

БРУЦЕЛЛЕЗ ОПЫТ ИСПАНИИ

Carlos Chipana
Vet Technical Adviser



СОДЕРЖАНИЕ:

- **Введение**
- **Географическое распространение**
- **Важность**
- **Диагностика**
- **Программы профилактики и контроля**
 - **Опыт Испании в борьбе с бруцеллезом КРС**
 - **Опыт Испании в борьбе с бруцеллезом МРС**
 - **Вакцины CZ**



Brucellosis

Бруцеллез — заразное заболевание скота, наносящее значительный экономический ущерб. Заболевание вызывают различные бактерии семейства *Brucella*, которые, как правило, поражают определенные виды животных. Однако большинство видов *Brucella* могут поражать и другие виды животных. Бруцеллез крупного рогатого скота (*B. abortus*), овец и коз (*B. melitensis*) и свиней (*B. suis*) — заболевания, перечисленные в Кодексе здоровья наземных животных Всемирной организации здравоохранения животных (ВОАН), и о них необходимо сообщать в ВОАН. Бруцеллез — это высококонтагиозный зооноз для человека. Чаще всего люди заражаются при употреблении сырого молока инфицированных животных. Так развивается тяжелое изнурительное заболевание. Ветеринары, фермеры и работники скотобоев в первую очередь подвержены инфицированию. Бруцеллез у человека лучше всего предотвратить, контролируя инфекцию у животных. Пастеризация молока от инфицированных животных является важным способом снижения уровня заражения людей.

Links to Code and Manual

[Terrestrial Code](#)[Terrestrial Manual](#)

Введение

Бруцеллез – инфекционное заболевание животных и человека.

У домашних видов он характеризуется репродуктивными нарушениями, которые ведут к потерям в производстве, имеющими большие экономические последствия.

Вызывается представителями бактериями рода *Brucella*. Он возникает в результате заражения *Brucella* spp, коккобациллой или факультативной внутриклеточной бациллой, грамм (-) семейства *Brucellaceae*. У домашних животных идентифицировано шесть видов бактерий: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* и *B. neotomae*.

У КРС бруцеллезную инфекцию обычно вызывают биовары (bv.) ***Brucella abortus***. В некоторых странах (Южная Европа, Африка и Западная Азия), где крупный рогатый скот выращивают совместно с овцами или козами, инфекция также может быть вызвана *B. melitensis*.

B. melitensis → основной возбудитель бруцеллезной инфекции у **овец и коз**.

B. melitensis и *B. abortus* → могут заразить другие виды, например верблюдов.



Географическое распространение:

Клиническое заболевание у животных распространено на Ближнем Востоке, в Азии, Африке, Центральной и Южной Америке, странах Средиземноморского и Карибского бассейнов.

B. abortus

MOSTLY PRESENT IN:
WORLDWIDE

ERADICATED IN:

JAPAN
CANADA
PART OF EUROPE
AUSTRALIA
NEW ZELAND
ISRAEL
MOST USA

B. melitensis основной причиной заболевания бруцеллезом среди людей. Каждый год фиксируется около 500.000 случаев по всему миру.

В Азии и Африке 8% скота больны бруцеллезом, в Индии -12%*



B. suis

MOSTLY PRESENT IN:
CENTRAL AMERICA
SOUTH AMERICA
MEXICO
ASIA

B. melitensis

MOSTLY PRESENT IN:
MEDITERRANEAN
MIDDLE EAST
CENTRAL ASIA
AFRICA
INDIA

B. ovis

MOSTLY PRESENT IN:
AUSTRALIA
NEW ZELAND
NORTH AMERICA
SOUTH AMERICA
SOUTH AFRICA
EUROPE

Важность бруцеллеза

- Причина аборт.
- Существенные потери: производительность, торговля, > экономические последствия.
- Является эндемическим во многих странах.
- Общественное здравоохранение: **зооноз**

- Контакт → плацента, околоплодная жидкость и т. д.
- Сохранение (+), дочери матерей (+)
- Включение животных (+ или -)?
- Животные ↔ в стаде домашние/дикие и разн. стада делят пастбища и водоемы.

