МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34105— 2023

Животные

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

Серологические методы

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2023

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 февраля 2023 г. № 159-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 марта 2023 г. № 153-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34105—2023 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 мая 2023 г.

5 ВЗАМЕН ГОСТ 34105—2017

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
4 Условия выполнения исследований и требования безопасности 3
5 Средства измерений, оборудование, материалы, реактивы и животные 3
6 Отбор проб 6
7 Методы серологической диагностики бруцеллеза 7
Приложение А (справочное) Вакцины, применяемые для специфической профилактики бруцеллеза у животных 45

Поправка к ГОСТ 34105—2023 Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 6 2025 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Животные

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

Серологические методы

Animals. Laboratory diagnostics of brucellosis. Serological methods

Дата введения — 2023—05—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на все виды млекопитающих животных и устанавливает следующие методы серологической диагностики бруцеллеза:

- метод флуоресцентной поляризации;
- пластинчатая реакция агглютинации с антигеном, окрашенным бенгальской розовой (роз бенгал проба);
- кольцевая реакция с молоком;
- реакция агглютинации с *S*- и *R*-бруцеллезными антигенами;
- реакция связывания комплемента;
- реакция длительного связывания комплемента на холоде;
- реакция иммунодиффузии в геле агара с олигополисахаридным антигеном;
- реакция иммунодиффузии в геле агара с *R*-бруцеллезным антигеном;
- реакция непрямой гемагглютинации;
- иммуноферментный анализ;
- иммунохроматографический анализ.

Примечание — Методы применимы к бактериям рода *Brucella*.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.0.004 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.008 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.4.011 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ 83 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия

ГОСТ 1625 Формалин технический. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2156 Натрий двууглекислый. Технические условия

ГОСТ 2651 Натрия бихромат технический. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 4172 Реактивы. Натрий двузамещенный фосфорнокислый 12-водный. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4220 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6709* Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 16445 Сыворотка гемолитическая для реакции связывания комплемента. Технические условия

ГОСТ 16446 Комплемент сухой для реакции связывания комплемента. Технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18704 Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 25134 Бруцеллин ВИЭВ. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29230 (ИСО 835-4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ 33675 Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Бактериологические методы

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 33675.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

- ИФА — иммуноферментный анализ;
- ИХА — иммунохроматографический анализ;
- КР — кольцевая реакция;
- ЛПС — липополисахаридный антиген;
- МФП — метод флуоресцентной поляризации;
- ОПС-антиген — олигополисахаридный антиген;
- ПБА — патогенные биологические агенты;
- РА — реакция агглютинации;
- РБП — роз бенгал проба для диагностики бруцеллеза (пластинчатая реакция агглютинации с антигеном для роз бенгал пробы);
- РДСК — реакция длительного связывания комплемента;
- РИД — реакция иммунодиффузии;
- РНГА — реакция непрямой гемагглютинации;

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018.

- РСК — реакция связывания комплемента;
- СБП — сыворотка бруцеллезная преципитирующая;
- ТМБ — 3,3′, 5,5′-тетраметилбензидин;
- ФИТЦ — флуоресцеинизотиоцианат;
- *B.abortus — Brucella abortus*;
- *B.canis — Brucella canis*;
- *B.melitensis — Brucella melitensis;*
- *B.ovis — Brucella ovis;*
- *B.species — Brucella species*;
- *B.suis — Brucella suis*;
- IgG — иммуноглобулин класса G;
- *R*-антиген — антиген шероховатых форм *Brucella*;
- *S*-антиген — антиген гладких форм *Brucella*.

4 Условия выполнения исследований и требования безопасности

4.1 Условия выполнения исследований

4.1.1 Общие требования к помещениям — по ГОСТ ISO 7218.

4.1.2 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ISO/IEC 17025.

4.1.3 К проведению исследований допускаются квалифицированные сотрудники, имеющие опыт постановки и учета серологических реакций по диагностике бруцеллеза животных и прошедшие инструктаж по соблюдению требований биологической безопасности.

4.2 Требования безопасности

4.2.1 Общие требования безопасности при проведении работ с микроорганизмами — согласно ГОСТ 12.1.008.

4.2.2 Средства защиты работающих должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.4.011.

4.2.3 Воздух рабочей зоны должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005.

4.2.4 Обучение персонала безопасности труда — в соответствии с ГОСТ 12.0.004.

4.2.5 Диагностические серологические исследования по обнаружению в крови животных антигенов возбудителя бруцеллеза (без накопления возбудителя) и (или) антител к ним, могут проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с ПБА групп патогенности III, IV.

4.2.6 Обеззараживание материала после исследований, а также использованных индивидуальных средств защиты, инструментов и т. д. проводят путем кипячения в течение 30 мин или автоклавирования в течение 1 ч при давлении 0,2 МПа и температуре (132 ± 2) °С или химическим способом с применением дезинфицирующих средств согласно инструкции по их применению. При обеззараживании необходимо соблюдать санитарные правила, действующие на территории государств, принявших стандарт.

5 Средства измерений, оборудование, материалы, реактивы и животные

Для проведения испытаний применяют следующие средства измерений, оборудование, вспомогательные материалы и реактивы:

- pH-метр с точностью калибровки ±0,1 ед. pH при температуре от 20 °С до 55 °С;
- спектрофотометр с диапазоном длины волны от 198 до 1000 нм;
- пипетки градуированные выдувные вместимостью от 1 до 10 $см^3$ по ГОСТ 29230;
- колбы мерные по ГОСТ 1770 исполнения 2 различной вместимости 1 и 2 класса точности;
- цилиндры мерные по ГОСТ 1770 различной вместимости;
- центрифуга лабораторная со скоростью вращения ротора 2000—3000 об./мин;
- автоклав лабораторный;
- термостат, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 50 °С;
- баня водяная с терморегулятором с температурой нагрева до 100 °С;
- холодильник, обеспечивающий поддержание температуры от 2 °С до 10 °С;
- морозильная камера, обеспечивающая поддержание температуры от минус 18 °С и ниже;

- насос вакуумный;
- иглы препаровальные;
- штамп для формирования лунок в агаре;
- осветитель настольный с пределом поворота фонаря вокруг горизонтальной и вертикальной осей 0°—360° и источником света-лампой В/Ватт-8/20;
- чашки биологические (Петри) с крышками ЧБН 2 по ГОСТ 25336;
- чашки и ступки фарфоровые по ГОСТ 9147;
- комплект инструментов и приспособлений для серологических исследований крови животных на бруцеллез в РБП, в который входят:
  - шприц-полуавтомат для дозирования сыворотки,
  - калиброванная пипетка-капельница для дозирования антигена,
  - ручной смеситель на 25 лунок диагностической пластины или другой аналогичный,
  - аппарат для автоматического покачивания диагностических эмалированных пластин;
- пластины эмалированные на 25 лунок для РБП;
- пластины с лунками 72-гнездные полистироловые (планшеты);
- штативы 100-гнездные для пробирок Флоринского;
- групповые дозаторы Флоринского;
- пробирки серологические Флоринского;
- микропипетки вместимостью от 0,1 до 0,5 $см^3$;
- дозаторы пипеточные одно- и многоканальные переменного объема;
- наконечники для дозаторов вместимостью от 0,001 до 10,0 $см^3$;
- фильтры бумажные из бумаги фильтровальной по ГОСТ 12026;
- пробирки типа эппендорф с крышкой вместимостью 2 и 5 $см^3$;
- пробирки центрифужные;
- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;
- салфетки марлевые;
- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;
- вода дистиллированная ГОСТ 6709;
- кислота соляная по ГОСТ 3118 х.ч.;
- формалин по ГОСТ 1625;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- натрий углекислый ГОСТ 83;
- натрий двууглекислый по ГОСТ 2156;
- кислота борная по ГОСТ 18704;
- натрия бихромат по ГОСТ 2651;
- калий двухромовокислый по ГОСТ 4220;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 4172;
- калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- фильтр мембранный;
- сыворотка гемолитическая по ГОСТ 16445;
- комплемент сухой для РСК по ГОСТ 16446;
- кровь барана-донора;
- бруцеллин ВИЭВ по ГОСТ 25134;
- набор для диагностики бруцеллеза МФП, в состав которого входят следующие компоненты:
  - положительная и отрицательная сыворотки крови,
  - конъюгат — ОПС-антиген, меченный флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ),
  - разбавитель образцов сыворотки;
- тест-система для диагностики бруцеллеза животных в роз бенгал пробе (РБП), в состав которой входят следующие компоненты:
  - антиген бруцеллезный для РБП,
  - сыворотка бруцеллезная сухая,
  - сыворотка крови крупного рогатого скота негативная сухая;
- тест-система для диагностики бруцеллеза животных в КР с молоком, в состав которой входят следующие компоненты:
  - антиген бруцеллезный для КР с молоком,

