

ГЛАВА 3.7.8.
ЭПИДИДИМИТ ОВЕЦ
(*Brucella ovis*)

РЕЗЮМЕ

Бактерии Brucella ovis являются возбудителями инфекционной болезни овец, клинически или бессимптомно протекающей, которая характеризуется поражением половых органов и снижением репродуктивной функции у баранов, воспалением плаценты и абортами у овцематок, перинатальной смертностью у ягнят. Болезнь зарегистрирована в странах Америки и Европы, а также в Австралии, Новой Зеландии и Южной Африке, и вероятно, встречается в большинстве овцеводческих стран.

Идентификация возбудителя: *Клинические признаки поражения (эпидидимит и орхидидимит) у баранов могут указывать на наличие инфекции, однако для подтверждения болезни следует проводить лабораторные исследования. Лабораторное подтверждение проводят прямыми или косвенными методами. Прямую диагностику проводят путем бактериологического выделения культуры *B. ovis* из образцов спермы или тканей баранов, или из вагинальных выделений, молока и тканей овцематок, на соответствующей селективной питательной среде. Разработаны молекулярные методы для комплементарной идентификации на основе специфичных геномных последовательностей. Методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут служить дополнительным средством выявления болезни. Однако косвенные методы на основе серологических тестов предпочтительны для рутинной диагностики.*

Серологические тесты: *Для диагностики применяют следующие тесты: реакция связывания комплемента (РСК), реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) и непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (н-ИФА) с использованием растворимых поверхностных антигенов, полученных из штамма REO 198 *B. ovis*. Тесты РИД и н-ИФА имеют одинаковую чувствительность, которая превосходит чувствительность РСК. Наилучшие результаты в плане чувствительности могут быть получены при параллельном использовании РИД и н-ИФА, однако, по легкости и стоимости тестирование методом РИД является наиболее приемлемым для диагностирования *B. ovis* в неспециализированных лабораториях. Тем не менее, из-за отсутствия признанных на международном уровне стандартизированных методов для РИД и н-ИФА наиболее подходящим тестом для сертификации отдельных животных перед перемещением, в том числе в целях международной торговли, остается анализ методом РСК.*

Требования к вакцинам: *Культуры для посева для производства вакцин следует получать в лабораториях, пользующихся международным признанием. Разовая стандартная доза (10^9 колониеобразующих единиц) живой вакцины из штамма Rev.1 *B. melitensis*, вводимая подкожно, или лучше конъюнктивальным методом, может надежно и эффективно использоваться для защиты баранов от инфицирования *B. ovis*. Данный вакцинный штамм должен соответствовать минимальным стандартам качества: безопасность для животного-хозяина, эффективная концентрация, отсутствие диссоциации, соответствующая остаточная вирулентность, наличие иммуногенности (эффективности действия) и отсутствие посторонних веществ (см. Главу 2.1.4 Бруцеллёз [*Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*]).*

А. ВВЕДЕНИЕ

1. Определение болезни

Brucella ovis вызывает болезнь только у овец, является наиболее частой причиной эпидидимита у баранов и, в редких случаях, бесплодия и абортотворения у овцематок, а также ранней смертности у ягнят.

2. Возбудитель болезни

Brucella ovis и *B. canis* – два известных в настоящее время вида бактерий рода *Brucella* в шероховатой фазе. *Brucella ovis* имеет сходство с другими видами *Brucella* по морфологии, окрашиваемости и культуральным свойствам, за исключением того, что она дает отрицательные реакции на оксидазные и уреазные тесты. Микробиологические и серологические свойства всех видов и биоваров *Brucella* подробно описаны в Главе 2.1.4 Бруцеллёз (*Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*).

3. Описание болезни

Инфекционная болезнь, вызываемая бактериями *Brucella ovis*, проявляется поражением половых органов (эпидидимит и орхиэпидидимит) и бесплодием у баранов, воспалением плаценты, абортотворением и бесплодием у овцематок, перинатальной смертностью у ягнят. *Brucella ovis* обычно выделяется со спермой инфицированных баранов. Передача возбудителя осуществляется, в основном, половым путем при осеменении овцематок, однако, так же часто встречается перезаражение баранов (Blasco, 1990; 2010). В условиях полуживотноводческих систем (наиболее распространенных в европейских средиземноморских странах) баранов обычно содержат вместе. Таким образом, прямое перезаражение баранов в периоды анэструса происходит довольно часто и, предположительно, возникает несколькими способами, в частности, при совокуплении через задний проход и, чаще, через орально-генитальный контакт (вылизывание препуция).

Кроме того, инфицированные овцематки могут выделять *B. ovis* с вагинальными выделениями и молоком, и, соответственно, передача возбудителя от овцы барану, от лактирующей овцематки ягненку также может быть обуславливающим механизмом передачи инфекции. Соответственно, овцематок следует считать релевантными в эпидемиологии инфекции, и это должно учитываться для эффективного искоренения *B. ovis* в инфицированных стадах (Blasco, 2010; Grilló *et al.*, 1999).

Болезнь зарегистрирована в странах Америки и Европы, а также в Австралии, Новой Зеландии и Южной Африке, и вероятно, встречается в большинстве овцеводческих стран.

Выявление поражений половых органов (односторонний или двусторонний эпидидимит и орхиэпидидимит) при пальпации семенников баранов может свидетельствовать о наличии данной инфекции в стаде. Однако клиническая диагностика лишена чувствительности, поскольку не у всех баранов, инфицированных *B. ovis*, пальпируются поражения половых органов (Blasco, 1990). Кроме того, клиническая диагностика лишена специфичности, так как многие другие бактерии могут вызывать поражения половых органов у баранов. Наиболее часто встречающиеся патогены, вызывающие такие поражения у баранов: *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis*, виды *Haemophilus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *B. melitensis*, *Chlamydia abortus* и виды *Pasteurella* (Bulgin & Anderson, 1983; Garcia-Pastor *et al.*, 2009; Livingstone & Hardy, 1964). Более того, необходимо подчеркнуть, что многие пальпируемые поражения семенников у баранов – это проявление стерильной сперматогенной гранулемы, вызванной травмой.

Несмотря на экспериментальное доказательство восприимчивости к *B. ovis* у крупного рогатого скота, коз и оленей при искусственном переносе, случаи заболевания в естественной среде зарегистрированы только у благородных оленей, разводимых в тесном контакте с инфицированными баранами (Ridler *et al.*, 2012).