- Распространение в мире бруцеллеза среди людей
- *B. melitensis* высокопатогенен для человека.
- Профессиональные риски: работники лабораторий, фермеры, ветеринары → контакт с инфицированными животными или тканями.
- Большинство заражаются при употреблении в пищу непастеризованных молочных продуктов.

Диагностика



<https://www.woah.org/en/disease/brucellosis/>

https://rr-europe.woah.org/app/uploads/2021/08/3-1-4-brc_.pdf

World Organisation for Animal Health
Founded in 1924

Animal Diseases | Avian Influenza | Antimicrobial resistance

WHO WE ARE | WHAT WE DO | WHAT WE OFFER | OUR 100TH ANNIVERSARY | MEDIA | WAHIS

Inicio » Diseases » Brucellosis

LISTED DISEASE

Brucellosis

Links to Code and Manual

- Terrestrial Code (+)
- Terrestrial Manual (-)
- Manual Chapter on Disease

NB: Версия, принятая на Всемирной ассамблее делегатов МЭБ в мае 2016 года

ГЛАВА 3.1.4.

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

РЕЗЮМЕ

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

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

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



Диагностика

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Окончательный диагноз → при выделении *Brucella* spp. при абортах, выделений из вымени и в тканях, взятых при патологоанатомическом исследовании. Исключить другие заболевания, вызывающие репродуктивные нарушения.

1. Идентификация/обнаружение:

- Окрашивание, модифицированная методика окрашивания эффективная для окрашивания кислотоустойчивых бацилл.
- Посев образцов/секретов, особенно если это подтверждено серологическими исследованиями.
- ПЦР, обнаружение ДНК бруцелл в образце → идентификация и типирование по последовательностям генома.

2. Оценка гуморального и клеточного иммунитета

Анализ конкретных стад и животных → крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот.

Однако ни один серологический тест сам по себе не является подходящим для всех видов животных или для всех эпидемиологических ситуаций.



Диагностика

Некоторые из серологических проб:

- С забуференным антигеном BBAT: Роз бенгал тест-RBT и реакция пластинчатой агглютинации -BPAT
- Реакция связывания комплемента -CFT
- Реакция сывороточной агглютинации -SAT
- нИФА или кИФА
- Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ -FPA

нИФА в молоке или кольцевая реакция с молоком, тесты в сборном молоке → эффективны для молочного КРС.

Овцы и козы: Роз-бенгал тест (RBT) при скрининге + подтверждающий CFT /ИФА.

Образцы молока и вагинальные мазки будут полезны для живых овец и коз.

B. melitensis можно культивировать из абортированных материалов (содержимого желудка, селезенки и легких) и плаценты.

ГЛАВА 3.1.4.

БРУЦЕЛЛЕЗ (*BRUCELLA ABORTUS*, *B. MELITENSIS* И *B. SUIIS*)
(ИНФЕКЦИЯ *BRUCELLA ABORTUS*, *B. MELITENSIS* И *B. SUIIS*)Таблица 1. Методы исследования для диагностики инфекции *B. abortus*, *melitensis* или *suis*

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

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

^a Относится только к стадам, странам или зонам, свободным от бруцеллезной инфекции.

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

^c В регионах с низкой превалентностью инфекции или при ее почти полном отсутствии прогностическая ценность положительных результатов серологических тестов может быть очень низкой. В таких ситуациях

Руководство по наземным животным - ВОЗЖ



Диагностика

- Диагностику можно проводить пакетно.
- Выделение бруцелл является окончательным доказательством → зараженное животное:
 - ✓ Не все зараженные животные дают посев (+)
 - ✓ Методы и средства не всегда доступны.
- Серологические тесты обеспечивают предварительный диагноз → на практике они более осуществимы и экономичны.
 - Роза Бенгальская
 - Реакция связывания комплемента

→ (+) результаты при скрининге необходимо проверять с помощью дополнительных методов.

