрольные штаммы.

1.7.4. Рост в присутствии 1% глицина

Клеточную суспензию (~McFarland №1) вносят в среду с глицином (15 мл кровяной среды + 1,65 мл 10% водного раствора глицина, стерилизованного фильтрацией) и в ту же среду, но без глицина. Чашки инкубируют в описанных атмосферных условиях (см. Раздел В.1.4.2). Параллельно тестируют два контрольных штамма (Cff и Cfv). Поскольку данные штаммы относятся к прихотливым, небольшие изменения в средах могут быть важными, и отсутствие роста в присутствии глицина следует рассматривать как подозрение на присутствие *C. fetus subsp. venerealis*. Степень воспроизводимости данного теста достаточно низкая; описаны штаммы с промежуточной толерантностью к глицину (Salama et al., 1992 и Van Bergen et al., 2005a). Кроме того, на надежность теста на толерантность к глицину может повлиять тот факт, что толерантность к глицину может возникать в результате трансдукции фагами (Chang & Ogg, 1971).

1.7.5. Продукция сероводорода в среде с цистеином

Тест на продукцию H₂S проводят в бульонной среде для культивирования бруцелл, содержащей 0,02% цистеина. Клеточную суспензию (~McFarland

№1) вносят в среду. Наличие H₂S обнаруживают с помощью реактивной тест-полоски с ацетатом свинца, которую прикрепляют внутри крышки пробирки на 72 часа. Почернение тест-полоски свидетельствует о положительной реакции. Параллельно тестируют контрольные штаммы.

1.8. ИФА с захватом антигена моноклональными антителами

Для обнаружения присутствия вида *C. fetus* в чашках с транспортной обогащенной средой Кларка применяют метод ИФА с захватом антигена моноклональными антителами. Валидированная процедура и реактивы описаны у Brooks et al. (2004) и Devenish et al. (2005). Кратко данную процедуру можно описать следующим образом: образцы (смывы препуциальной смазки, вагинальную слизь, жидкости плодов, ткани плаценты, ткани печени) помещают в транспортную обогащенную среду Кларка и инкубируют в течение 4-5 дней. Отбирают примерно 1,5 мл образца в данной среде, нагревают и тестируют в ИФА. Для захвата антигена в образце используют кроличью поликлональную антисыворотку (к 6 разным штаммам *C. fetus subsp. venerealis* и *C. fetus subsp. fetus* серотипов А и В). Захваченный антиген детектируют с помощью 4 мышинных моноклональных антител (МАТ), специфичных к липополисахаридам (ЛПС) антигена: к кору ЛПС *C. fetus subsp.* (1 МАТ: М1825), к боковой цепи ЛПС, специфичной для серотипа А, (2 МАТ: М1177 и М1194) и к боковой цепи ЛПС, специфичной для серотипа В (1 МАТ: М1183). Чувствительность и специфичность данного теста составляют 100% и 99,5%, соответственно, для обнаружения видов *C. fetus* из образца в транспортной среде Кларка, при этом данный метод позволяет одновременно тестировать большое количество образцов.

1.8.1. Процедура исследования

- i) *Твердая фаза*: Лунки планшета ИФА сенсibilизируют оптимальным разведением кроличьей поликлональной антисыворотки против *C. fetus subsp.* (в 0,06 моль карбонатного буфера, рН 9,6) и инкубируют в течение 18 часов при комнатной температуре. Сенсibilизированные ИФА планшеты герметично запечатывают и хранят при -20°C в течение 1 месяца. Перед проведением исследования ИФА планшеты при комнатной температуре отмывают 4 раза в 0,01 моль ФБР, содержащего 0,15 моль NaCl и 0,05% твин 20 (ФБРТ).
- ii) *Контроли*: в анализе используют 3 контрольных антигена: 1) *C. fetus subsp. fetus* (АТСС 27374), сильно положительный контроль серотипа В, который связывается с МАТ к кору ЛПС (М1825) и с МАТ, специфичным для серотипа В (М1183); 2) *S. fetus subsp. venerealis* (АТСС 19438), слабopоложительный контроль для серотипа А, который связывается с МАТ к кору ЛПС (М1825) и с двумя МАТ, специфичными для серотипа А (М1177 и М1194); и 3) *C. sputorum biovar sputorum*, отрицательный контроль, который не связывается ни с одним из четырех МАТ. Серии трех контрольных антигенов выращивают, промывают, концентрируют и хранят при -20°C.