- сыворотка бруцеллезная сухая;

- тест-система для диагностики бруцеллеза животных в РА, РСК и РДСК, в состав которой входят следующие компоненты:

- антиген бруцеллезный единый для РА, РСК и РДСК,
- сыворотка бруцеллезная сухая,
- сыворотка крови крупного рогатого скота негативная сухая;

- набор для диагностики бруцеллеза животных в реакции иммунодиффузии, в состав которого входят следующие компоненты:

- ОПС — *S*-антиген,
- сыворотка *S*-бруцеллезная преципитирующая,
- натрий хлористый по ГОСТ 4233,
- агар по ГОСТ 17206;

- набор для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B.canis,* с *R*-бруцеллезным антигеном, в состав которого входят следующие компоненты:

- *R*-бруцеллезный антиген для РА в карбонат-бикарбонатном М-буфере с 0,5 %-ным фенолизированным физиологическим раствором,
- *R*-бруцеллезная сыворотка для РА,
- *R*-бруцеллезный антиген для РИД,
- сыворотка *R*-бруцеллезная преципитирующая,
- натрий хлористый по ГОСТ 4233,
- агар по ГОСТ 17206;

- набор для серологической диагностики бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота в РНГА, в состав которого входят следующие компоненты:

- антиген бруцеллезный эритроцитарный для РНГА,
- взвесь формалинизированных несенсибилизированных эритроцитов,
- сыворотка бруцеллезная,
- сыворотка негативная;

- набор для выявления специфических антител к бактериям рода *Brucella* методом непрямого ИФА, в состав которого входят следующие компоненты:

- компонент № 1 — полистироловый 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованным в лунках *S*-антигеном,
- компонент № 2 — положительный контроль − сыворотка крови, содержащая бруцеллезные антитела,
- компонент № 3 — отрицательный контроль — сыворотка крови, не содержащая бруцеллезных антител,
- компонент № 4 — положительный контроль − молоко, содержащее бруцеллезные антитела,
- компонент № 5 — отрицательный контроль − молоко, не содержащее бруцеллезных антител,
- компонент № 6 — антивидовой конъюгат (моноклональные антитела к IgG крупного и мелкого рогатого скота, меченные пероксидазой),
- компонент № 7 — концентрат буферного раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата,
- компонент № 8 — концентрат промывочного буферного раствора,
- компонент № 9 — раствор субстрата (H_2O_2),
- компонент № 10 — раствор хромогена (ТМБ),
- компонент № 11 — останавливающий раствор (1 М раствор фосфорной кислоты);

- набор для выявления и дифференциации антител к *S*- и *R*-формам возбудителей бруцеллеза конкурентным иммуноферментным методом, например, в состав которого входят следующие компоненты:

- компонент № 1 — полистироловый 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированными в лунках антигенами *B.species* в *S*-форме (нечетные ряды) и *R*-форме (четные ряды),
- компонент № 2 — анти-*B.species* *S*-специфическая сыворотка крови (положительный *S*-контроль),
- компонент № 3 — анти-*B.species* *R*-специфическая сыворотка крови (положительный *R*-контроль),

- компонент № 4 — сыворотка крови, не содержащая антител к *Brucella spp* (отрицательный контроль),
- компонент № 5 — конъюгат (моноклональные антитела к антигенам *Brucella spp* в *S*- и *R*-формах, меченные пероксидазой),
- компонент № 6 — концентрат промывочного буферного раствора,
- компонент № 7 — концентрат буферного раствора для разведения конъюгата,
- компонент № 8 — раствор субстрата (H_2O_2),
- компонент № 9 — раствор хромогена (ТМБ),
- компонент № 10 — останавливающий раствор (1 М раствор фосфорной кислоты);

- набор для выявления собак и других плотоядных, инфицированных *Brucella canis,* иммуноферментным методом, в состав которого входят следующие компоненты:
- полистироловый 96-луночный планшет с адсорбированным в лунках *R*-бруцеллезным антигеном,
- положительная и отрицательная сыворотки крови,
- моноклональные антитела к *R*-бруцеллезному антигену, меченные пероксидазой (конъюгат),
- неспецифические химические компоненты;

- тест-система для определения антител к ЛПС-антигену *B.abortus* и *B.melitensis* в сыворотке крови крупного рогатого скота и овец методом ИХА, в состав которой входят следующие компоненты:
- $К_1$ — иммунохроматографические тест-полоски, нитроцеллюлозные мембраны на полимерной основе белого цвета, ламинированные защитными этикетками с обозначениями разного цвета: в нижней части — стрелки, указывающие направления погружения полоски в тестируемую пробу; в верхней части — название рода и вида возбудителя исключаемой болезни,
- $К_2$ — буферный раствор для разведения проб,
- негативная сыворотка (сыворотка крови здоровых животных).

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов, дезинфицирующих средств и материалов по качеству не ниже указанных. Допускается использование посуды одноразового применения.

6 Отбор проб

6.1 Взятие крови у животных для получения сыворотки проводят:
- из яремной или хвостовой вены у крупного рогатого скота;
- яремной вены у мелкого рогатого скота, лошадей и оленей;
- яремной, ушной или хвостовой вены у свиней;
- головной вены, вены предплечья или латеральной подколенной вены голени у собак;
- бедренной вены у лисиц и песцов;
- путем отсечения подушечки среднего пальца задней лапы или кончика хвоста у норок.

Кровь берут в вакуумные пробирки с активатором образования сгустка по 5—7 $см^3$ (от пушных зверей по 1—2 $см^3$) или в чистые сухие бактериологические пробирки. Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

6.1.1 Для свертывания и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают в термостате при температуре 30 °С—38 °С в течение 1 ч или при комнатной температуре в течение 2 ч, если сгусток крови сохраняется на плаву, прикрепившись к одной из стен пробирок его отделяют путем обведения вокруг него стальной спицей, которую затем обеззараживают ватным тампоном, смоченным 5 %-ным раствором фенола. Затем пробирки помещают в холодильник при температуре 2 °С—8 °С и через 16—24 ч отстоявшуюся сыворотку сливают в чистые сухие пробирки, соблюдая нумерацию проб, и направляют для исследования в лабораторию в свежем или консервированном виде (сыворотку крови собак сливают через 3—4 ч и повторно через 10—12 ч).