Для повышения эффективности эрадикации → комбинировать методы → повысить диагностическую чувствительность, проводя как минимум два серологических теста, таких как

Тест с забуферным антигеном (BBAT) или флуоресцентная роляризация (FPA) + реакция связывания комплемента (CFT) о ELISA (ИФА)



2. Серологические тесты

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

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



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

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



Профилактика и контроль

Здоровье животных: Профилактика заключается в мониторинге факторов риска.



Вакцинация является наиболее эффективным способом профилактики.

Вакцинация рекомендуется в районах с высоким уровнем заболеваемости. Серологическое или другое тестирование и выбраковка также могут быть эффективными в районах с низкой распространенностью заболевания.

Здоровье человека: Профилактика основана на доступности информации, безопасности пищевых продуктов, гигиене труда и лабораторной безопасности.

Важность пастеризации молока для потребления и производства производных продуктов, таких как сыр.

При реализации сельскохозяйственных работ и переработке мяса соблюдать меры по индивидуальной защите во время обращения и утилизации плаценты, туш животных и внутренних органов.

Руководство по наземным животным - ВОЗЖ

Зависимость успеха программ контроля →
качество используемой вакцины.
Качество продукта напрямую и самым
существенным образом повлияет на результат
программы.

- Оригинальные штаммы
- Безопасность
- Контролируемые банки
- Стабильность

-Постоянные контроли→ внутренне и
проводимые независимыми
исследовательскими центрами.

→Качество → Эффективность



С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОПРЕПАРАТАМ

1. Вакцины

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

1.1. Основная информация

1.1.1. Вакцина на основе штамма 19 *Brucella abortus*

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

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

С.1.2.2.3 Контроль в процессе производства.

1.1.2. Вакцина на основе RB51 *Brucella abortus*

С 1996 года в нескольких странах вакцина на основе штамма RB51 *Brucella abortus* стала официальной вакциной для профилактики бруцеллеза у КРС. Однако все еще существуют сомнения относительно степени защитного эффекта вакцины на основе штамма RB51 по сравнению с защитой, обеспечиваемой вакциной на основе штамма S19, у КРС (Moriyón et al., 2004). Способы введения этой вакцины в разных странах немного отличаются. В США (в стране, почти свободной от бруцеллеза КРС до введения вакцинации RB51) телят вакцинируют подкожно в возрасте от 4 до 12 месяцев дозой $1-3,4 \times 10^{10}$ жизнеспособных микроорганизмов. Вакцинацию скота в возрасте старше 12 месяцев проводят только с

1.2. Описание процесса производства и требований к нему

1.2.1. Характеристики посевного материала

1.2.1.1. Биологические характеристики исходного посевного материала

Исходный посевной материал S19 *Brucella abortus* для производства вакцины получают из USDA (адрес см. в сноске 4) и используют для производства серии посевного материала, который консервируют путем лиофилизации или замораживания при температуре жидкого азота. Свойства данной серии посевного материала должны соответствовать свойствам чистой культуры CO₂-независимого биовара 1 *Brucella abortus*, чувствительного к бензилпенициллину (3 мкг [5 ME]/мл), тионину синему (2 мкг/мл) и эритрололу (1 мкг/мл) и демонстрирующего минимальную патогенность у морских свинок.

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

Исходный посевной материал штамма Rev.1 *B. melitensis* для производства вакцины имеется в продаже. Европейский эталонный штамм Rev.1, обладающий свойствами исходного посевного материала Rev.1, также можно получить в Референтной лаборатории МЭБ по бруцеллезу во Франции (адрес см. в сноске 5). Штамм Rev.1 должен соответствовать характеристикам биовара 1 *B. melitensis* за исключением того, что он должен расти медленнее. Кроме того, при инкубировании на воздухе (атмосфера, содержащая CO₂ влияет на результаты) при 37°C ± 2°C он должен расти на агаре, содержащем стрептомицин (2,5 мкг/мл), и не поддаваться ингибированию в результате внесения в подходящую культуральную среду бензилпенициллина натрия (3 мкг [5 ME]/мл), тионина синего (2 мкг/мл) и основного фуксина (20 мкг/мл).