- iii) *Исследование образцов:* После инкубирования планшетов с образцами в среде Кларка в течение 4-5 дней при 37°C из флаконов отбирают примерно по 1,5 мл жидкости. Контрольные антигены в соответствующем разведении и неразведенные образцы в среде Кларка нагревают до 100°C в течение 15 минут и охлаждают до комнатной температуры. Каждый нагретый исследуемый образец вносят в дублирующие лунки, а каждый нагретый контрольный антиген вносят в четыре соответствующие лунки на ИФА планшете и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
- iv) *Детектор:* Для экономичного расходования реактивов образцы сначала скринируют с использованием МАТ к кору ЛПС М1825. Разведенное (желательно, в ФБР) МАТ М1825 вносят в каждую лунку ИФА планшетов, и планшеты инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы, положительные в реакции с М1825, исследуют с использованием всех 4 МАТ.
- v) *Конъюгат:* Антимышиный козий иммуноглобулин G, конъюгированный с пероксидазой хрена (тяжелые и легкие цепи), разведенный в ФБРТ, вносят во все лунки, и планшеты инкубируют течение 1 часа при комнатной температуре.
- vi) *Субстрат:* Субстрат, 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин/перекись водорода, вносят в лунки, и планшеты помещают на шейкер с орбитальным вращением в течение 10 минут при комнатной температуре. С помощью ИФА ридера измеряют показатели оптической плотности при длине волны 620 нм (ОП₆₂₀).

Все серии реактивов, включая антисыворотку для захвата антигена, контрольные антигены, мышинные МАТ и конъюгат, тестируют заранее путем титрования методом «шахматной доски» для определения оптимальных разведений, используемых при стандартном тестировании образцов жидкостей. Для процедуры тестирования используют аликвоты по 100 мкл, а между этапами планшеты промывают 4 раза в ФБРТ.

- vii) *Интерпретация результатов:* Положительным в ИФА считается образец, положительный не только к МАТ к кору ЛПС, но также и к хотя бы одному из серотип-специфичных МАТ. При первоначальном скрининге с использованием МАТ М1825 средние показатели ОП₆₂₀ каждого исследуемого образца делят на средний показатель ОП₆₂₀, полученный при тестировании сильно положительного контрольного антигена *C. fetus subsp. fetus* серотип В, и умножают на 100%, чтобы получить процент положительного результата (%П). Любой исследуемый образец с %П, превышающим или равным 14%, считают положительным и снова тестируют со всеми 4 МАТ. Образец, повторно показавший положительный результат в тесте с М1825, и показатель ОП₆₂₀ которого превышает или равен 0,2 в тестах с хотя бы одним из трех серотип-специфичных МАТ, считается положительным в ИФА для обнаружения *C. fetus ssp.* Все флаконы с образцами жидкостей в среде Кларка,

соответствующие положительным образцам в ИФА, отправляют на посев, как описано в Разделе В.1.4 Выделение *Campylobacter fetus*, для подтверждения и определения подвида изолята.

1.9. Идентификация подвидов *Campylobacter fetus* молекулярными методами

Описано несколько молекулярных методов для идентификации подвидов *Campylobacter fetus*, включая секвенирование 16S (Gorkiewicz et al., 2003; On & Harrington, 2001), PFGE (On & Harrington, 2001), AFLP (Wagenaar et al., 2001) и MLST (van Bergen et al., 2005a). Метод MLST рекомендован для дифференциации штаммов Cff и Cfv, хотя в недавно проведенном исследовании описан штамм Cff, который был выделен с Cfv-ассоциированным генотипом ST-4, установленным по результатам MLST (Iraola et al., 2015), что доказывает, что метод MLST также полностью подходит для характеристики штаммов *C. fetus* (van der Graaf et al., 2014), хотя данный метод достаточно дорог и в настоящее время не нашел широкого применения в диагностических лабораториях.

Для рутинной лабораторной диагностики больше подходит метод ПЦР. Среди методов ПЦР, которые, как заявлено, способны идентифицировать подвиды *C. fetus*, ряд методик разработаны Hum et al. (1997), Wang et al. (2002), Tu et al. (2005), van Bergen et al. (2005c) и Abril et al. (2007). Однако пока не разработан ПЦР метод, позволяющий с достаточной точностью идентифицировать изоляты *C. fetus* до уровня подвида (van der Graaf et al., 2013) (Таблица 3).