6.1.2 Консервирование сывороток проводят:
- добавлением 0,05 $см^3$ (1 капля) 5 %-ного раствора фенола на 1 $см^3$ сыворотки при тщательном перемешивании;
- сухой борной кислотой (3 %—4 % к объему сыворотки) до получения насыщенного раствора и образования на дне пробирки небольшого осадка;
- путем однократного замораживания.

Неконсервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 6 сут со дня взятия крови при условии хранения их при температуре от 2 °С до 8 °С.

Сыворотки, консервированные фенолом или борной кислотой, пригодны для исследования в течение 30 дней, замороженные сыворотки после однократного оттаивания и хранения при температуре от 2 °С до 8 °С — в течение 5 сут.

Замороженные сыворотки подлежат хранению при температуре минус 18 °С и ниже не более 6 мес.

Мутные, проросшие, гемолизированные сыворотки к исследованию на бруцеллез не пригодны.

6.2 Для исследования молока на бруцеллез в кольцевой реакции, пробу цельного свежего молока от дойного маточного поголовья крупного рогатого скота отбирают из каждой доли вымени в одну бактериологическую пробирку в количестве 10—15 $см^3$. Перед отбором проб первые порции молока сдаивают. Пробы молока на рынках берут из каждой отдельной посуды (бидон, фляга и др.) после тщательного его перемешивания. Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

6.2.1 Молоко исследуют: свежее (не более 12 ч с момента дойки), охлажденное до температуры (4 ± 2) °С — в течение 24 ч; консервированное добавлением в каждую пробу одной капли 10 %-ного раствора формалина на 5 $см^3$ молока и тщательного перемешивания — в течение 2—3 сут при температуре хранения от 2 °С до 8 °С.

Перед исследованием молоко тщательно перемешивают для равномерного распределения сливок.

6.2.2 При массовом исследовании молока работу по отбору проб и постановке кольцевой реакции допускается проводить непосредственно на ферме в специально отведенном помещении.

6.2.3 Не разрешается исследовать в кольцевой реакции молоко от коров (буйволиц), больных маститом или болезнями, сопровождающимися повышением температуры тела, а также молоко животных в запуске и первые две недели после родов. Молоко, имеющее повышенную кислотность (30° по Тернеру и выше), исследованию не подлежит, т. к. антиген обесцвечивается.

6.3 На направляемый в лабораторию материал заполняют сопроводительный документ.

7 Методы серологической диагностики бруцеллеза

Сущность методов заключается в выявлении в сыворотке крови животных специфических антител к бруцеллезным антигенам.

Срок проведения серологических исследований составляет не более 14 календарных дней.

7.1 Метод флуоресцентной поляризации (МФП)

Сущность метода заключается в выявлении в образце сыворотки крови крупного рогатого скота антител к ОПС-антигену бруцелл, меченному ФИТЦ. При отсутствии антител показатель поляризации низкий, при их наличии и связывании с конъюгатом он увеличивается.

Для измерения степени поляризации света, меняющейся при взаимодействии конъюгата ОПС-антигена с антителами, используют анализатор флуоресцентной поляризации.

7.1.1 Подготовка к исследованию

Перед началом работы компоненты набора и анализируемые пробы сыворотки крови выдерживают в течение 30 мин при температуре от 18 °С до 25 °С.

Подготовка рабочего раствора разбавителя: к одной части разбавителя добавляют 24 части дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Рабочий раствор разбавителя не должен содержать взвешенных частиц, его хранят при комнатной температуре и используют в течение 1 мес.

Исследуемые образцы материала не должны содержать нерастворимых частиц, при наличии их удаляют центрифугированием при 3000 об./мин в течение 15—20 мин. Гемолизированные образцы пригодны для тестирования. Лиофилизированные образцы растворяют, замороженные — полностью размораживают и тщательно перемешивают.

7.1.2 Проведение исследования

В пробирки вносят по 0,02 $см^3$ каждой исследуемой пробы сыворотки крови, положительного контроля и отрицательного контроля в трех повторах.

Затем во все пробирки вносят по 1 $см^3$ рабочего раствора разбавителя, тщательно перемешивают и инкубируют 3—30 мин при комнатной температуре.

После этого учитывают фоновые значения поляризации всех исследуемых проб и контролей.

Далее во все пробирки вносят по 0,01 $см^3$ конъюгата, тщательно перемешивают, инкубируют в течение 2—5 мин при комнатной температуре и определяют значения показателей поляризации.

Для положительного контроля значение должно быть 120—250 единиц милиполяризациии (мП). Среднее значение показателя отрицательного контроля должно составлять от 70 до 95 мП.

7.1.3 Обработка результатов

Полученные результаты сравнивают со средним значением отрицательного контроля.

Результаты считают:

- положительными — при значении, превышающем среднее значение отрицательного контроля на 20 мП (> 20 мП);
- отрицательными — при значении, не превышающем среднее значение отрицательного контроля на 10 мП (≤ 10 мП);
- недостоверными — при значении в интервале от 10 до 20 мП по сравнению со средним значением отрицательного контроля (10 < мП ≤ 20).

При получении положительных и недостоверных результатов исследование проводят в двух повторностях. Если в обоих повторных тестах получают значения на 10 мП ниже среднего значения отрицательного контроля, образец оценивают, как отрицательный. Если в каком-либо из повторных тестов значение остается в диапазоне от 10 до 20 мП по сравнению со средним значением отрицательного контроля, образец оценивают как недостоверный. Если в обоих повторных тестах получены значения, превышающие среднее значение отрицательного контроля на 20 мП, образец считают положительным.

7.2 Пластинчатая реакция агглютинации с антигеном бруцеллезным для роз бенгал пробы (РБП)

Сущность метода заключается в выявлении специфических антител в сыворотке крови животных гомологичных цветному бруцеллезному антигену, результатом чего является формирование агглютината окрашенных бруцелл антигена в виде крупных или мелких хлопьев розового цвета.

7.2.1 Подготовка к исследованию

Перед постановкой реакции роз бенгал антиген и исследуемые сыворотки выдерживают 30—40 мин при комнатной температуре и встряхивают для получения однородной смеси.

Реакцию проводят на чистых сухих эмалированных диагностических пластинах с лунками при температуре не ниже 18 °С. На бортиках пластинки против каждой лунки записывают номер исследуемой сыворотки.

7.2.2 Проведение исследования

РБП применяют как экспресс-метод диагностики бруцеллеза у не иммунизированного противобруцеллезными вакцинами крупного рогатого скота, яков, зебу, буйволов (далее — крупный рогатый скот), овец, коз (далее — мелкий рогатый скот), семейство верблюжьих (далее — верблюды), лошадей, ослов, мулов (далее — лошади), северных оленей, оленей, маралов, лосей (далее — олени), свиней, собак.

Для исследования применяют тест-системы для диагностики бруцеллеза животных в РБП.

7.2.2.1 Исследуемые сыворотки крови в объеме 0,03 $см^3$ вносят на дно лунки при помощи одноканального дозатора со сменным наконечником или шприца-полуавтомата или микропипетки.

7.2.2.2 После внесения каждой сыворотки шприц-полуавтомат (микропипетку) трижды промывают фенолизированным 0,85 %-ным раствором хлористого натрия по 7.4.1.1 и кончик подсушивают на фильтровальной бумаге. Антиген вносят при помощи одноканального дозатора со сменным наконечником, или микропипетки, или калиброванной пипетки-капельницы для антигена. При исследовании сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов в каждую лунку рядом с сывороткой вносят 0,03 $см^3$ антигена, а при исследовании сывороток крови мелкого рогатого скота и оленей, свиней и собак — 0,015 $см^3$ антигена.