Для дополнительной характеристики вакцин на основе S19, RB51 и Rev.1 используют ПЦР и молекулярные методы (см. Раздел В.1.4). Особым требованием для производства вакцин S19 и Rev.1 является то, что от исходного посевного материала до каждой серии посевного материала (то есть культуры, которую вносят в среду для производства вакцины) должно быть проведено не более трех пассажей, а сбор вакцинного штамма должен быть произведен после не более чем трех пассажей серии посевного материала или исходного посевного материала. Перед применением исходный посевной материал следует обязательно проверять на отсутствие диссоциации. Рекомендованный метод подготовки посевного материала описан у Alton et al. (1988).

1.2.1.2. Критерии качества

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

1.2.1.2.1. Чистота

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

1.2.1.2.2. Безопасность

Вакцины S19 и Rev.1 характеризуются сниженной вирулентностью, но должны сохранять минимальную вирулентность, чтобы быть эффективными (см. Раздел С.1.2.1.2.3 Иммуногенность). Тем не менее, тест на безопасность проводят не всегда. При желании, в случае запуска нового процесса производства, и если ожидается изменения в отношении безвредности препаратов вакцин S19 и Rev.1, испытание на безопасность проводят на КРС (S19) и овцах и козах (Rev.1) следующим образом: для теста используют 12 телят женского пола или овец/коз, соответственно, в возрасте 4-6 месяцев. Шести животным вводят вакцину в однократной или трехкратной рекомендованной дозе. Каждую партию из шести животных содержат отдельно. Всех животных наблюдают в течение 21 дня. Не должно наблюдаться значимых местных или системных реакций. Если репрезентативная серия вакцины в данной дозе и при данном способе введения показывает удовлетворительные результаты в этом испытании, испытание не обязательно повторять на сериях посевного материала или сериях вакцины, приготовленных с использованием того же исходного посевного материала и в результате того же производственного процесса. Испытание на безопасность вакцины S19/Rev.1 также можно проводить на морских свинках. Группам животных, состоящим не менее чем из 10 особей, внутримышечно вводят разные дозы вакцины, разведенной в ФБР, pH 7,2 ± 0,2, содержащей 5 × 10⁹ жизнеспособных микроорганизмов. У животных должны отсутствовать явные нежелательные эффекты и смертельные исходы.

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

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

1.2.1.2.3. Иммуногенность

i) Вакцина S19

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

a) Идентичность

Наличие микроорганизмов *Brucella abortus* в вакцине устанавливают с помощью соответствующих морфологических, серологических и биохимических тестов и методом культивирования: S19 *Brucella abortus* имеет обычные свойства биовара 1 штамма *Brucella abortus*, но не требует для роста CO_2 , не растет в присутствии бензилпенициллина (3 мкг/мл = 5 ME/мл), тионина синего (2 мкг/мл) и эритритола (1 мг/мл) (все в конечных концентрациях). Описаны методы ПЦР и другие молекулярные методы для идентификации вакцинного штамма S19 (см. Раздел В.1.4).

b) Гладкость (определение фазы диссоциации)

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

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

ii) Вакцина RB51

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

a) Идентичность

Восстановленная вакцина RB51 не должна содержать чужеродных микроорганизмов. Наличие микроорганизмов *Brucella abortus* в вакцине устанавливают с помощью соответствующих морфологических, серологических и биохимических тестов и методом культивирования: RB51 *Brucella abortus* обладает обычными свойствами биовара 1 штамма *Brucella abortus*, но на 100% находится в шероховатой фазе и не растет в присутствии рифампицина (250 мкг/мл). Описаны методы ПЦР и другие молекулярные методы для идентификации вакцинного штамма RB51 (см. Раздел В.1.4).

b) Шероховатость (определение фазы диссоциации)

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

c) Иммуногенность

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

Опыт Испании в борьбе с бруцеллезом КРС

2003 —принятые меры в борьбе с *B. abortus* (КРС) :

a) выявление зон > заболеваемости

b) ограничить передвижение племенных животных на этих территориях

c) увеличение с двух до четырех серологических тестов в год.