4. Зоонозный риск и требования к биобезопасности

На сегодняшний день не зарегистрировано случаев заболевания среди людей, и *B. ovis* считается неззоонозной инфекцией. Однако в регионах, одновременно неблагополучных по *B. melitensis* и *B. ovis*, требуется особая осторожность при обращении с пробами, которые должны доставлять в лабораторию в герметичных контейнерах (подробнее см. Главу 2.1.4 Бруцеллёз (*Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*) и Главу 1.1.3 *Транспортировка проб животного происхождения*). Все процедуры, проводимые в лаборатории с живыми культурами или потенциально зараженным/инфицированным материалом, должны проводиться на соответствующем уровне биологической безопасности и защиты, определяемом анализом биориска (Глава 1.1.4 *Биобезопасность и биоащита: Стандарт для управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и виварии*).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследования для диагностики инфекции *Brucella ovis*

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных до перемещения ^a	Содействие политике искоренения ^b	Подтверждение клинических случаев ^c	Подтверждение подозрительных случаев ^d	Превалентность инфекции в стаде – Надзор
Идентификация возбудителя¹						
Методы окрашивания	–	–	–	+	–	–
Культивирование	–	–	–	+++	+/>++ ^d	–
ПЦР^e	–	–	–	+/>++	+/>++	–
Определение иммунного ответа						
РСК	+++	+++	+++	++	++	++
н-ИФА	+++	+++	+++	++	++	+++
РИД	++	++	+++	++	++	++

Обозначения: +++ = рекомендованный метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых случаях, однако, стоимость, надежность или иные факторы существенно ограничивают его применение; – = не подходит для данной цели; н/п = не применяется. Несмотря на то, что не все тесты, включенные в категорию +++ или ++, прошли официальную валидацию, установившаяся практика и факт широкого применения при отсутствии сомнительных результатов делает их приемлемыми. ПЦР = полимеразная цепная реакция; РСК = реакция связывания комплемента; н-ИФА = непрямой твердофазный иммуноферментный анализ; РИД = иммунодиффузия в агаровом геле.

^aОтносится только к стадам/отарам, странам или зонам, свободным от инфекции *Brucella ovis*.

^bДля повышения эффективности мер по искоренению болезни в инфицированных стадах/отарах, с целью повышения чувствительности диагностического исследования, рекомендуется проводить одновременно несколько тестов: как минимум два серологических теста, например, РСК (или РИД) и н-ИФА;

^cВ регионах с низкой превалентностью инфекции или при ее почти полном отсутствии прогностическая ценность положительных результатов серологических тестов может быть очень низкой. В таком случае, обычно требуется идентификация возбудителя для подтверждения клинических случаев. В инфицированных стадах/отарах положительный результат любого серологического теста считается подтверждением клинического случая.

^dВ инфицированных стадах/отарах животное с положительной реакцией на серологический тест считается инфицированным. В регионах с низкой превалентностью инфекции или при ее почти полном отсутствии единичный случай положительного результата серологического теста должен подтверждаться методом культивирования (и/или ПЦР). В странах или зонах, свободных от инфекции, подозрение на болезнь у отдельных животных возникает после получения положительного результата в скрининговом тесте и в подтверждающем серологическом тесте (серии тестов, например, н-ИФА и РСК соответственно) и требует подтверждения методами культивирования (и/или ПЦР).

^eВозможно получение ложноположительных результатов.

¹ Рекомендуется использование комбинации методов идентификации возбудителя, применяемых к одному и тому же клиническому препарату.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Отбор проб

Для выделения *B. ovis* наиболее ценными пробами от живых животных являются сперма, вагинальные смывы и молоко. Процедура забора вагинальных смывов и молока изложена в Главе 2.1.4. Сперму (генитальные жидкости) отбирают из смывов с препуциальной полости баранов после электроэякуляции. Возможен другой вариант: мазки берут напрямую из вагины овцематки, не зараженной бруцеллезом, сразу после случки с подозрительным на заболевание бараном. Бараны с клиническими или субклиническими признаками болезни могут периодически выделять *B. ovis* со спермой в течение нескольких лет (Blasco, 2010). Наиболее рекомендуемыми пробами для выделения *B. ovis* от инфицированных овцематок являются вагинальные смывы, взятые после аборта или рождения недоношенного ягненка, а также пробы молока (Grilló *et al.*, 1999).

Для наиболее вероятностного выделения *B. ovis* после аутопсии предпочтительным патологическим материалом являются придатки, семенные пузырьки, ампулы и паховые лимфатические узлы баранов, от овец – матка, подвздошные и надвыменные лимфатические узлы. Однако для получения максимальной чувствительности следует проводить полное обследование, которое охватывает другие органы и лимфатические узлы (селезёнка, краниальные, лопаточные, префemorальные и семенниковые лимфатические узлы) (Blasco, 2010). Мертвых ягнят и плаценты также исследуют. Предпочтительными участками для бактериологического исследования у абортированных или мертворожденных ягнят являются сычужное содержимое и легкое.

Образцы, отобранные для бактериологического исследования, немедленно охлаждают и транспортируют в лабораторию. Микроорганизм живет 48-72 часа при комнатной температуре, но, если исследование необходимо отложить на более поздний срок, жизнестойкость увеличивают за счет охлаждения или, лучше, замораживания образцов тканей.

1.2. Методы окрашивания

Мазки спермы или вагинальные мазки от животных с клиническими признаками болезни исследуют после окрашивания по методу Стампа (Alton *et al.*, 1988) (см. Главу 2.1.4), типичные коккобактерии могут быть обнаружены у многих инфицированных животных. Исследование окрашенных по Стампу мазков подозрительных тканей (половые пути, паховые лимфатические узлы баранов, плаценты, а также сычужное содержимое и легкие плодов) также дает возможность быстро поставить предварительный диагноз. Однако другие бактерии со схожей морфологией или типом окрашивания (*B. melitensis*, *Coxiella burnetii* и *Chlamydia abortus*) также могут присутствовать в таких образцах, что затрудняет постановку диагноза для малоопытного персонала. По этой причине результаты микроскопии следует всегда подтверждать культивированием микроорганизма.

1.3. Культивирование

Ввиду специфичности микроорганизма наилучшим прямым методом диагностики является выделение и идентификация *B. ovis* из жидкостей и тканей овец, а также, при положительном результате, единственным неопровержимым доказательством наличия инфекции *B. ovis* у животного или в стаде. Образцы спермы, вагинальных смывов или молока наносят на планшеты с соответствующими питательными средами и инкубируют при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в атмосфере, содержащей 5-10% углекислого газа. Перед посевом ткани мацерируют в небольшом количестве стерильного физиологического раствора или фосфатно-буферного раствора (ФБР) и растирают с использованием гомогенизатора или измельчителя тканей. Следует принять во внимание, что чем больше гомогенатов ткани и чашек с посевом на диагностический образец, тем выше чувствительность диагностики.