Антиген с сывороткой в каждой лунке тщательно смешивают активными движениями смесителя до получения однородной жидкости, распределяя ее при этом по всей поверхности лунки. После смешивания сывороток во всех лунках пластины смеситель ополаскивают фенолизированным 0,85 %-ным раствором хлористого натрия по 7.4.1.1 и просушивают марлевой салфеткой или фильтровальной бумагой.

7.2.2.3 Пластину со смесью компонентов реакции покачивают в течение 4 мин при помощи аппарата для автоматического покачивания диагностических пластин, или вручную, не допуская смешивания содержимого соседних лунок. При положительной реакции в течение 4 мин в смеси сыворотки и антигена формируются мелкие или крупные хлопья агглютината розового цвета.

В начале работы ставят контроль антигена с негативной и бруцеллезной сыворотками в тех же дозах, а также антигена на спонтанную агглютинацию (к 0,03 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия добавляют 0,03 $см^3$ роз бенгал антигена).

По окончании работы пластины дезинфицируют погружением на 5 мин в 5 %-ный раствор хлорамина, или в 3 %-ный раствор перекиси водорода, или другого дезинфицирующего средства в концентрации и экспозиции, определенной для возбудителя данного вида, затем обрабатывают любым моющим средством, промывают водопроводной затем дистиллированной водой, высушивают на воздухе или в термостате при температуре 37 °С—38 °С и используют повторно.

7.2.3 Обработка результатов

Учет результатов реакции проводят визуально в течение 4 мин после смешивания сывороток с антигеном при слегка наклонном положении пластинки.

Реакцию считают положительной при наличии агглютината в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета.

Реакцию считают отрицательной при отсутствии агглютинации (смесь гомогенная и равномерно окрашенная).

При нечетко выраженной агглютинации проводят повторное исследование сыворотки и по его результатам дают окончательную оценку реакции (положительная или отрицательная).

При получении отрицательных результатов РБП по всему стаду его считают благополучным по бруцеллезу.

В благополучных по бруцеллезу хозяйствах, в том числе фермах, стадах или группах животных населенного пункта все сыворотки крови от животных, исследованные с положительным результатом в РБП, в тот же или на другой день исследуют, как указано в таблице 12.

Если при исследовании будут получены отрицательные результаты, то у всех животных, исследованных с положительным результатом в РБП, через 25—30 дней повторно берут кровь, полученные сыворотки исследуют на бруцеллез, как указано в таблице 12. При получении отрицательных результатов животных считают здоровыми и исследование на бруцеллез прекращают.

В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах при положительном результате исследования в РБП животных считают больными бруцеллезом.

7.3 Кольцевая реакция (КР) с молоком

Сущность метода состоит в выявлении антител в молоке дойного маточного поголовья крупного рогатого скота к специфическому антигену.

Положительная реакция проявляется образованием синего кольца в верхнем слое сливок.

7.3.1 Подготовка к исследованию

Для постановки КР с молоком применяют тест-системы или наборы, используемые на территории государств, принявших стандарт, в состав которых входит антиген бруцеллезный для КР с молоком и сыворотка бруцеллезная. Реакцию ставят в серологических пробирках Флоринского, которые нумеруют в соответствии с описью проб молока, пробы которого отбирают по 6.2.

7.3.2 Проведение исследования

Исследование молока на бруцеллез в КР проводят в лабораториях или непосредственно в хозяйствах.

Перед исследованием молоко тщательно перемешивают для равномерного распределения сливок.

В пробирки вносят по 2 $см^3$ молока дозатором одноканальным со сменным наконечниками или пипеткой, которую после внесения каждой пробы двукратно промывают теплой водопроводной водой. Антиген вносят по 0,1 $см^3$ в каждую пробирку с пробой молока дозатором с наконечником. После внесения антигена в пробирки одного ряда, штатив энергично встряхивают и т. д. После внесения антигена во все пробирки штатив встряхивают дополнительно.

При исследовании каждой партии молока ставят контрольные пробы:

- молоко от заведомо здорового животного;
- смесь молока здорового животного с бруцеллезной сывороткой (0,1 $см^3$ сыворотки на 2 $см^3$ молока).

Штативы с исследуемыми и контрольными пробами молока выдерживают в водяной бане или термостате при температуре 37 °С—38 °С в течение 1 ч.

Результаты реакции учитывают визуально через 30—40 мин после извлечения штативов из водяной бани (термостата) и оценивают в крестах по следующей схеме:

+++ (три креста) — четко выраженное синее кольцо в верхней части столбика молока в слое сливок, остальная часть молока остается белой;

++ (два креста) — четко выраженное синее кольцо в верхней части столбика молока в слое сливок, остальная часть молока имеет синеватый цвет;

+ (один крест) — синее кольцо в слое сливок выражено слабо и весь столбик молока имеет синий цвет;

- (минус) — столбик молока остается равномерно окрашенным в первоначальный синий цвет, который был получен сразу после смешивания с антигеном, а слой сливок — белого или слегка желтоватого цвета.

7.3.3 Обработка результатов

Все пробы молока с оценкой в +++ (три креста) и ++ (два креста) считают положительными, + (один крест) — сомнительными.

Молоко с положительным результатом в КР с молоком исследуют в пробе на мастит. При положительном результате на мастит результаты КР с молоком не учитывают.

В благополучном по бруцеллезу хозяйстве при получении отрицательных результатов КР с молоком по всему стаду его считают благополучным по бруцеллезу.

При получении положительного или сомнительного результата КР сыворотку крови от всех животных данного стада (группы, населенного пункта) исследуют в РА и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА, и (или) РНГА.

Отрицательный результат исследования сывороток крови свидетельствует об их благополучии по бруцеллезу, независимо от результатов, полученных в КР.

При получении положительных или сомнительных результатов серологического исследования статус животных по бруцеллезу определяют с учетом их интерпретации.

7.4 Реакция агглютинации (РА) в пробирках

Сущность метода заключается в выявлении в сыворотке крови животных специфических агглютинирующих антител к бруцеллезным антигенам в *S*- или *R*-форме.

РА в пробирках с антигеном бруцеллезным в *S*-форме применяют при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота, лошадей, верблюдов, оленей, собак, пушных зверей и морских свинок, вызываемым *B.abortus, B.melitensis, B.suis;* в *R*-форме — при диагностике бруцеллеза собак, вызываемого *B.canis.*

7.4.1 Подготовка к исследованию

7.4.1.1 Приготовление фенолизированных растворов хлористого натрия с содержанием 0,5 % фенола

В 1 дм^3 дистиллированной воды растворяют соответственно 8,5, 50 и 100 г хлористого натрия и добавляют к каждому раствору по 5 г фенола. Растворы фильтруют дважды через бумажный фильтр. Растворы хранят при температуре от 2 °С до 20 °С и используют в течение 1 мес.

7.4.1.2 При исследовании в РА сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, собак, пушных зверей и морских свинок антиген разводят фенолизированным 0,85 %-ным раствором хлористого натрия по 7.4.1.1; мелкого рогатого скота — фенолизированным 5 %-ным раствором хлористого натрия по 7.4.1.1; оленей — фенолизированным 10 %-ным раствором хлористого натрия по 7.4.1.1.

7.4.1.3 Сыворотки крови исследуют в четырех разведениях в пробирках Флоринского в объеме 1 см^3:

- крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов — в разведениях 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400;
- мелкого рогатого скота, оленей и собак — в разведениях 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200;
- собак с *R*-бруцеллезным антигеном *B.canis* — в разведениях 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400;
- пушных зверей и морских свинок — в разведениях 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80.