RB + CFT

d) обязательное уведомление об абортах в зараженных и свободных стадах

e) обязательная изоляция и убой(+) в течение пятнадцати дней.

f) → убой зараженного стада, дезинфекция под официальным надзором и карантин объектов (включая пастбища и коровники): 90 дней после удаления животных;

g) Обязательна вакцинация молодняка ремонтных телок (в возрасте от 3 до 6 месяцев). *B. abortus* S19 (CZ Veterinaria, Испания).

Доза от 4 до 12x10¹⁰ КОЕ/5мл п/к в боковую часть шеи.

L:



Опыт Испании в борьбе с бруцеллезом КРС

НО → следующий год → увеличение распространенности → новые специальные меры:

- Применение RB51 B. abortus (CZ Veterinaria, Испания) у всех самок старше 6 месяцев.
Доза: от 1 до $3,4 \times 10^{10}$ КОЕ/мл вводится подкожно в область шеи.
- Ремонтные телки (от 3 до 6 месяцев) продолжали вакцинироваться классической S19.
- Ревакцинация взрослых: через 6 месяцев после первой прививки, а затем каждые 12 месяцев в той же дозе.

В зависимости от распространенности применялись две схемы вакцинации :

Основная зона с высокой распространенностью, 100% вакцинация всех стад и племенного скота (**массовая вакцинация**).

В окрестностях основной зоны, где только в некоторых стадах фиксировали животных (+):

- Вакцинировались только (+) стада и те, что были эпидемиологически связаны с другими (+) стадами.

- Серонегативные стада не были вакцинированы, но следовали той же программе периодического тестирования и ограничений.

Опыт Испании

Эволюция распространенности бруцеллеза крупного рогатого скота в ходе программы контроля и ликвидации.

С 2004 по 2010 год распространенность значительно снизилась. Годовой темп снижения составил 76,26%.

Что касается заболеваемости животных, годовые пики регистрировались каждый год в период проведения тестирования с марта по июнь (сезон весенних отелов). Влияние сезона отела на динамику заболеваемости после 2005 г было ниже, тогда уже применялись меры биобезопасности и стратегии вакцинации S19 классической и RB51 (после 2-й дозы).

Опыт Испании

В настоящее время

Программа, принятая в Испании, помогла достичь значительного снижения, начиная с 2004 → **0% серопозитивных животных в стадах в 2019г.**

Это был первый шаг на пути получения статуса страны свободной от бруцеллеза КРС (abortus) в 2021г.

Сегодня существуют **программы мониторинга** этого заболевания.

→ Проверяются животные >24 месяцев, мин. 20% поголовья, результат серологического теста должен быть (–), если это молочные стада, то исследуются пробы в резервуаре для молока.

Еще **одной мерой в рамках мониторинга** является обязательное уведомление о **выкидышах с подозрением на бруцеллез**:

В последнем триместре беременности и при любом из следующих обстоятельств:

-В стаде численностью менее 100 голов: 2 и более случаев выкидышей в месяц или 3 в течение года.

-- В стаде численностью менее 100 голов: больше 4% выкидышей в в год.

Уведомление официальных ветеринарных служб должно осуществляться лично.



Опыт Испании в борьбе с бруцеллезом КРС

Побочные эффекты вакцинации RB51 и S19 классической.

Примерно 14 893 стельных коров → 1-я доза вакцины RB51 в 2004 г. → 6,02% аборт.

Штамм RB51 был выявлен в 78 образцах выкидышей/абортировавших коров, *B. abortus* обнаружен только в 27, а у 117 абортированных коров *Brucella* spp не обнаружена. (хотя они были (+))

В 645 случаях бактерии, вызывающие аборты, не были выделены, но у некоторых животных произошла сероконверсия к IBR (инфекционный ринотрахеит), BVD(вирусная диарея), хламидиозу и неоспорозу.

Другие факторы → травма также могла спровоцировать выкидыш.

Аборты после ревакцинации (через 6 месяцев после первой дозы и ежегодно) были незначительными.