Обычно рост наблюдается через 3-4 дня инкубации, однако, культуры не стоит отбраковывать как отрицательные до истечения 7 дней. Колонии *B. ovis* становятся видимыми

(0,5–2,5 мм) через 3–4 дня инкубации, являются шероховатыми, круглыми, блестящими и выпуклыми.

Brucella ovis можно выделить в неселективной среде, такой как основа кровяного агара, обогащенная 10% стерильной овечьей или бычьей сывороткой, или в среде с кровяным агаром и 5–10% стерильной овечьей кровью. Тем не менее, поскольку на первичное выделение требуется 4–7 дней инкубации, разрастающиеся грибки и комменсальные бактерии часто контаминируют культуральные планшеты с неселективными средами, что ведет к снижению диагностической чувствительности. Таким образом, использование селективных питательных сред является исключительно важным условием для правильной бактериологической диагностики инфекции *B. ovis*. Модифицированная селективная среда Фаррелла, широко используемая для выделения гладких *Brucella* (см. Главу 2.1.4), ингибирует рост *B. ovis*, и ее не следует использовать (Marin *et al.*, 1996). Описаны различные селективные среды, однако, для выделения *B. ovis* классически используют модифицированную среду Тайера-Мартина (mTM) (Marin *et al.*, 1996). Данную среду готовят с основой питательной среды ГК (38 г/л Difco, США) и добавками: гемоглобин (10 г/л) и метансульфонат колистина (7,5 мг/л), ванкомицин (3 мг/л), нитрофурантоин (10 мг/л), нистатин (100 000 международных единиц [МЕ]/л = 17,7 мг) и амфотерицин В (2,5 мг/л). Рабочий раствор готовят следующим образом:

Раствор А: Добавляют 500 мл дистиллированной воды к основе питательной среды ГК, осторожно нагревают, постоянно помешивая и не давая среде подгореть, автоклавируют при 120°C в течение 20 минут.

Раствор В: Суспендируют гемоглобин в 500 мл дистиллированной воды, добавляя воду постепенно, избегая образования комков. После растворения вводят магнитное перемешивающее устройство и автоклавируют при 120°C в течение 20 минут.

Антибиотические растворы (свежеприготовленные): колистин, нистатин и ванкомицин суспендируют в смеси метанол/вода (1/1); нитрофурантоин суспендируют в 1 мл 0,1 моль стерильного раствора NaOH. Для амфотерицина В рекомендуется приготовить базовый 10 мг/мл раствор: 10 мг амфотерицина В сначала растворяют в 1 мл стерильного диметилсульфоксида (C₂H₆OS, аналитическая степень чистоты), а затем добавляют к 9 мл стерильного ФБР (10 ммоль, рН 7,2 ± 0,1). Оставшийся базовый раствор можно хранить 5 дней при 5°C ± 3°C. Перед внесением в питательную среду все антибиотические растворы процеживают через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Существует другая пригодная, но менее эффективная, комбинация антибиотиков: ванкомицин (3 мг/л); колистин (7,5 мг/л); нистатин (12 500 МЕ/л); и нитрофурантоин (10 мг/л).

После автоклавирования стабилизируют температуру (45–50°C) растворов А и В, постоянно помешивая. Смешивают оба раствора (добавляя А к В), избегая образования пузырьков. Добавляют антибиотические растворы, аккуратно и постоянно помешивая, затем разливают в стерильные планшеты. Подготовленные планшеты не следует хранить долгое время, рекомендуется всегда использовать свежеприготовленные питательные среды.

Однако среда mTM не прозрачна, поскольку содержит в своем составе гемоглобин, что делает её непригодной для прямого наблюдения морфологии колоний, которое имеет важное практическое значение, поскольку является, вероятно, самым широко используемым способом предварительной идентификации *Brucella* (Alton *et al.*, 1988). С учетом данного факта не так давно была разработана новая питательная среда (СІТА) с использованием основы кровяного агара с добавлением 5% стерильной телячьей сыворотки и антибиотиков: ванкомицин (20 мг/л), метансульфонат колистина (7,5 мг/л), нитрофурантоин (10 мг/л), нистатин (100 000 МЕ/л) и амфотерицин В (4 мг/л). Эту смесь антибиотиков готовят, как указано выше в инструкции по приготовлению среды mTM. Данная новая среда СІТА ингибирует большинство контаминирующих микроорганизмов, однако, обеспечивает рост всех видов *Brucella*. Кроме того, среда СІТА превосходит mTM по выделению *B. ovis* и отличается более высокой чувствительностью, чем mTM и среда Фаррелла, для выделения всех видов гладких *Brucella* из

полевых образцов, таким образом, являясь самой подходящей селективной средой для выделения *Brucella* (De Miguel *et al.*, 2011).

Все используемые питательные среды подлежат контролю с использованием эталонных штаммов для проверки их качества.

1.4. Идентификация и типирование

Колонии *Brucella ovis* не являются гемолитическими. Бактерии образуют шаровидные, выпуклые, с ровными краями колонии, всегда шероховатые в косом освещении, положительно реагируют на акрифлавиновый тест (Alton *et al.*, 1988). Для роста бактерии *B. ovis* требуется инкубация в атмосфере с 5–10% содержанием CO₂. У бактерии отсутствует уреазная активность, она не восстанавливает нитраты до нитритов, и является оксидаза-отрицательной. Бактерия не продуцирует H₂S и, хотя не растет в присутствии метилового фиолетового, обычно растет в присутствии тионина в стандартных концентрациях. Культуры не лизируются бруцеллезным фагами Тбилиси (Тб), Уэйбридж (Wb) и Изатнагар (Iz₁) при стандартном рабочем разведении (RTD) или 104 RTD, тогда как они лизируются фагами R/C (Alton *et al.*, 1988). Многие лаборатории недостаточно оснащены для проведения полной идентификации *Brucella* на уровнях видов и биоваров и нуждаются в эффективных схемах предварительной идентификации. Большинство изолятов *B. ovis* можно безошибочно идентифицировать по особенностям роста, путем прямого наблюдения с использованием косо отраженного света, методом окрашивания по Граму или Стампу, с помощью тестов на каталазу, оксидазу, уреазу и с акрифлавином. Однако точную идентификацию рекомендуется проводить в референтных лабораториях, имеющих опыт в идентификации и типировании *Brucella*.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и другие недавно разработанные методы молекулярной диагностики являются дополнительными средствами выявления и идентификации видов *Brucella* (см. Главу 2.1.4) и становятся рутинными для большинства диагностических лабораторий. Наличие образцов спермы, интенсивно контаминированных разросшимися организмами или содержащих мертвые *B. ovis*, также может являться основанием для использования ПЦР в качестве дополнительного прямого метода диагностики. Более того, некоторые процедуры ПЦР показали такую же чувствительность, что и стандартное бактериологическое исследование, при анализе образцов спермы от баранов, инфицированных *B. ovis* (Xavier *et al.*, 2010). Тем не менее, следует должным образом определить чувствительность и специфичность таких прямых диагностических ПЦР процедур на других клинических образцах, а пока традиционный бактериологический анализ считается предпочтительным методом бактериологической диагностики *B. ovis*. Однако мультиплексная Bruce-ladder-ПЦР (см. Главу 2.1.4) на образцах ДНК, экстрагированной из колоний культур, является быстрым и высокоспецифичным методом идентификации большинства видов *Brucella*, включая *B. ovis*.