7.4.2 Проведение исследования (развернутое)

7.4.2.1 Исследование каждой сыворотки проводят в пяти пробирках:

- сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов по 0,1 см^3 вносят в пробирки первого ряда, содержащие по 2,4 см^3 фенолизированного 0,85 %-ного раствора хлористого натрия по 7.4.1.1 (разведение 1:25);

- сыворотки крови мелкого рогатого скота и собак по 0,2 см^3 вносят в пробирки первого ряда, содержащие по 2,3 см^3 фенолизированного 5 %-ного раствора хлористого натрия по 7.4.1.1 (разведение 1:12,5);

- сыворотку крови оленей по 0,2 см^3 вносят в пробирки первого ряда, содержащие по 2,3 см^3 фенолизированного 10 %-ного раствора хлористого натрия по 7.4.1.1 (разведение 1:12,5);

- сыворотку крови собак по 0,2 см^3 вносят в пробирки первого ряда, содержащие по 2,3 см^3 фенолизированного 0,85 %-ного раствора хлористого натрия по 7.4.1.1 (разведение 1:12,5);

- сыворотку крови пушных зверей и морских свинок по 0,3 см^3 вносят в пробирки первого ряда, содержащие по 1,2 см^3 фенолизированного 0,85 %-ного раствора хлористого натрия по 7.4.1.1 (разведение 1:5);

- при исследовании с *R*-бруцеллезным антигеном *B.canis* сыворотку крови собак по 0,1 см^3 вносят в пробирки, содержащие по 2,4 см^3 фенолизированного 0,85 %-ного раствора хлористого натрия по 7.4.1.1 (разведение 1:25).

В пробирки второго ряда фенолизированный раствор хлористого натрия не вносят.

В пробирки третьего, четвертого и пятого рядов вносят по 0,5 см^3 соответствующего фенолизированного раствора хлористого натрия по 7.4.1.1.

Затем из пробирок первого ряда по 0,5 см^3 исходного разведения сыворотки вносят в пробирки второго и третьего рядов.

После пипетирования (не менее трех раз) разведение сыворотки из третьего ряда по 0,5 см^3 переносят в пробирки четвертого ряда и после пипетирования из четвертого — в пятый. Из пробирок пятого ряда 0,5 см^3 жидкости удаляют. Таким образом получают последовательные двукратные разведения образцов сыворотки.

7.4.2.2 В пробирки второго, третьего, четвертого и пятого рядов с разведенными сыворотками при помощи дозатора одноканального со сменным наконечником или группового дозатора Флоринского вносят по 0,5 см^3 антигена в рабочем разведении 1:10 (1,0 см^3 + 9,0 см^3) соответствующим фенолизированным раствором хлористого натрия.

После внесения антигена разведение сыворотки в каждой пробирке удваивается и, в зависимости от вида исследуемых животных, будет составлять 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400; 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200 или 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80.

В пробирки первого ряда антиген не вносят, они служат контролем сыворотки на самоагглютинацию. При наличии хлопьев, фибрина, эритроцитов и посторонних примесей результаты реакции агглютинации не учитывают.

При постановке реакции агглютинации одновременно с испытуемыми сыворотками ставят контроли с негативной и бруцеллезной сывороткой в таких же разведениях.

7.4.2.3 После добавления к исследуемым и контрольным сывороткам антигена штативы с пробирками интенсивно встряхивают для смешивания компонентов и помещают в термостат при температуре 37 °С—38 °С на 16—20 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции.

7.4.3 Проведение исследования (в двух разведениях)

Постановка реакции агглютинации в двух разведениях допускается при проведении массовых серологических исследований.

Массовые исследования пушных зверей и морских свинок не проводят.

7.4.3.1 Исследуемые и контрольные сыворотки вносят в две серологические пробирки Флоринского в объеме 0,02 и 0,01 см^3 (сыворотки крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов) или 0,04 и 0,02 см^3 (сыворотки мелкого рогатого скота, оленей и собак). Затем в каждую пробирку вносят по 1,0 см^3 антигена, разведенного 1:20 (1,0 см^3 антигена единого бруцеллезного + 19,0 см^3 соответствующего фенолизированного раствора хлористого натрия, приготовленного по 7.4.1.1).

При этом разведения сывороток будут соответственно 1:50 и 1:100 или 1:25 и 1:50.

После добавления к исследуемым и контрольным сывороткам антигена штативы с пробирками интенсивно встряхивают для смешивания компонентов и помещают в термостат при температуре 37 °С—38 °С на 16—20 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции.

7.4.3.2 При получении положительных или сомнительных результатов РА при массовом исследовании эти сыворотки исследуют в четырех разведениях.

7.4.3.3 Для более объективной оценки результатов РА готовят образцы сравнения мутности, соответствующие 75 %, 50 %, 25 % и 0 % просветления жидкости.

В четыре пробирки последовательно вносят 1, 2, 3 и 4 $см^3$ антигена, разведенного соответствующим фенолизированным раствором хлористого натрия в соотношении 1:10. Затем в том же порядке в три первые пробирки добавляют 3, 2 и 1 $см^3$ соответствующего фенолизированного раствора хлористого натрия. После встряхивания пробирок из каждой из них переносят по 0,5 $см^3$ в серологические пробирки и добавляют по 0,5 $см^3$ фенолизированного раствора хлористого натрия. Полученные образцы сравнения мутности соответствуют 75 %, 50 % и 25 % просветления жидкости. В четвертой пробирке просветление отсутствует. Образцы сравнения мутности готовят каждый раз при постановке РА и выдерживают в термостате одновременно с основной реакцией.

7.4.4 Обработка результатов

Результаты реакции учитывают визуально, определяя степень просветления жидкости, внешний вид агглютината (при его наличии) или антигена на дне пробирки до и затем, после легкого встряхивания, оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ (четыре креста) — полное просветление жидкости, микробные клетки антигена осели на дно пробирки в виде «зонтика», при легком встряхивании «зонтик» разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остается прозрачной (100 % агглютинации);

+++ (три креста) — неполное просветление жидкости и хорошо выраженный «зонтик» агглютината (75 % агглютинации);

++ (два креста) — неполное просветление жидкости, «зонтик» агглютината умеренно выражен (50 % агглютинации);

+ (один крест) — едва заметное просветление жидкости, «зонтик» агглютината выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество хлопьев или комочков (25 % агглютинации);

− (минус) — просветления жидкости и образования «зонтика» агглютината не наступило, на дне пробирки по центру образуется небольшой осадок микробов антигена в виде точки или пятна. При встряхивании осадок легко разбивается, поднимается вверх в виде косички и равномерно распределяется в жидкости, которая при этом приобретает первоначальную мутность.

За титр антител принимают наибольшее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация на два креста, что соответствует количеству международных единиц (МЕ) агглютинирующих антител в 1 $см^3$ сыворотки (например, сыворотка с титром 1:100 содержит 100 МЕ, 1:200—200 МЕ и т. д.).

В заключении лаборатории о результатах исследования должна быть отражена диагностическая оценка каждой пробы (положительная, сомнительная, отрицательная) и конечное разведение (титр) сыворотки, в котором получен соответствующий результат, выраженный в международных единицах (например, титр сыворотки крови крупного рогатого скота 1:200 с оценкой два — четыре креста — «положительная» 200 МЕ, титр сыворотки 1:25—1:100 с оценкой два — четыре креста — «сомнительная» 100 МЕ).