Таблица 3. Чувствительность и специфичность методов ПЦР для идентификации (под)видов *C. fetus*

ПЦР метод	Идентификация	Мишень	Чувствительность ^а	Специфичность ^а
Abril et al., 2007	<i>C. fetus</i>	<i>nahE ISCfe1</i>	100% (143/143) 97% (58/60)	100% (12/12) 100% (95/95)
Van Bergen et al., 2005c	Cfv	Не установлена	45% (27/60)	100% (95/95)
Hum et al., 1997	<i>C. fetus</i> Cfv	<i>cstA parA</i>	100% (143/143) 58% (46/70)	100% (12/12) 83% (79/95)
McMillen et al., 2006	Cfv	<i>parA</i>	53% (32/60)	100% (95/95)
Wang et al., 2002	Cff	<i>sapB2</i>	76% (63/83)	72% (52/72)
Van der Graaf et al., 2013	<i>C. fetus</i>	<i>nahE</i>	100% (143/143)	100% (12/12)

^а Представлено в виде процента (количество правильно идентифицированных штаммов/общее количество штаммов). Исследование включало: 143 штамма *C. fetus*, 60 штаммов Cfv, 83 штамма Cff, 12 штаммов *Campylobacter*, не относящихся к виду *C. fetus*, 95 штаммов, не относящихся к подвиду Cfv, и 72 штамма, не относящихся к подвиду Cff (van der Graaf et al., 2013).

Мультиплексный ПЦР метод, описанный Abril et al. (2007), считается достаточно надежным для правильной идентификации видов *C. fetus* и обладает 100% чувствительностью и 100% специфичностью, хотя Cfv-специфичная мишень, описанная для данного метода ПЦР, характеризуется 97% чувствительностью и не позволяет с высокой точностью дифференцировать изоляты Cfv и Cff (van der Graaf et al., 2013). Мишень *C. fetus* данного метода ПЦР, ген *nahE*, подходит для идентификации видов *C. fetus*; данный метод разработан также и в формате реального времени (van der Graaf et al., 2013; McGoldrick et al., 2013).

Метод ПЦР, описанный Van Bergen et al. (2005c), позволяет обнаруживать штаммы Cfv, установленные по результатам анализа AFLP, но не способен идентифицировать *C. fetus* subsp. *venerealis* биовар *intermedius*, поэтому этот ПЦР анализ не подходит для диагностических целей (van der Graaf et al., 2013).

Мультиплексный ПЦР метод, описанный Hum et al. (1997), позволяет амплифицировать *C. fetus*-специфичный фрагмент ДНК (примерно на 200 п.н. короче, чем фрагмент длиной 960 п.н., описанный в первоначальной публикации), а также фрагмент, специфичный для *C. fetus* subsp. *venerealis*. Сравнение данного метода ПЦР с AFLP и MLST (van Bergen et al., 2005a) и с тестом на толерантность к глицину (Willoughby et al., 2005) подтверждает, что ПЦР может показывать ложноположительные и ложноотрицательные реакции (van der Graaf et al., 2013). В проведенном недавно исследовании данный метод ПЦР показал положительный результат со штаммом *C. hyointestinalis*, выделенным у быка (Spence et al., 2011). Учитывая эти данные, целевой ген, специфичный для Cfv, а, следовательно, и все другие методы ПЦР, нацеленные на эту мишень, не могут быть использованы в диагностических целях.

Метод ПЦР, разработанный Wang et al. (2002), позволяет обнаруживать только продукт, специфичный для *C. fetus* subsp. *fetus*. Эти результаты были получены только по очень ограниченному количеству штаммов. В ходе оценки пригодности данного метода для дифференциации подвидов с использованием более крупных выборок штаммов были получены ложноположительные и ложноотрицательные реакции (Van Bergen et al., 2005c; Van der Graaf et al., 2013).

Tu et al. (2005) описывали методы ПЦР с анализом случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD), однако, авторы проводили оценку данного метода с использованием очень небольшого количества штаммов *C. fetus* subsp. *venerealis*. В недавно проведенном исследовании чувствительность данного метода оказалась очень низкой (Van der Graaf et al., 2013).