2. Серологические исследования

Наиболее эффективными и широко используемыми тестами являются реакция связывания комплемента (РСК), реакция двойной иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) и непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (н-ИФА). В ряде стран приняты различные стандартные диагностические методы для *B. ovis*, но единственным тестом, признанным МЭБ и Евросоюзом (ЕС) наиболее подходящим для сертификации отдельных животных перед перемещением, в том числе в целях международной торговли, является РСК. Тем не менее, РИД тест показал такую же чувствительность, что и РСК, и он более прост в проведении. Кроме того, несмотря на отсутствие международной стандартизации, многочисленные независимые валидационные исследования показали, что н-ИФА отличается более высокой чувствительностью, чем РСК или РИД. Тест РИД и н-ИФА отмечались как более чувствительные, чем РСК. Но в то же время сообщалось, что метод н-ИФА менее специфичен, однако, это в значительной степени зависит от используемого протокола (Estein *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2004; Praud *et al.*, 2012).

Международная стандартная сыворотка против *Brucella ovis* (ISaBoS, Международный стандарт 1985²) – эталон, по которому проверяют все другие стандарты. Такой референтный стандарт имеется в национальных референтных лабораториях и используется для создания вторичных или национальных стандартов, по которым готовят рабочие стандартные образцы, ежедневно используемые диагностическими лабораториями.

HS антигены для использования в серологических тестах готовят из штамма REO 198³ *Brucella ovis*, который является СО₂- и сыворотка-независимым.

2.1. Антигены

В результате термического экстрагирования клеток шероховатых *Brucella* соевым раствором (метод экстрагирования горячим соевым раствором, HS) получают водорастворимые антигенные экстракты, основной компонент которых преципитируется сывороткой к шероховатым *Brucella* (Diaz & Bosseray, 1973; Myers *et al.*, 1972). По этой причине HS экстракт носит название «R-специфический антиген» или, при получении из *B. ovis*, «*B. ovis*-специфический антиген». Однако химическая характеристика HS экстракта из *B. ovis* показала, что он обогащен липополисахаридом шероховатых форм (R-LPS), белками наружной мембраны группы 3 и другими компонентами наружной мембраны (Riezu-Boj *et al.*, 1986). Таким образом, HS экстракт содержит детерминанты LPS, специфичные для *B. ovis*, но также и дополнительные антигенные детерминанты, некоторые из которых имеются как у шероховатых, так и у гладких *Brucella* (Santos *et al.*, 1984). Такие антигенные детерминанты обуславливают перекрестную специфичность, которая иногда наблюдается при методе HS в сыворотках овец, инфицированных *B. melitensis* или вакцинированных Rev.1 *B. melitensis* (Riezu-Boj *et al.*, 1986). В настоящее время HS экстракт наиболее часто используют в серологической диагностике инфекции *B. ovis*. Его растворимость в воде и высокое содержание в релевантных эпитопах клеточной поверхности дает хорошую результативность в серологических тестах на *B. ovis*. Однако в зонах, где также встречается инфекция *B. melitensis* или проводится вакцинация овец вакциной из штамма Rev.1 *B. melitensis*, следует учитывать специфичность диагностики *B. ovis* и результаты серологических тестов в отношении гладких *Brucella* (Blasco, 2010).

Плотные базальные неселективные среды, описанные в Разделе В.1.3, являются приемлемыми для культивирования REO 198 *B. ovis*.

2.1.1. Получение HS антигена

- i) Экспотенциально культивируют штамм REO 198 *B. ovis* одним из следующих способов: в течение 48 часов в колбах с триптиказо-соевым бульоном в ротационном инкубаторе при 37°C ± 2°C и 150 об/мин; или матрасах Ру с триптиказо-соевым агаром или другой соответствующей средой; или в биореакторе с загрузкой, как описано для *B. abortus*. Добавление 5% сыворотки в среду необязательно, поскольку штамм REO 198 *B. ovis* является сыворотка-независимым.
- ii) Клетки ресуспендируют в стерильном 0,85% физиологическом растворе или ФБР, затем дважды промывают в стерильном 0,85% физиологическом растворе (12 г высушенных клеток или 30 г влажного клеточного осадка в 150 мл).
- iii) Затем суспензию отмытых клеток автоклавируют при 120°C в течение 15–30 минут.
- iv) После охлаждения суспензию центрифугируют (15 000 g, 5°C ± 3°C, 15 минут), а надосадочную жидкость фильтруют и диализируют дистиллированной водой в объеме, в 100 раз превышающем объем суспензии, при 4°C; воду меняют не реже трех раз в два дня.
- v) Диализированную жидкость ультрацентрифугируют (100 000 g, 4°C, 6–8 часов), а осадок ресуспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды и лиофилизируют. При изготовлении для использования в РСК, добавление замены сыворотки-регулятора процесса II

² Доступна в Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллёзу в Великобритании.

³ Доступен в Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллёзу во Франции.

(CPSRII) перед лиофилизацией может способствовать устойчивости и антикомплементарной активности.

Затем HS ресуспендируют в дистиллированной воде (для использования в тестах РИД), вероналовом буферном солевом растворе (для использования в РСК) или карбонатном/бикарбонатном буфере (для использования в н-ИФА) и титруют соответственно.

Ресуспендированный HS, предназначенный для использования в тесте РИД, хранят при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, в качестве консерванта можно добавить 0,5% фенол. Следует избегать замораживания и размораживания антигенных суспензий (Diaz & Bosseray, 1973).

Антиген для РСК стандартизируют по ISaBoS для получения 50% связывания при разведении сыворотки 1/100. Следует особо отметить, что каждый антигенный комплекс для РСК подлежит титрованию в соответствии с процедурой РСК, установленной для рутинного теста. Таким образом, перед использованием антигена (коммерческого или собственного производства) для постановки РСК определенным методом лаборатория должна обеспечить установление титра антигена тем же методом.