Реакцию считают положительной (см. таблицу 12):

- в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного и вакцинированного крупного рогатого скота с содержанием 200 МЕ антител и выше; в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного и вакцинированного крупного рогатого скота с содержанием 100 МЕ антител и выше;
- в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у лошадей и верблюдов с содержанием 200 МЕ антител и выше; в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у лошадей и верблюдов с содержанием 100 МЕ антител и выше;
- в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у вакцинированного мелкого рогатого скота с содержанием 200 МЕ антител и выше; в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного мелкого рогатого скота с содержанием 100 МЕ антител и выше; в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного и вакцинированного мелкого рогатого скота с содержанием 50 МЕ антител и выше;
- в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у вакцинированных оленей с содержанием 100 МЕ антител и выше; в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированных оленей и не благополучных хозяйствах у невакцинированных и вакцинированных оленей с содержанием 50 МЕ антител и выше;
- в благополучных и неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у собак (с *S*-антигеном) с содержанием 50 МЕ антител и выше; с *R*-антигеном в титре 1:100 с оценкой ++ и выше;
- пушных зверей и морских свинок с содержанием 10 МЕ антител и выше.

Реакцию считают сомнительной (см. таблицу 12):

- в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного и вакцинированного крупного рогатого скота с содержанием не выше 100 МЕ антител; в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного и вакцинированного крупного рогатого скота с содержанием 50 МЕ антител;
- в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у лошадей и верблюдов с содержанием не выше 100 МЕ антител; в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у лошадей и верблюдов с содержанием 50 МЕ антител;
- в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у вакцинированного мелкого рогатого скота с содержанием не выше 100 МЕ антител; в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного мелкого рогатого скота с содержанием не выше 50 МЕ антител; в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного и вакцинированного мелкого рогатого скота с содержанием 25 МЕ антител;
- в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у вакцинированных оленей с содержанием не выше 50 МЕ антител; в благополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированных оленей и не благополучных хозяйствах у невакцинированных и вакцинированных оленей с содержанием 25 МЕ антител;
- в благополучных и неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у собак (с *S*-антигеном) с содержанием 25 МЕ антител; с *R*-антигеном в титре не выше 1:50 с оценкой ++++.

При получении сомнительного результата в благополучных по бруцеллезу хозяйствах пробу исследуют дополнительно или повторно, как указано в таблице 12.

В благополучных по бруцеллезу хозяйствах при сохранении или снижении титра при повторном исследовании в РА животных считают здоровыми. При повышении титра антител в РА или положительных результатах в других серологических реакциях (см. таблицу 12), животных считают больными.

В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах, животных, исследованных с сомнительным результатом, считают больными.

При положительном контроле на самоагглютинацию диагностическую оценку проводят по результатам исследования в других реакциях, как указано в таблице 12.

7.5 Реакция связывания комплемента (РСК) и реакция длительного связывания комплемента на холоде (РДСК)

Сущность реакций состоит в том, что при наличии в исследуемой сыворотке антител, гомологичных антигену образуется иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент, т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген — антитело.

В отличие от РСК постановка главного опыта в РДСК предполагает инкубирование компонентов реакции, при температуре 2 °С—6 °С в течение 16—18 ч.

РСК (РДСК) применяют при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота, лошадей, оленей, верблюдов, свиней, собак и пушных зверей.

РДСК допускается применять вместо РСК, в том числе при исследовании сывороток, обладающих антикомплементарными свойствами и является основной реакцией при диагностике инфекционного эпидидимита баранов.

7.5.1 Подготовка к исследованию

Сыворотки и компоненты РСК и РДСК разводят 0,85 %-ным раствором хлористого натрия или забуференным 0,85 %-ным раствором хлористого натрия.

7.5.1.1 Приготовление 0,85 %-ного раствора хлористого натрия

Для приготовления 1 $дм^3$ раствора 8,5 г хлористого натрия растворяют в дистиллированной воде, доводят до кипения, устанавливают pH 6,8—7,2 ед. pH. Регулировку pH осуществляют с помощью раствора гидроокиси натрия (NaOH) с концентрацией 40 $г/дм^3$ (1 $моль/дм^3$) или разбавленной соляной кислоты (HCl) концентрацией 36,5 $г/дм^3$ (1 $моль/дм^3$). Раствор дважды фильтруют через бумажный фильтр и хранят в стеклянных флаконах или бутылках, закрытых резиновой или корковой пробкой при температуре от 2 °С до 25 °С в течение 1 мес.

7.5.1.2 Приготовление забуференного 0,85 %-ного раствора хлористого натрия, с pH 7,0—7,2

Для установления нужной величины pH предварительно готовят 1/15 М растворы двузамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$) и однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4). С этой целью в первую мерную колбу вносят 23,0 г Na_2HPO_4 и доливают дистиллированной водой до отметки 1 $дм^3$. Во вторую мерную колбу вносят 9,0 г KH_2PO_4 и доливают дистиллированной водой до отметки 1 $дм^3$, компоненты в мерных колбах тщательно растворяют путем встряхивания колб. Колбы

с полученными 1/15 М растворами солей закрывают и хранят при температуре 2 °С—8 °С в течение 1 мес.

Для приготовления 1 $дм^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия 8,5 г хлористого натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до кипения. Затем к 1 $дм^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия добавляют смеси 1/15 М растворов Na_2HPO_4 и KH_2PO_4 в соотношении 7:3 или 8:2 (в зависимости от исходной pH воды) 10 $см^3$ смеси. Компоненты в колбе тщательно перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 30 мин. Хранят при температуре от 2 °С до 25 °С в течение 2 мес.

7.5.1.3 Приготовление раствора Альсевера

В 1 $дм^3$ дистиллированной воды растворяют 18,7 г глюкозы, 4,2 г хлорида натрия, 8,0 г лимоннокислого натрия, 0,5 г лимонной кислоты. Раствор доводят до кипения, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают во флаконы или бутыли и стерилизуют путем трехкратного автоклавирования текучим паром при 100 °С в течение 30 мин или путем фильтрации через стерилизующие фильтры.

7.5.1.4 Получение и подготовка к работе эритроцитов барана для постановки РСК и РДСК

Эритроциты барана — 2,5 %-ная взвесь эритроцитов барана в 0,85 %-ном растворе хлористого натрия — для РСК и РДСК готовят из свежей или консервированной крови барана.

Кровь у барана берут с утра до кормления из яремной вены во флакон со стеклянными (керамическими) бусами и интенсивно перемешивают круговыми движениями флакона в процессе взятия и в течение 7—10 мин после и фильтруют через марлю.

Дефибринированную кровь консервируют стрептомицином из расчета 1 г препарата растворенного в 10—20 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия на 100 $см^3$ крови или раствором Альсевера из расчета 1,2 $см^3$ раствора на 1 $см^3$ крови. Консервированная кровь пригодна для использования в течение 10—14 сут при температуре хранения от 2 °С до 8 °С.

Для приготовления взвеси эритроцитов свежую дефибринированную или консервированную кровь барана вносят в центрифужные пробирки (стаканы), добавляют 0,85 %-ный раствор хлористого натрия в соотношении не менее чем 1:8, перемешивают и центрифугируют при 2500—3000 об./мин в течение соответственно 15—10 мин до полного обесцвечивания промывной жидкости, но не более четырех раз. После каждого центрифугирования надосадочную жидкость полностью собирают пипеткой при возможно более горизонтальном положении пробирки (стакана). После заключительного центрифугирования осадок эритроцитов перемешивают вручную активными круговыми движениями и используют для приготовления гемолитической системы.

7.5.1.5 Определение титра гемолитической сыворотки

Гемолитическую сыворотку титруют при использовании каждой новой серии один раз в три месяца до истечения срока годности.