2. Серологические тесты – обнаружение антител

Существуют методы ИФА для детекции антиген-специфичных секреторных иммуноглобулинов А в вагинальной слизи коровы, абортировавшей вследствие заражения *C. fetus* subsp. *venerealis*. Антитела являются достаточно стойкими, при этом их концентрация в вагинальной слизи остается постоянной в течение нескольких месяцев (Hum et al., 1991). Данный метод ИФА не позволяет дифференцировать гуморальный ответ к различным видам данного патогена.

Первый отбор проб проводят на стадии ранней инволюции (обычно через 1 неделю после аборта), когда слизь становится прозрачной.

Ниже представлено описание метода ИФА для детекции сывороточного гуморального ответа в виде выработки IgG после вакцинации.

2.1. Подготовка антигена и сенсibilизация планшетов

Культуры переносят в ФБР с добавлением 0,5% формалина на 1 час, затем центрифугируют при 17000 g, дважды промывают в ФБР, а затем ресуспендируют в 0,05 моль карбонатного буфера, pH 9,6. Конечную оптическую плотность корректируют до $ОП_{610 \text{ нм}} = 0,21$. Плоскодонные полистироловые планшеты сенсibilизируют антигеном в объеме 10 мкл и оставляют на ночь при 4°C, а затем хранят при -20°C. Перед использованием планшеты дважды промывают дистиллированной водой, а затем легким постукиванием удаляют остаточную влагу.

2.1.1. Процедура исследования

- i) Разведенную вагинальную слизь (100 мкл) вносят в каждую лунку, и планшеты инкубируют при 37°C в течение 2 часов. Затем планшеты промывают, как описано выше, и вносят 100 мкл кроличьего антибычьего IgA. После инкубирования в течение 2 часов при 37°C планшеты промывают и в каждую лунку вносят по 100 мкл кроличьего IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена. После инкубирования в течение 2 часов при 37°C планшеты промывают и вносят по 100 мкл субстрата (0,8 мг/мкл 5-аминосалициловой кислоты; pH 6,0), который сразу активируют добавлением 2% 1 моль перекиси водорода. Планшеты оставляют при комнатной температуре в течение 30 минут, затем реакцию останавливают путем добавления 50 мкл 3 моль гидроксида натрия. Показатель оптической плотности измеряют в ИФА ридере при длине волны 450 нм. Каждый образец тестируют в двойном экземпляре с включением в каждый планшет положительных и отрицательных контролей. Показатели оптической плотности, полученные по исследуемым образцам, корректируют по значениям ОП положительных и отрицательных контролей по следующей формуле:

$$\text{Результат} = \frac{ОП_{\text{образец}} - ОП_{\text{отрицательный контроль}}}{ОП_{\text{положительный контроль}} - ОП_{\text{отрицательный контроль}}} \times 100$$

- ii) Тест считают положительными, если результат превышает 40. У вакцинированных животных реакция в ИФА с IgA отсутствует, так как их вагинальная слизь содержит только антитела изотипа IgG.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОПРЕПАРАТАМ

ДАННЫЙ РАЗДЕЛ БЫЛ ПРИНЯТ В 2008 ГОДУ И В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ
НАХОДИТСЯ В СТАДИИ РЕДАКТИРОВАНИЯ

В некоторых странах существуют коммерческие вакцины для овец и КРС. Выявлены две группы антигенов *C. fetus*: термолабильные “Н” жгутиковые антигены и термостабильные “О” соматические антигены. Кроме того, должен присутствовать капсульный антиген “К”. Антиген К легко разрушается в условиях *in vitro*. Вакцина должна включать эти разные антигены. Описаны и другие вакцинные препараты (Clarke et al., 1972). Экспериментальная вакцина на основе *C. fetus subsp. fetus* обеспечивает иммунитет против *C. fetus subsp. venerealis*, поскольку оба штамма имеют общие антигены (Bouters et al., 1973), однако, в препарат часто добавляют и второй штамм *C. fetus subsp. venerealis*. Особенно важно присутствие 4-5 термолабильных гликопротеинов, присутствующих во многих штаммах *C. fetus subsp. venerealis* и *C. fetus subsp. fetus*, хотя это требует дополнительного подтверждения. Для получения хорошего уровня защиты концентрация вакцины (сухая масса) должна составлять около 40 мг белка на дозу.