Процент (+) крупного рогатого скота, ранее вакцинированного S19 классической, увеличился с <15% до 20-30% от всего положительного скота с 2006 г. Бруцеллы не выделялись у (+)животных, вакцинированных S19, выявленных в 2008-2009 гг.



Опыт Испании в борьбе с бруцеллезом КРС

Заключения:

Высокая плотность животных, система экстенсивного животноводства, система полива речной водой, которая разносит зараженный материал, чрезвычайно затрудняли контроль.

После массовой вакцинации RB51 + S19 вместе с другими установленными мерами =
↓распространенности.

В целом, заболевание удалось взять под контроль быстрее чем в Португалии, где использовалась только вакцина RB51 .

После введения 1й дозы RB51 стельным коровам → 6,02% абортiroвали, но RB51 **стало истинной причиной абортов лишь в 8,7% случаев** (0,52% из всех вакцинированных), гораздо ниже заявленных производителем 2%.

→ наличие других abortивных возбудителей

→ при последующих ревакцинациях аборты были незначительными.

Хотя % абортов из-за вакцины RB51 ожидаем → это компенсируется ее пользой → Высокий охват вакцинацией за короткий период времени.

Результаты → высокий уровень защиты вакциной S19, потому что очень немногие вакцинированные животные заразились во время пика вспышки.

Опыт Испании в борьбе с бруцеллезом КРС

Заключения

При обнаружении вспышки бруцеллеза крупного рогатого скота существует три основных инструмента борьбы и возможной ликвидации:

- Чувствительные диагностические тесты → обнаружить и устранить зараженных.
- Строгие меры биобезопасности для снижения риска распространения инфекции
- Вакцинация

* Вакцинация S19 классической → гуморальный ответ, который может помешать рутинному диагностическому тестированию и ограничивает ее использование у молодых телок (в возрасте от 3 до 6 месяцев).

**Вакцинация RB51 частично решает эту проблему: восприимчивый скот с повышенным риском заражения (стельный первородящий скот) можно быстро иммунизировать.

Однако следует учитывать эффективность, качество и стабильность препарата.

Контроль и ликвидация *Brucella melitensis* в Испании

ПЕРИОД 1976-1982

- Rev-1 п/к: 1×10^9 КОЕ/ доза
- Программа вакцинации

→ После 6 лет:

- Распространенность в стадах: 64%
- 8.000 случаев среди людей
- Низкий охват вакцинацией (30-40% не были провакцинированы)



1.- Экстренный Метод половина дозы

- Rev-1 п/к; 5×10^8 КОЕ/ доза
- Массовая вакцинация. Контроль случаев аборт
- Высокий % аборт в пост-вакционный период.
 - Особенно когда овец вакцинировали во 2^о-3^о месяц беременности (80%)
 - Высочайший процент аборт с 40 по 60 день после вакцинации..

Было
решено
прекратить

2.- Метод сокращенной дозы

- Rev-1 п/к; 1×10^6 КОЕ/ доза
- Массовая вакцинация. Решение о признании ее официальным методом борьбы с инфекцией было одобрено Министерством
- Система мониторинга: Тысячи аборт: с 40 по 60 день после вакцинации

Во многих
регионах его
остановили
сразу после
начала.

3.- Полевые испытания Rev-1 окулярной

- А) Полная доза: $1-2 \times 10^9$ КОЕ/доза
 - Безопаснее чем Rev-1 для подкожного введения
 - Более низкий процент аборт
- Б) Сокращенная доза окулярной вакцины: 10^6-10^7 КОЕ/доза
 - Аборт
 - Низкая эффективность



1990-2000

Rev-1 п/к

(1-2x10⁹ КОЕ/доза)

Замена

Rev-1 Окулярная

(1-2x10⁹ КОЕ/ доза)

Новая политика: Диагностика и убой+ Вакцинация

Помехи при проведении диагностики (серологические тесты).

Совместимость с программой диагностики и уоя.

Хороший уровень защиты: клеточно-опосредованный иммунный ответ.

Безопаснее чем Rev-1 п/к .

Стратегия массовой вакцинации.