Гемолитическую сыворотку титруют в разведении 1:500, 1:750, 1:1000, 1:1250, 1:1500, 1:1750, 1:2000 по схеме, приведенной в таблице 2. Готовят основное разведение гемолитической сыворотки 1:100 (0,1 $см^3$ гемолитической сыворотки и 9,9 $см^3$ 0,85 %-ный раствор хлористого натрия), из которого затем готовят последующие разведения. Схема представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Приготовление разведений гемолитической сыворотки

Основное разведение гемолитической сыворотки 1:100, $см^3$	0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	Полученное разведение гемолитической сыворотки
0,2	0,8	1:500
0,2	1,3	1:750
0,2	1,8	1:1000
0,2	2,3	1:1250
0,2	2,8	1:1500
0,2	3,3	1:1750
0,2	3,8	1:2000

Затем по 0,2 $см^3$ каждого разведения переносят в серологические пробирки Флоринского с указанием разведений, начиная с наибольшего разведения (1:2000) (см. таблицу 2), затем в каждую пробир-

ку добавляют по 0,2 см^3 комплемента в разведении 1:20, 0,4 см^3 0,85 %-ный раствор хлористого натрия и 0,2 см^3 2,5 %-ной взвеси эритроцитов.

Одновременно в этот же штатив ставят три пробирки для контроля:

- в первую вносят 0,2 см^3 гемолитической сыворотки в разведении 1:100, добавляют 0,6 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия и 0,2 см^3 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана;
- во вторую вносят 0,2 см^3 комплемента в разведении 1:20, добавляют 0,6 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия и 0,2 см^3 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана;
- в третью вносят 0,2 см^3 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана, добавляют 0,8 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия.

В первой контрольной пробирке определяют гемолитические свойства сыворотки, во второй — гемолитические свойства комплемента, в третьей —резистентность эритроцитов барана (см. таблицу 2).

Таблица 2 — Схема титрования гемолитической сыворотки

Компоненты	Дозы компонентов при разведении гемолитической сыворотки, см^3								Номера контрольных пробирок		
	1:100	1:500	1:750	1:1000	1:1250	1:1500	1:1750	1:2000	1	2	3
Гемолитическая сыворотка	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—
Комплемент 1:20	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	0,2	—
0,85 %-ный раствор хлористого натрия	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,8
Эритроциты барана (2,5 %-ная взвесь)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 10 мин при 37 °С—38 °С											
Примерный результат	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЗГ	ЗГ	ЗГ

Примечание — В настоящей таблице применены следующие сокращения: ПГ — полный гемолиз; ЧГ — частичный гемолиз; ЗГ — задержка гемолиза.

Штатив интенсивно встряхивают и переносят в водяную баню на 10 мин при температуре 37 °С—38 °С. Штатив с пробирками извлекают из бани и немедленно проводят учет результатов реакций.

Титром гемолитической сыворотки считают наименьшее ее количество, необходимое для полного гемолиза в течение 10 мин 0,2 см^3 взвеси эритроцитов в присутствии 0,2 см^3 комплемента, разведенного 1:20. В таблице 2 титр гемолитической сыворотки равен 1:1500.

Рабочий титр гемолитической сыворотки для РСК и РДСК составляет удвоенную дозу от ее титра. Так, если титр гемолитической сыворотки равен 1:1500, то рабочий титр в РСК и РДСК будет 1:750.

Сыворотку считают активной при титре не менее 1:1000 и при отсутствии гемолиза эритроцитов в контрольных пробирках.

7.5.1.6 Приготовление гемолитической системы

Гемолитическую систему готовят перед каждой постановкой реакции.

Для приготовления гемолитической системы смешивают в равных объемах 2,5 %-ную взвесь эритроцитов барана из свежей или консервированной крови в 0,85 %-ном растворе хлористого натрия и рабочее разведение гемолитической сыворотки в удвоенном титре.

Пример — Для приготовления 200 см^3 гемолитической системы необходимо 100 см^3 2,5 %-ной взвеси эритроцитов барана (к 2,5 см^3 осадка отмытых эритроцитов добавляют 97,5 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия) и 100 см^3 раствора гемолитической сыворотки в удвоенном титре (например, при титр 1:1000 берут 1:500, т. е. для приготовления 100 см^3 рабочего разведения гемолитической сыворотки берут 0,2 см^3 гемолитической сыворотки из ампулы и разводят в 99,8 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия). Полученные 100 см^3 рабочего раствора гемолитической сыворотки добавляют при постоянном помешивании к 100 см^3 2,5 %-ной взвеси эритроцитов.

Для постановки РСК гемолитическую систему выдерживают в водяной бане при температуре 37 °С—38 °С в течение 15—35 мин (в зависимости от объема и толщины стенок сосуда) при периодическом перемешивании и после остывания до комнатной температуры используют для титрования активности комплемента и постановки главного опыта.

Для постановки РДСК гемолитическую систему выдерживают в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 16—18 ч (с главным опытом).

7.5.1.7 Разведение и инактивирование сывороток

Контрольные сыворотки (бруцеллезную и негативную сухие) восстанавливают 0,85 %-ным раствором хлористого натрия до объема, указанного на флаконе.

Испытуемые и контрольные сыворотки исследуют в трех пробирках в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (контроль на антикомплементарность сыворотки). В первую вносят 0,1 $см^3$ исследуемой сыворотки, добавляют 0,4 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия (разведение сыворотки крови 1:5) и смешивают. Из первой пробирки переносят 0,2 $см^3$ во вторую пробирку и 0,1 $см^3$ — в третью. В третью пробирку добавляют 0,1 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия (разведение 1:10).

При проведении массовых серологических исследований допускается постановка реакции в одной пробирке в разведении сыворотки 1:5 с антигеном. Для этого к 0,05 $см^3$ исследуемой сыворотки добавляют 0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия.

Для контроля реакции сыворотки бруцеллезную и негативную разводят 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена.

При необходимости определения титра исследуемой сыворотки, разведения готовят следующим образом: в пробирку первого ряда (разведение 1:5) вносят по 0,8 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия и 0,2 $см^3$ исследуемой сыворотки и пипетируют (не менее трех раз). В пробирки четвертого, пятого, шестого и седьмого рядов и т д. вносят по 0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия. Из пробирки первого ряда переносят по 0,2 $см^3$ разведенной сыворотки в пробирки второго, третьего и четвертого рядов. В пробирке четвертого ряда сыворотку пипетируют и переносят 0,2 $см^3$ в пробирку пятого ряда, пипетируют и переносят 0,2 $см^3$ в пробирку шестого ряда, пипетируют и переносят 0,2 $см^3$ в пробирку седьмого ряда. Из пробирки седьмого ряда удаляют 0,2 $см^3$ разведенной сыворотки. В итоге, разведение сыворотки в пробирках второго и третьего рядов составляет 1:5, четвертого ряда — 1:10, пятого ряда — 1:20, шестого ряда — 1:40, седьмого ряда — 1:80.

Разведенные испытуемые и контрольные (бруцеллезная и негативная) сыворотки инактивируют в водяной бане в день постановки реакции: для РСК — при температуре 60 °С—62 °С в течение 30 мин (сыворотки крови ослов и мулов при температуре 64 °С—65 °С, буйволов при 62 °С—64 °С, свиней при 58 °С—60 °С); для РДСК — сыворотки крови животных всех видов — при температуре 63 °С—64 °С в течение 30 мин.

7.5.1.8 Приготовление рабочего разведения антигена для РСК (РДСК)

Антиген перед применением тщательно встряхивают и готовят рабочее разведение (титр) на 0,85 %-ном растворе хлористого натрия, указанное на флаконе организацией производителем.