В инфицированных стадах всех племенных животных (быков, коров и телочек) вакцинируют дважды перед случным сезоном. В большинстве случаев применение вакцины сокращает продолжительность инфекции, а коровы-носители могут передавать инфекцию от одного сезона к следующему. Быков необходимо прививать двумя дозами ежегодно, поскольку вакцина не всегда эффективна для искоренения уже укоренившихся инфекций. На следующий год вакцинируют быков и ремонтных телочек, а начиная с третьего года, быков вакцинируют ежегодно.

В неинфицированных стадах вакцинируют только быков ежегодно: два раза в год (по две дозы с интервалом 21 день; за 2 недели до начала случного сезона).

1. Управление посевным материалом

1.1. Характеристика посевного материала

Посевной материал представляет собой крупную, гомогенную серию культуры *C. fetus subsp. fetus* или *C. fetus subsp. venerealis* с полностью изученными параметрами подлинности и чистоты. Посевной материал хранится в небольших аликвотах.

1.2. Способ культивирования

Первоначальное культивирование посевного материала осуществляют в полутвердой среде, которая состоит из базальной среды с добавлением 0,16% агара. Базальная среда включает 2,8% бульона для культивирования бруцелл, 0,5% экстракта дрожжей, 1,2% сукцината натрия и 0,001% хлорида кальция. Первую культуру инкубируют в течение 3 дней при 37°C в описанных условиях (см. Раздел В.1.4.2). Затем полученный материал переносят в дополнительные пробирки с полутвердой средой и инкубируют в течение 48 часов. Полученный материал используют для производства вакцины.

Культуру следует хранить при 4°C.

1.3. Валидация в качестве вакцины

Посевной материал должен быть свободен от контаминирующих организмов. Чистоту посевного материала проверяют с помощью подходящего метода культивирования.

В лабораторных условиях испытание эффективности вакцины проводить не целесообразно, поэтому такое испытание проводят в поле на основе эпизоотологических наблюдений.

2. Способ производства

Рабочий посевной материал высевают в бульонную среду, представляющую собой базальную среду с добавлением 0,025% тиогликолята натрия. Культуры инкубируют при 37°C в течение 24 часов со встряхиванием на шейкере со скоростью 80 об/мин. Жидкости собирают и добавляют формальдегид до конечной концентрации 0,2% (0,74 г/литр).

Вакцину смешивают с масляным адьювантом.

3. Контроль в процессе производства

Необходимо подтвердить идентичность микроорганизма методом культивирования и идентификации, а также убедиться в отсутствии контаминирующих микроорганизмов.

4. Контроль серии

4.1. Стерильность

Испытания на стерильность и свободу от контаминации биологических материалов, предназначенных для ветеринарного применения, описаны в Главе 1.1.9.

4.2. Безопасность

Требуется подтверждение завершения процесса инаktivации. Метод инаktivации должен быть валидирован до его применения. Полноту инаktivации проверяют путем введения препарата в объеме и концентрации, эквивалентной одной дозе, в ту же среду при тех же условиях, что и во время процесса производства. Эту культуру инкубируют при тех же условиях в течение 72 часов, после чего бактериальный рост в культуре должен отсутствовать. С использованием подходящих методов культивирования необходимо также продемонстрировать свободу конечного продукта от контаминации жизнеспособными бактериями и грибами.

Двум морским свинкам внутримышечно или подкожно вводят препарат в объеме 2 мл. В течение 7-дневного периода наблюдения у животных должны отсутствовать нежелательные реакции, связанные с введением вакцины.

4.3. Иммуногенность

Иммуногенность вакцины оценивают по уровню сероконверсии у кроликов. Титры антител в сыворотке животных измеряют в реакции иммунофлуоресценции или в

реакции агглютинации в пробирке. Пяти кроликами (сероотрицательным по результатам исследования сывороток в разведении 1/100) вводят вакцину подкожным способом в дозе, равной половине дозы для КРС, дважды с интервалом в 14 дней. В сыворотке, как минимум, четырех из пяти животных, собранной через 14 дней после второй иммунизации, должно наблюдаться четырехкратное увеличение титра антител.

5. Испытания готового препарата

5.1. Безопасность

См. Раздел С.4.2.