При отсутствии общепринятых правил стандартизации, антигены для н-ИФА и РИД титруют набором соответствующих положительных и отрицательных сывороток.

2.1.2. Стандартизация непрямого ИФА

В недавней работе, в которой описан процесс валидации метода н-ИФА в сравнении с РСК, использовали следующие критерии для стандартизации н-ИФА (Praud *et al.*, 2012):

- i) Предварительное разведение ISaBoS в отрицательной сыворотке (или пуле отрицательных сывороток) 1/64 должно дать положительную реакцию;
- ii) Предварительное разведение ISaBoS в отрицательной сыворотке (или пуле отрицательных сывороток) 1/256 должно дать отрицательную реакцию.

Данные критерии по-прежнему подлежат валидации с использованием международной кольцевой пробы.

В любом случае, наборы реагентов для н-ИФА, коммерческие или собственного производства, подлежат валидации в соответствии с Главой 1.1.6 «Принципы и методы валидации диагностических анализов для инфекционных болезней».

2.2. Реакция связывания комплемента

Ввиду отсутствия стандартизированного метода для РСК рекомендуется использование Международной стандартной сыворотки (см. Раздел В.2.2.2). Обычно тест проводят методом микротитрования. Некоторые результаты демонстрируют, что реакция холодного связывания более чувствительная, чем реакция связывания при воздействии тепла (Ris *et al.*, 1984), однако, она является менее специфичной. Антикомплементарные реакции, обычные для овечьей сыворотки, однако, чаще возникают при холодном связывании.

Для постановки РСК предлагают несколько методов с использованием различных концентраций свежих эритроцитов барана (ЭБ) (обычно рекомендуется 2–3% суспензия), сенсibilизированных равным объемом кроличьей анти-ЭБ сыворотки, разведенной до концентрации, в несколько раз (обычно от двух до пяти раз) превышающей минимальную концентрацию, необходимую для получения 100% лизиса ЭБ в присутствии титрованного раствора комплемента морской свинки. Последний титруют отдельно (в присутствии или отсутствии антигена в зависимости от метода) для определения количества комплемента, необходимого для достижения 50% или 100% лизиса сенсibilизированных ЭБ в единице объема стандартизированной суспензии; такое количество комплемента принимают за 50% или 100% гемолитическую единицу комплемента ($\text{C}'\text{H}_{50}$ или $\text{C}'\text{H}_{100}$), соответственно. Как правило, рекомендуется титровать комплемент до проведения каждой серии тестов, для оптимального определения $\text{C}'\text{H}_{50}$ предпочтительным является макрометод. Обычно в тесте используют 1,25–2 $\text{C}'\text{H}_{100}$ или 5–6 $\text{C}'\text{H}_{50}$.

Стандартным раствором для разведения при постановке РСК является забуференный барбиталом (вероналом) физиологический раствор (ВБР). Его готовят из имеющихся в продаже буферных таблеток, также его можно приготовить по формуле (см. Главу 2.1.4). Исследуемую сыворотку инактивируют в течение 30 минут на водяной бане при 60–63°C, а затем разводят (двукратное разведение) в ВБР. Маточный раствор NS антигена (2,5–20 мг/мл в ВБР) разводят в ВБР соответственно установленному титру (титрование в двух направлениях). Обычно тестируют только одно разведение сыворотки (как правило, 1/10).

2.2.1. Процедура тестирования

Используя 96-луночные планшеты для микротитрования с круглым (U-образным) дном, выполняют следующее:

i) По 25 мкл разведенной инактивированной исследуемой сыворотки вносят в лунку первого и второго рядов. Первый ряд является антикомплементарным контролем для каждой сыворотки. В лунки первого ряда (антикомплементарный контроль) добавляют по 25 мкл ВБР для компенсации отсутствия антигена. Во все остальные лунки, за исключением лунок второго ряда, добавляют по 25 мкл ВБР. Затем делают двукратные серийные разведения путем переноса по 25 мкл сыворотки из третьего ряда далее; 25 мкл полученной смеси в последнем ряду удаляют.

ii) В каждую лунку, за исключением лунок первого ряда, добавляют по 25 мкл антигена, разведенного до рабочей концентрации.

iii) В каждую лунку добавляют по 25 мкл комплемента, разведенного до требуемого количества единиц.

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, и в каждую лунку добавляют 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 выдерживания при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение минимум 2–3 часов для осаждения нелизированных клеток. Степень гемолиза сравнивают со стандартами, соответствующими 0, 25, 50, 75 и 100% лизису. Титр исследуемой сыворотки является самым сильным разбавлением, в котором гемолиз составляет не более 50%.

2.2.2. Стандартизация результатов реакции связывания комплемента

Для стандартизации результатов существует система единиц, основанная на Международной стандартной сыворотке против *Brucella ovis* (ISaBoS или Международный стандарт 1985 [см. сноску 3]). Данная сыворотка содержит 1000 МЕ РСК на мл. Если при тестировании данной сыворотки определенным методом получают титр, например 200 (50% гемолиз), то фактор для неизвестной сыворотки, протестированной тем же методом, можно рассчитать по формуле: $1000/200 \times \text{титр исследуемой сыворотки} = \text{количество МЕ РСК}$ (Международные единицы РСК) антител в исследуемой сыворотке на мл. Лабораториям стран, использующих РСК на национальном уровне, рекомендуется принять единообразную методику проведения теста для получения одинакового уровня чувствительности и специфичности в отношении соответствующей панели сывороток от овец, положительно реагирующих на *B. ovis* и незараженных *Brucella*. Результаты всегда выражают в МЕ РСК, рассчитанных на основании

результатов, полученных при параллельной титрации со стандартной сывороткой, которая в свою очередь может быть приведена в соответствие с Международным стандартом.

2.2.3. Интерпретация результатов

Сыворотки, дающие титр, эквивалентный 50 МЕ РСК/мл или выше, считаются положительными.

2.3. Твердофазный иммуноферментный анализ

Предложено несколько вариантов данного анализа. Анализ, описанный в данной статье, является непрямым ИФА с использованием АВТС (2,2'-азино-ди-[3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота]) в качестве хромогена, хотя другие методы также являются пригодными, и в настоящее время доступны коммерческие наборы для проведения анализа.

Тесты проводят на 96-луночных плоскодонных планшетах для постановки ИФА.

Реактивы и сыворотки разводят в ФБР, рН 7.2 (± 0.2), с добавлением 0,05% Твин 20 (PBST).