Помехи в постановке диагноза

Вакцинация ремонтного стада. (% серопозитивных животных после вакцинации)

| | REV-1 SUBCUTANEOUS | | | | REV-1 CONJUNCTIVAL | | | |
|----|--------------------------|---------|----------|----------|--------------------------|---------|----------|----------|
| | Period after vaccination | | | | Period after vaccination | | | |
| | 15 days | 1 month | 4 months | 7 months | 15 days | 1 month | 4 months | 7 months |
| RB | 100% | 100% | 80% | 30% | 100% | 80% | 20% | 1% |
| CF | 100% | 100% | 60% | 20% | 100% | 70% | 15% | 0% |

Вызывает проблемы при применении программ диагностики и убоя.

Слабый и кратковременный серологический ответ, который не мешает проведению серологических тестов.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Длительный серологический ответ: Количество антител не имеет значения.

Клеточно-опосредованный иммунитет является наиболее важной защитой.

Стратегия массовой вакцинации

| | Pregnancy period | | | |
|----------------|------------------|--------|----------|------|
| | 55 days | | 120 days | |
| | SC | CONJ | SC | CONJ |
| Administration | | | | |
| Abortion rate | 68,70% | 11,70% | 9,10% | 0% |

Единственная действующая альтернатива в эндемичных районах.

Если вакцинируют взрослых овец, то предпочтительно сделать это:

- После окончания лактации.
- За месяц до спаривания.

Не существует безопасной стратегии для программы массовой вакцинации.

При использовании **Ocurev** количество аборт при вакцинации овец в последний месяц беременности снижается.



Итоговая программа

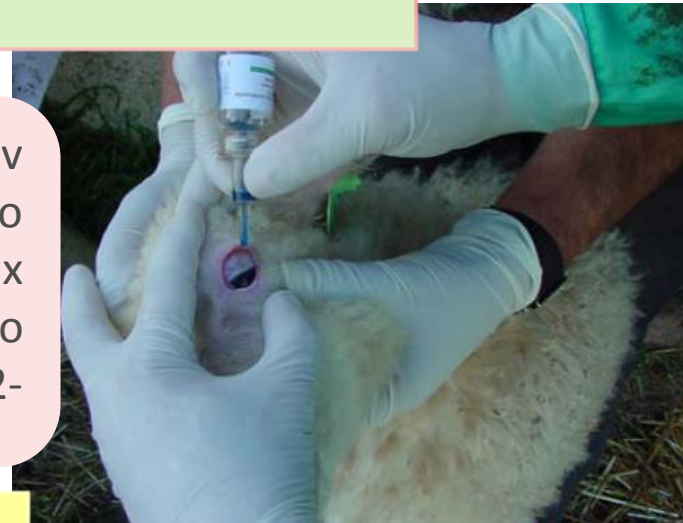
Стратегия вакцинации

- Использование окулярной вакцины. Для молодых животных
- общая дозировка: $1-2 \times 10^9$ КОЕ/доза
- Продолжительность = **5 лет**
- → **ремонтные отары** (3 - 6 мес)

Помехи при диагностике, приписываемые вакцине Rev 1, минимальны при использовании конъюнктивального пути введения, избегании вакцинации взрослых животных и предотвращении контакта недавно вакцинированных животных с остальными в течение 2-3 недель.

Экстренная массовая вакцинация только в случае:

- Высокая распространенность среди людей.
- Последствия для общественного здравоохранения
- Неконтролируемые отары



Начиная с 2008г

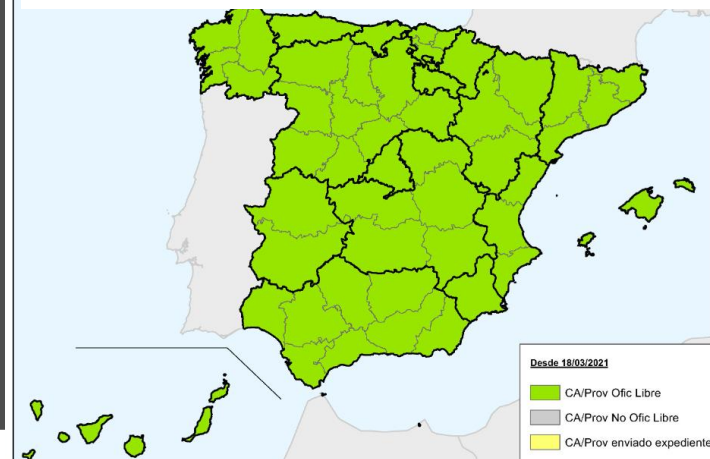
Овец и коз = 22 336 846 (94% под контролем)