5.2. Иммуногенность

См. Раздел С.4.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ABRIL C., VILEI E.M., BRODARD I., BURNENS A., FREY J. & MISEREZ R. (2007). Discovery of Insertion Element ISCfe1: A new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13, 993–1000.
- BESSEDE E., SOLECKI O., SIFRE E., LABADI L. & MEGRAUD F. (2011). Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17, 1735–1739.
- BOUTERS R., DE KEYSER J., VANDEPLASSCHE M., VAN AERT A., BRONE E. & BONTE P. (1973). *Vibrio fetus* infections in bulls: curative and preventive vaccination. *Br. Vet. J.*, 129, 52–57.
- BROOKS B.W., DEVENISH J., LUTZE-WALLACE C.L., MILNES D., ROBERTSON R.H. & BERLIE-SURUJBALLI G. (2004). Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Vet. Microbiol.*, 103 (1–2), 77–84.
- BROOKS B.W., ROBERTSON R.H., LUTZE-WALLACE C.L. & PFAHLER W. (2002). Monoclonal antibodies specific for *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. *Vet. Microbiol.*, 87, 37–49.
- CAMPERO C.M., MOORE D.P., ODEON A.C., CIPOLLA A.L. & ODRIOZOLA E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.*, 27, 359–369.
- CHANG W. & OGG J.E. (1971). Transduction and mutation to glycine tolerance in *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.*, 32, 649–653.
- CLARKE B.L. & DUFTY J.H. (1978). Isolation of *Campylobacter fetus* from bulls. *Aust. Vet. J.*, 54, 262–263.
- CLARKE B.L., DUFTY J.H. & MONSBOURGH M.J. (1972). Immunisation against bovine vibriosis. 1. Comparison of the protective properties of bacterins prepared by two methods. *Aust. Vet. J.*, 48, 376–381 and 382–384.

- DEVENISH J. BROOKS B., PERRY K., MILNES D., BURKE T., MCCABE D., DUFF S. & LUTZE-WALLACE C.L. (2005). Validation of a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12, 1261–1268.
- FITZGERALD C., TU Z.C., PATRICK M., STILES T., LAWSON A.J., SANTOVENIA M., GILBERT M.J., VAN BERGEN M., JOYCE K., PRUCKLER J., STROIKA S., DUIM B., MILLER W.G., LOPAREV V., SINNIGE J.C., FIELDS P.I., TAUXE R.V., BLASER M.J. & WAGENAAR J.A. (2014). *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2944–2948.
- FLORENT A. (1959). Les deux vibrioses génitales de la bête bovine : La vibriose vénérienne, due à *Vibrio foetus venerialis*, et la vibriose d'origine intestinale due à *V. foetus intestinalis*. *Proceedings 10th International Veterinary Congress Madrid*, 2, 953–957.
- GARCIA M.M., EAGLESOME M.D. & RIGBY C. (1983). *Campylobacters* important to veterinary medicine. *Vet. Bull.*, 53, 793–818.
- GARCIA M.M., STEWART R.B. & RUCKERBAUER G.M. (1984). Quantitative evaluation of a transport-enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Vet. Rec.*, 115, 434–436.
- GORKIEWICZ G., FEIERL G., SCHOBER C., DIEBER F., KÖFER J., ZECHNER R. & ZECHNER E.L. (2003). Species-specific identification of *Campylobacters* by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 2537–2546.
- HARLOW E. & LANE D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA. HARVEY S.M. & GREENWOOD J.R. (1983). Relationship among catalase-positive *Campylobacters* determined by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridisation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33, 275–284.
- HUM S., BRUNNER J., MCINNES A., MENDOZA G. & STEPHENS J. (1994). Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Aust. Vet. J.*, 71, 184–186.
- HUM S., QUINN K., BRUNNER J. & ON S.L.W. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.*, 75, 827–831.
- HUM S., STEPHENS L.R. & QUINN C. (1991). Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Aust. Vet. J.*, 68, 272–275.
- IRAOLA G., BETANCOR L., CALLEROS L., GADEA P., ALGORTA G., GALEANO S., MUXI P., GREIF G. & PEREZ R. (2015). A rural worker infected with a bovine-prevalent genotype of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* supports zoonotic transmission and inconsistency of MLST and whole-genome typing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 34, 1593–1596.
- MCGOLDRICK A., CHANTER J., GALE S., PARR J., TOSZEGHY M. & LINE K. (2013). Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. *J. Microbiol. Methods*, 94, 199–204.
- MCMILLEN L., FORDYCE G., DOOGAN V.J. & LEW A.E. (2006). Comparison of culture and a novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 938–945.