Разведения антигенов делают для адсорбции в карбонатном/бикарбонатном буфере (рН 9.6 ± 0.2). Планшеты промывают после нанесения антигена и между инкубациями, в соответствующих случаях, обычно с использованием PBST (см. ниже). Антиген (HS) и конъюгат титруют в двух направлениях, отбирают разведения, дающие наилучший коэффициент распознавания между отрицательной и положительной стандартными сыворотками. Вторичные антитела (например, anti-ovine IgG [цепи H+L]) обычно конъюгируют с пероксидазой хрена (HRPO), хотя можно использовать другие ферменты или конъюгаты (такие как рекомбинантный белок G/HRPO). Моноклональное антитело к конъюгату HRPO с бычьим IgG1 также признают пригодным для использования в н-ИФА (Vigliocco *et al.*, 1997). Если используют пероксидазный конъюгат, хромоген, обычно АВТС, разводят в субстратном буфере (состоящем из цитрата натрия и лимонной кислоты, см. ниже)⁴. К нему добавляют субстрат перекись водорода (H₂O₂), и планшеты инкубируют в течение 15-30 минут при комнатной температуре ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$). Реакцию останавливают с использованием 1 ммоль азида натрия или других реактивов, а изменение цвета учитывают при 405–414 нм (подробнее см. Главу 2.1.4).

Антиген, используемый в н-ИФА, - это маточный раствор 1 мг/мл HS в покрывающем буфере, титрованный методом «шахматной доски» с различными разведениями антигена, конъюгата и субстрата стандартной сывороткой или серийными разведениями панели сывороток от овец, положительно реагирующих на *B. ovis* и незараженных *Brucella*, для определения наиболее чувствительной и специфичной рабочей концентрации. О других антигенах сообщалось в литературе, в частности, о R-LPS (Nielsen *et al.*, 2004), однако, его экстрагирование является трудоемким и опасным, и этот антиген не имеет определенных преимуществ по сравнению с HS, который также используют в РСК и РИД.

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

В каждый планшет включают дополнительную положительную сыворотку (внутренний контроль) для валидации воспроизводимости теста на любом планшете и в любое время.

2.3.1. Процедура тестирования (пример)

і) В каждую лунку микротитрационного планшета из высококачественного полистирола (это является важным условием, чтобы получать достоверные результаты, поскольку

⁴ ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) – также часто используемый хромогенный субстрат для выявления HRP в ИФА, доступный в разных формах. Не является канцерогенным.

адсорбционные свойства планшетов разных марок различаются) вносят по 100 мкл раствора антигена в адсорбционном буфере установленной концентрации:

Адсорбционный буфер (0,06 моль карбонат–бикарбонатный буфер, pH 9.6 ± 0.2):

- а) Раствор А: 0,84 г NaHCO_3 в 10 мл дистиллированной воды.
- б) Раствор В: 1,06 г Na_2CO_3 в 10 мл дистиллированной воды.

Смешивают 4,53 мл раствора А с 1,82 мл раствора В и доводят объем до 100 мл дистиллированной водой. Закупоренные планшеты инкубируют при $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, желательнее, в течение ночи. Затем планшеты промывают четыре раза отмывочным буфером для удаления несвязанных антигенов, и просушивают путем переворачивания на фильтровальную бумагу и энергичного постукивания по дну.

Отмывочный буфер (0,01 М ФБР, pH $7,2 \pm 0,2$, содержит 0,05% Твин 20):

а) Базовый раствор:

Раствор А: Na_2HPO_4 : 10,96 г в 150 мл дистиллированной воды

Раствор В: NaH_2PO_4 (H_2O): 3,15 г в 150 мл дистиллированной воды (3,5 г в 150 мл дистиллированной воды при использовании $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$)

б) Смешивают раствор А и раствор В, затем доводят объем до 400 мл дистиллированной водой.

с) Отмывочный буфер (PBST): 40 мл базового раствора + 8,5 г NaCl , доводят объем до 1000 мл дистиллированной водой, добавив 0,05% Твин 20.

Покрытые и промытые планшеты используют сразу или высушивают и хранят при $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ (в данных условиях устойчивость обычно сохраняется в течение 1 месяца минимум). Многие серии HS хорошо проявляют себя при рабочих концентрациях 2,5–15 мкг/мл в адсорбционном буфере.

ii) *Сыворотки*: Разводят исследуемую, а также образцы положительной и отрицательной контрольной сыворотки (1/100 -1/200 - оптимальные рабочие разведения, приготавливаемые путем добавления 10 мкл сыворотки к 1–2 мл PBST, соответственно). Такие рабочие разведения сыворотки обычно оптимальны при использовании поликлональных или моноклональных анти-IgG конъюгатов. Однако более низкие рабочие разведения (обычно 1/50) оптимальны при использовании конъюгатов G-HRPO (Marin *et al.*, 1998). В лунки микротитрационных планшетов добавляют по 100 мкл образцов в двух повторностях. Планшеты закрывают, инкубируют при $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 40–60 минут и промывают три раза отмывочным буфером PBST.

iii) *Конъюгат*: Оптимальное рабочее разведение титрованного в PBST конъюгата (наиболее часто используют белок G или поликлональный кроличий антиовечий IgG (H+L), связанные с HRPO) вносят (100 мкл) в лунки, планшеты закрывают и затем инкубируют в течение 40–60 минут при $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. После инкубации планшеты снова промывают три раза с использованием PBST.

iv) *Субстрат*: Существует несколько вариантов, однако, наиболее широко используемый⁵ обычно состоит из 0,1% (в отношении веса к объёму) раствора ABTS (2-2'-азино-ди 3-этилбензотиазолин сульфоновая кислота, диаммониевая соль) в цитратном буфере, содержащем 0,004% H_2O_2 :

Цитратный буфер (0,05 М, pH 4 ± 0.2):

- а) Раствор А: 22,97 г лимонная кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) в 1000 мл дистиллированной воды.
- б) Раствор В: 29,41 г цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в 1000 мл дистиллированной воды.

Смешивают 660 мл раствора А с 470 мл раствора В и доводят объем до 2000 мл дистиллированной водой. Затем добавляют 0,004% свежеприготовленного качественного H_2O_2 .

⁵ ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) – также часто используемый хромогенный субстрат для выявления HRP в ИФА, доступный в разных формах. Не является канцерогенным.

Добавляют субстратный раствор (100 мкл на лунку) и инкубируют планшеты в течение 15-30 минут при комнатной температуре, постоянно встряхивая.

v) *Учет и интерпретация результатов:* Показания оптической плотности регистрируются автоматически в спектрофотометре при длине волны 405–414 нм. Средние значения оптической плотности выражают в процентах средних значений оптической плотности положительного контроля или, предпочтительно, преобразуют в единицы н-ИФА, рассчитываемые вручную или с использованием компьютера и программы вычерчивания кривых по калибровочной кривой, построенной на результатах серии положительных контрольных разведений. Дублирующие считывания по каждой сыворотке должны совпадать. В случае значительных расхождений следует повторно тестировать определенную сыворотку. Перед выполнением расчета окончательных результатов каждый планшет подлежит валидации с учетом значений ОП, полученных для положительного и отрицательного контролей, а также преобразованной ОП внутреннего контроля в соответствии с заранее установленными прогнозируемыми диапазонами значений.