Количество отар = 119.664 (86% под контролем)

Тенденция, сохранившаяся в 2010-2020 гг.

В 2021 г. = страна признана свободной от.
B. Melitensis

Регионы свободные от бруцеллеза овец и коз



| | Prevalence = 0 | Prevalence $\leq 2,5$ | Prevalence $\geq 2,5$ |
|--------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------|
| Test and Slaughter | Yes | Yes | Yes |
| Vaccination | Forbidden | Only in LVU where P is not zero | Compulsory |

**Диагностика: Серологические тесты
(рекомендованные МЭБ)**

- Роз-бенгал (скрининг)
- Реакция связывания комплемента
(**подтверждение**)



Заключения:

Когда эпидемиологические условия чрезвычайно затрудняют сдерживание и контроль вспышки, необходимо сочетание следующих мер:

Строгие
меры
биобезопас-
ности

Важность
диагностики

Массовая
вакцинация
КАЧЕСТВЕННОЙ
вакциной

=

Эффективно
остановить
распространение
за короткий
период времени

Реализация различных стратегий контроля должна быть результатом тщательного анализа ситуации, основанного на имеющихся научных знаниях, а успех может быть достигнут только при сотрудничестве всех вовлеченных сторон.

ВАКЦИНЫ



RB-51 CZV

Живая аттенуированная вакцина. Подкожно.
Стимулирует активный иммунитет против бруцеллеза, вызываемого *B. abortus* у крупного рогатого скота.

Штамм *Brucella abortus* RB51 представляет собой грубый аттенуированный мутант вирулентного штамма 2308, у которого отсутствуют О (перозамин) боковые цепи липополисахарида (ЛПС) на поверхности клеток. Она не индуцирует антитела, которые реагируют при обычных серологических исследованиях на бруцеллез, что позволяет отличить вакцинированных от инфицированных животных. Он подходит для программ ликвидации, основанных на наличии или отсутствии антител против О-боковых цепей ЛПС.



В-19 CZV ОКУЛЯРНАЯ

Ллиофилизированная суспензия живого штамма *Brucella abortus* В-19 в гладкой фазе для иммунизации крс против бруцеллеза, вызванного *B. abortus* или *B. melitensis*.

Изготовлена в соответствии со стандартами МЭБ и ЕС, вакцина В19 CZV Ocular является первой вакциной, зарегистрированной для окулярного введения.

В19 CZV OCULAR совершенно безопасна даже для взрослых коров, являясь новым профилактическим средством для борьбы с заболеванием в эндемичных районах посредством программ массовой вакцинации.

При применении к молодняку ремонтных телок и в сочетании с соответствующими диагностическими методами ее можно успешно использовать в программах диагностики и убоя.

OCUREV

Это лиофилизированная суспензия живого штамма *Brucella melitensis* REV-1, предназначенная для активной иммунизации овец и коз.

OCUREV, изготовленная в соответствии со стандартами МЭБ и ЕС, была первой разработанной и доступной конъюнктивной вакциной REV-1. В настоящее время это важный инструмент для борьбы с бруцеллезом овец и коз во многих странах мира, поскольку он обеспечивает защиту, не вызывая стойкого ответа антител.

OCUREV обеспечивает длительную защиту благодаря клеточному иммунному ответу, основному защитному механизму против бруцеллеза.





CZ Vaccines, S.A.U.

A Relva s/n 36410, O Porriño
Pontevedra, Spain

Tel.: (+34) 986 330 400

czvaccines@czvaccines.com



CZ Vaccines



www.czvaccines.com