- MELLICK P. W., WINTER A.J. & MCENTEE K. (1965). Diagnosis of vibriosis in the bull by use of the fluorescent antibody technic. *Cornell Vet.*, 55, 280–294.
- MONKE H.J., LOVE B.C., WITTUM T.E., MONKE D.R. & BYRUM B.A. (2002). Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J. Vet. Invest.*, 14, 35–39
- ON S.L.W. (1996). Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters* and related organisms. *Clin. Microb. Rev.*, 9, 405–422.
- ON S.L.W. & HARRINGTON C.S. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16s rDNA sequencing methods. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 285–293.
- SALAMA S.M., GARCIA M.M. & TAYLOR D.E. (1992). Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *Int. J. Syst. Bact.*, 42, 446–450.
- SPENCE R.P., BRUCE I.R., MCFADDEN A.M., HILL F.I., TISDALL D., HUMPHREY S., VAN DER GRAAF L., VAN BERGEN M.A. & WAGENAAR J.A. (2011). Cross-reaction of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time PCR. *Vet. Rec.*, 168, 131. Steele T.W. & McDermott S.N. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*, 16, 263–265.
- TEDESCO L.F., ERRICO F. & DEL BAGLIVI P.L. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust. Vet. J.*, 53, 470–472.
- TU Z.C., EISNER W., KREISWIRTH B.N. & BLASER M.J. (2005). Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 3334–3340.
- VAN BERGEN M.A.P., DINGLE K.E., MAIDEN M.C., NEWELL D.G., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN PUTTEN J.P. & WAGENAAR J.A. (2005a). Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 5888–5898.
- VAN BERGEN, M.A.P., LINNANE S., VAN PUTTEN J.P. & WAGENAAR J.A. (2005b). Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24, 1017–1026.
- VAN BERGEN M. A. P., SIMONS G., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN PUTTEN J.P., ROMBOUT J., WESLEY I. & J. WAGENAAR J.A. (2005c). Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *J. Med. Microbiol.*, 54, 1217–1224.
- VANDAMME P. (2000). Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: *Campylobacter*, Second Edition Nachamkin I. & Blaser M.J., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
- VANDAMME P., POT B., FALSEN E., KERSTERS K. & DE LEY J. (1990). Intra- and interspecific relationships of veterinary *Campylobacters* revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DNA:DNA hybridizations. *System. Appl. Microbiol.*, 13, 295–303. VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L.,
- VAN BERGEN M.A.P., VAN DER WAL F.J., DE BOER A.G., DUIM B., SCHMIDT T & WAGENAAR J.A. (2013). Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter*

fetus species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods*, 95, 93–97.

VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., MILLER W.G., YEE E., RIJNSBURGER M., WAGENAAR J.A. & DUIM B. (2014). Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires reevaluation of current diagnostics. *J. Clin. Microbiol.*, 52, 4183–4188.

VÉRON M. & CHATELAIN R. (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23, 122–134.

WAGENAAR J.A., VAN BERGEN M.A.P., BLASER M.J., TAUXE R.V., NEWELL D.G. & VAN PUTTEN J.P.M. (2014). *Campylobacter fetus* infections in humans: exposure and disease. *Clin. Infect. Dis.*, 58, 1579–1586.

WAGENAAR J.A., VAN BERGEN M.A.P., NEWELL D.G., GROGONO-THOMAS R. & DUIM B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2283–2286.

WANG G., CLARK C.G., TAYLOR T.M., PUCKNELL C., BARTON C., PRICE L., WOODWARD D.L. & RODGERS F.G. (2002). Colony multiplex PCR assay for the identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 4744–4747.

WILLOUGHBY K., NETTLETON P.F., QUIRIE M., MALEY M.A., FOSTER G., TOSZEGHY M. & NEWELL D.G. (2005). A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 758–766.

*

* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ генитальному кампилобактериозу КРС (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или обратитесь на сайт МЭБ для получения наиболее актуального списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Дополнительную информацию о диагностических тестах, реактивах и вакцинах против гриппа птиц можно получить в Референтных лабораториях МЭБ