Следует должным образом устанавливать пороговые значения для дифференцирования положительных и отрицательных результатов с использованием соответствующих методов валидации (см. Главу 1.1.6), избегая, по возможности, пороговых значений, приводящих к неопределенным результатам. Для верификации или стандартизации определенного метода тестирования, как указано выше, следует использовать стандарт ISaBoS или аналогичные вторичные или национальные стандарты.

2.4. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле

Для постановки теста РИД (Blasco, 1990) используют следующие реактивы: высококачественный очищенный агар или агарозу, хлорид натрия (NaCl) и боратный буфер (приготовленный с борной кислотой [12,4 г]; хлоридом калия [14,5 г]; дистиллированной водой [1600 мл]; рН $8,3 \pm 0,02$ отрегулированный с использованием 0,2 моль раствора NaOH, и доведенный до объема 2000 мл дистиллированной водой).

2.4.1. Приготовление агарового геля

Растворяют 1 г агарозы (или очищенного агара) и 10 г NaCl в 100 мл боратного буфера (кипячением при постоянном помешивании).

На плоской поверхности, на чистое предметное стекло наносят необходимое количество расплавленного геля, сформировав слой толщиной 2,5 мм (приблизительно 3,5 мл для стандартных предметных стекол).

После застывания геля (15-20 минут) в нем прорезают лунки с помощью пробойника.

Диаметр лунок: 3 мм, расстояние между лунками: 3 мм, расположение лунок: шесть лунок вокруг центральной лунки диаметром также 3 мм.

Тест можно выполнить с использованием чашек Петри и других схем расположения лунок.

2.4.2. Процедура тестирования

Антиген оптимальной концентрации вносят в центральную лунку, две диаметрально противоположные лунки заполняют контрольной сывороткой (заражение подтверждено бактериологическим исследованием), исследуемые сыворотки вносят в оставшиеся периферические лунки.

Результаты учитывают через 24 и 48 часов инкубации при комнатной температуре во влажной камере.

О положительной реакции свидетельствует четко выраженная линия преципитации между центральной лункой и лунками с исследуемыми сыворотками, которая дает полную или частичную идентичность с линией преципитации положительных контролей.

Также могут появляться линии преципитации, не дающие полную идентичность, они обычно соответствуют второстепенным антигенным компонентам HS экстрактов (антитела к таким компонентам обычно встречаются при инфекциях, вызываемых *B. melitensis*, или в ответ на вакцинацию штаммом Rev.1). Такие реакции также считают положительными. Перед окончательным учетом результатов необходимо промыть стекла в 5% растворе цитрата натрия в дистиллированной воде в течение 1 часа для очистки от неспецифических линий преципитации.

HS (2,5–20 мг/мл), разведенный в дистиллированной воде (в некоторых случаях содержит 0,5% фенола в качестве консерванта), является антигеном, наиболее широко используемым в тесте РИД (законсервированный антиген можно хранить в холодильнике минимум 1 месяц). Разведения антигена тестируют с панелью из 20-30 сывороток от баранов, естественным путем зараженных *B. ovis*, а также с панелью сывороток от овец, не зараженных *Brucella*. Оптимальной рабочей концентрацией антигена является та, которая дает наиболее четко выраженные линии преципитации со всеми контрольными сыворотками от баранов, зараженных *B. ovis*, при этом имея отрицательный результат с сыворотками от животных, не зараженных *Brucella*.

Сравнительные исследования показали, что н-ИФА имеет более высокую чувствительность, чем РИД или РСК (Blasco, 2010; Gall *et al.*, 2003; Praud *et al.*, 2012; Ris *et al.*, 1984). Однако из-за наличия некоторых сывороток, отрицательных в н-ИФА, но положительных в РИД (или РСК), и наоборот, параллельное проведение РИД (или РСК) и н-ИФА дает в результате оптимальную чувствительность и может быть полезным в программах искоренения инфекции в неблагополучных зонах или стадах (Blasco, 2010; Praud *et al.*, 2012).

Кроме того, РСК имеет другие существенные недостатки, такие как сложность постановки, обязательная инактивация сыворотки, антикомплементарная активность некоторых сывороток, сложность постановки с гемолизованными сыворотками, феномен «прозоны». Благодаря высокой чувствительности, элементарности и простоты интерпретации, методы н-ИФА и РИД являются предпочтительными для осуществления надзора в зонах, свободных или почти свободных от инфекции.

О существовании ложноположительных результатов серологических тестов на *B. ovis* вследствие зараженности бактериями, демонстрирующими перекрестные реакции эпитопов с *B. ovis*, известно немного. Сообщалось, что возбудитель копытной гнили (*Dichelobacter nodosus*) обуславливает перекрестные серологические реакции с *B. ovis*, однако, степень и практическое значение такой перекрестной специфичности в диагностических тестах на *B. ovis* недостаточно изучены. Кроме того, *Arcanobacterium pyogenes* и *Corynebacterium ovis*, растворимые экстракты которых дают перекрестную реакцию с сывороткой от баранов, инфицированных *B. ovis*, были выделены из некоторых лимфатических узлов баранов, дающих резко положительную реакцию в тестах РИД и н-ИФА на *B. ovis* (Blasco, 2010; Blasco & Moriyon, неопубликованные результаты).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Поскольку и бараны и овцематки могут выступать переносчиками инфекции (Blasco, 2010; Grilló *et al.*, 1999), вакцинация как баранов, так и овец является, вероятно, наиболее экономически и практически целесообразным средством среднесрочного контроля *B. ovis* в регионах с высокой превалентностью инфекции. Для долгосрочного контроля следует учитывать влияние вакцинации на серологическое исследование, а также возможные затруднения с реализацией программ официального подтверждения статуса благополучия по *B. ovis*.

Специфическая вакцина против *B. ovis* отсутствует, однако живая вакцина на основе штамма Rev.1 *B. melitensis* (описание и требования к качеству представлены в Главе 2.1.4) также пригодна для иммунизации против инфекции *B. ovis* (Blasco, 1990). Однократная

стандартная доза (10^9 колониеобразующих единиц) Rev.1, вводимая подкожно (1 мл) или, лучше, конъюнктивальным методом (25-30 мкл) животным в 3-5-месячном возрасте, обеспечивает достаточный иммунитет против *B. ovis*. Преимущество конъюнктивальной вакцинации в том, что стойкий выраженный серологический ответ, индуцируемый подкожной вакцинацией, снижается до минимума, что повышает специфичность серологических тестов (Blasco, 1990) и упрощает интерпретацию серологических результатов после вакцинации. Иммунизация молодых и взрослых особей мужского пола вакциной Rev.1 показала, что безопасность вакцины Rev.1 отвечает требованиям, побочные действия наблюдаются редко (Marin *et al.*, 1990; Muñoz *et al.*, 2008). Таким образом, в странах с экстенсивным управлением и высокими уровнями превалентности рекомендуется вакцинировать молодых особей и здоровых взрослых животных (см. Главу 2.1.4). В странах, неблагополучных по *B. ovis*, но благополучных по *B. melitensis*, перед применением вакцины Rev.1 следует учитывать возможность серологических интерференций, и введение вакцины через конъюнктиву является предпочтительным методом, позволяющим свести к минимуму эту проблему.

Было доказано, что вакцина на основе RB51 *B. abortus* не является эффективной для защиты овец от *B. ovis* (Jiménez De Bagües *et al.*, 1995), и несмотря на обнадеживающие результаты, полученные в результате применения субклеточных вакцин нового поколения (Cassataro *et al.*, 2007; Da Costa Martins *et al.*, 2010; Estein *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2006), ни одна из них не была лицензирована на применение в полевых условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.
- BLASCO J.M. (1990). *Brucella ovis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 351–378.
- BLASCO J.M. (2010). *Brucella ovis* infection. In: Infectious and Parasitic Diseases of Livestock, Lefèvre PC, Blancou J, Chermette R & Uilenberg G. eds. Lavoisier, Paris, France. Vol. 2:1047–1063.
- BULGIN M.S. & ANDERSON B.C. (1983). Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **182**, 372–374.
- CASSATARO J., PASQUEVICH K.A., ESTEIN S.M., LAPLAGNE D.A., ZWERDLING A., DE LA BARRERA S., BOWDEN R., FOSSATI C.A., GIAMBARTOLOMEI G.H. & GOLDBAUM F.A. (2007). A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine*, **25**, 5958–5967.
- DA COSTA MARTINS R., IRACHE J.M., BLASCO J.M., MUÑOZ M.P, MARÍN C.M., JESÚS GRILLO M., JESÚS DE MIGUEL M., BARBERÁN M. & GAMAZO C. (2010). Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*, **28**, 3038–3046.
- 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.
- DIAZ R. & BOSSERAY N. (1973). Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella*. *Ann. Rech. Vet.*, **4**, 283–292.
- ESTEIN S.M., BALDI P.C. & BOWDEN R.A. (2002). Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 407–411.

- GALL D., NIELSEN K., VIGLIOCCO A., SMITH P., PEREZ B., ROJAS X. & ROBLES C. (2003). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Rumin. Res.*, **48**, 173–179.
- GARCÍA-PASTOR L., BLASCO J.M. & BARBERÁN M. (2009). Pasteurellosis as a cause of genital lesions in rams. A descriptive study. *Small Rumin. Res.*, **87**, 111–115.
- GRILLÓ M.J., MARÍN C., BARBERÁN M. & BLASCO J.M. (1999). Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet. Rec.*, **144**, 555–558.
- JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P., BARBERÁN M., MARÍN C.M. & BLASCO J.M. (1995). The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, **13**, 301–304.
- LIVINGSTONE C.W. & HARDY W.T. (1964). Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. *Am. J. Vet. Res.*, **25**, 660–663.
- MARÍN C.M., ALABART J.L. & BLASCO J.M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 426–428.
- MARÍN C.M., ALONSO-URMENETA B., MORIYÓN I., PEREZ S. & BLASCO J.M. (1998). Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidase conjugates in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Vet. Rec.*, **143**, 390–394.
- MARÍN C.M., BARBERÁN M., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P. & BLASCO J.M. (1990). Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev. 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 209–215.
- MUÑOZ P., DE MIGUEL M.J., GRILLÓ M.J., MARÍN C.M., BARBERÁN M. & BLASCO J.M. (2008). Immunopathological responses and kinetics of *B. melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, **26**, 2562–2569.
- MUÑOZ P.M., ESTEBAN M., MARÍN, C.M., DE MIGUEL M.J., GRILLÓ M.J., BARBERÁN M., IRACHE J.M., BLASCO J.M. & GAMAZO C. (2006). *Brucella* outer membrane complex-loaded microparticles as a vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, **24**, 1897–1905.
- MYERS D.M., JONES L.M. & VARELA-DIAZ V. (1972). Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Appl. Microbiol.*, **23**, 894–902.
- NIELSEN K., SMITH P., CONDE S., DRAGHI de BENITEZ G., GALL D., HALBERT G., KENNY K., MASSENGILL C., MUENKS Q., ROJAS X., PEREZ B., SAMARTINO L., SILVA P., TOLLERSRUD T. & JOLLEY M. (2004). Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. *J. Immunoassay Immunochem.*, **25**, 171–182.
- PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L. & GARIN-BASTUJI B. (2012). Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Vet. Res.*, **8**:68.
- RIDLER A.L., WEST D.M. & COLETT M.G. (2012). Pathology of *Brucella ovis* infection in red deer stags (*Cervus elaphus*). *N. Z. Vet. J.*, **60**, 146–149.
- RIEZU-BOJ J.I., MORIYÓN I., BLASCO J.M., MARÍN C.M. & DIAZ R. (1986). Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 938–942.

RIS D.R., HAMEL K.L. & LONG D.L. (1984). Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N.Z. Vet. J.*, **32**, 18–20.

SANTOS J.M., VERSTREATE D.R., PERERA V.Y. & WINTER A.J. (1984). Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infect. Immun.*, **46**, 188–194.

VIGLIOCCO A.M., SILVA PAULO P.S., MESTRE J., BRIONES G.C., DRAGHI G., TOSSI M. & NIELSEN K. (1997). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.*, **54**, 357–368.

XAVIER M.N., SILVA T.M.A., COSTA E.A., PAIXAO T.A., MOUSTACAS V.S., CARVALHO C.A. Jr., SANT'ANNA F.M., ROBLES C.A., GOUVEIA A.M.G., LAGE A.P., TSOLIS R.M. & SANTOS R.L. (2010). Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, **145**, 158–164.

Примечание: Существуют Референтные лаборатории по изучению эпидидимита овец (*Brucella ovis*) (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 диагностическим тестам, реактивам и вакцинам по эпидидимиту овец (*Brucella ovis*) следует обращаться в Референтную лабораторию МЭБ.