7.5.1.9 Титрование комплемента для РСК

Для постановки РСК берут такое количество ампул (флаконов) комплемента, в которых содержится необходимое для проведения всего опыта. В каждую ампулу (флакон) вносят 0,85 %-ный раствор хлористого натрия по 2 $см^3$ и, не встряхивая, помещают в холодильник на 20—30 мин. Растворившийся комплемент сливают в одну емкость и осторожно перемешивают, не встряхивая, получая таким образом основной раствор комплемента, который хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С до постановки реакции. Непосредственно перед внесением в пробирки для титрования комплемент разводят 0,85 %-ным раствором хлористого натрия, а остальной хранят в холодильнике для постановки главного опыта. Рабочее разведение комплемента готовят непосредственно перед внесением в пробирки главного опыта.

Перед каждой постановкой главного опыта РСК проводят титрование комплемента в гемолитической или бактериолитической системе.

Для РДСК комплемент титруют в гемолитической системе.

7.5.1.10 Титрование комплемента в гемолитической системе

Титрование комплемента в гемолитической системе проводят по схеме, приведенной в таблице 3.

Предварительно комплемент разводят 1:20 0,85 %-ным раствором хлористого натрия (к 0,1 $см^3$ комплемента добавляют 1,9 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия).

Таблица 3 — Схема титрования комплемента в гемолитической системе

Компоненты	Номера пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Доза комплемента в разведении 1:20, $см^3$	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	0,58	0,56	0,54	0,52	0,5	0,48	0,46	0,44	0,42	0,4
Гемолитическая система, $см^3$	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 10 мин при 37 °С—38 °С										
Примерный результат	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
Примечание — В настоящей таблице применены следующие сокращения: ЗГ — задержка гемолиза; ЧГ — частичный гемолиз; ПГ — полный гемолиз.										

Допускается титрование комплемента в гемолитической системе с разведением комплемента в десятикратных объемах в дополнительном ряде пробирок (см. таблицу 4).

Из дополнительного ряда комплемент переносят по 0,2 $см^3$ в основной ряд для титрации. Из первой пробирки этого ряда переносят по 0,2 $см^3$ комплемента в первые пробирки основного ряда, из второй пробирки соответственно во вторые пробирки и т. д. Во все пробирки основного ряда вносят по 0,4 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия и 0,4 $см^3$ гемолитической системы. Встряхивают и выдерживают в водяной бане 10 мин при температуре 37 °С—38 °С.

Учет результатов титрования проводят немедленно после выемки штатива из водяной бани.

Титром комплемента в гемолитической системе считают его наименьшее количество, вызывающее полный гемолиз эритроцитов в течение 10 мин в водяной бане при температуре 37 °С—38 °С.

Рабочий титр комплемента для главного опыта РСК берут на 0,04 больше.

В примере титр комплемента в гемолитической системе 0,08, рабочий титр комплемента 0,12.

7.5.1.11 Титрование комплемента в бактериолитической системе

Титрование комплемента в бактериолитической системе проводят на сыворотке из опыта, т. е. того вида животных, которых исследуют. Если в пробирках с сывороткой и антигеном отмечают задержку гемолиза по сравнению с той же сывороткой без антигена, это означает, что для титрования была взята положительная сыворотка, определение титра комплемента проводят по ряду пробирок без антигена.

Сыворотку разводят 1:5 (к 1 $см^3$ сыворотки добавляют 4 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия), вносят по 0,2 $см^3$ в два ряда по 10 пробирок и инактивируют, как указано в 7.5.1.7.

Готовят необходимые разведения комплемента в десятикратных объемах в отдельных пробирках дополнительного ряда. В пробирки вносят комплемент, предварительно разведенный 1:20 (к 1,0 $см^3$ комплемента добавляют 19,0 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия), в дозах от 0,2; 0,4; 0,6 $см^3$ и т. д. до 2 $см^3$ и добавляют в каждую пробирку недостающее до 2 $см^3$ количество 0,85 %-ного раствора хлористого натрия, т. е. соответственно 1,8; 1,6; 1,4 $см^3$ и т. д. (см. таблицу 4).

Затем в пробирки первого и второго рядов с инактивированной сывороткой переносят комплемент из дополнительного ряда по 0,2 $см^3$. Из первой пробирки этого ряда переносят по 0,2 $см^3$ комплемента в первые пробирки с сывороткой, взятой для титрования, из второй пробирки — соответственно во вторые пробирки с сывороткой и т. д.

Таблица 4 — Дополнительный ряд пробирок для разведения комплемента

Компоненты	Номера пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент в разведении 1:20, $см^3$	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	—
Доза комплемента	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2

После внесения комплемента в первый ряд пробирок с сывороткой вносят по 0,2 см^3 антигена в рабочем разведении, а во второй ряд — по 0,2 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия, смешивают путем встряхивания штатива и помещают в водяную баню при 37 °С—38 °С на 20 мин. Затем во все пробирки добавляют по 0,4 см^3 гемолитической системы, смешивают путем встряхивания и вновь помещают в водяную баню при температуре 37 °С—38 °С на 20 мин (см. таблицу 5).

Таблица 5 — Схема титрования комплемента в бактериолитической системе

Компоненты реакции	Ряды пробирок в штативе	Номера пробирок									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Сыворотка из опыта в разведении 1:5, см^3	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 30 мин при температуре 58 °С — 65 °С											
Антиген в рабочем разведении, см^3	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, см^3	Первый	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент из дополнительного ряда, см^3	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 мин при температуре 37 °С—38 °С											
Гемолитическая система, см^3	Первый	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	Второй	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 20 мин при температуре 37 °С—38 °С											
Примерный результат	Первый	ЗГ	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
	Второй	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
Доза комплемента		0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2

Примечание — В настоящей таблице применены следующие сокращения: ЗГ — задержка гемолиза, ЧГ — частичный гемолиз, ПГ — полный гемолиз.

Учет результатов титрования проводят немедленно после выемки штатива из водяной бани. Титром комплемента в бактериолитической системе считают его минимальное количество, вызывающее полный гемолиз эритроцитов в обоих рядах пробирок с сывороткой из опыта, или в безантигенном ряду, если сыворотка оказалась позитивной.

В таблице 5 титр комплемента в бактериолитической системе равен 0,1. Рабочий титр комплемента для главного опыта на 0,02 больше, т. е. 0,12.

Допускается проводить титрование комплемента путем непосредственного внесения микропипеткой в пробирки каждого ряда с инактивированной сывороткой комплемента. Для этого комплемент предварительно разводят 1:20 (к 0,2 см^3 комплемента добавляют 3,8 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия) и в возрастающих дозах от 0,02 до 0,2 см^3 с интервалом 0,02 см^3 добавляют в каждую пробирку недостающие до 0,2 см^3 количества 0,85 %-ного раствора хлористого натрия, т. е. соответственно от 0,18; 0,16; 0,14 см^3 до 0,02 см^3.

7.5.1.12 Определение рабочего разведения комплемента для главного опыта РСК

После определения рабочего титра, готовят рабочее разведение комплемента для постановки главного опыта РСК.

Количество комплемента для главного опыта X, см^3, определяют по формуле

$$X = \frac{A \cdot B}{20}, \quad (1)$$

где A — рабочий титр комплемента см^3;

B — количество пробирок в опыте шт.;

20 — исходное разведение комплемента (1:20).

Пример — $X = \frac{0,12 \times 100}{20} = 0,6.$

Так как количество комплемента в рабочем разведении, требующемся для всей реакции (на 100 пробирок), равно 20 см^3 (0,2 · 100), то к 0,6 см^3 регидратированного комплемента добавляют 19,4 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия.

7.5.1.13 Определение рабочего разведения комплемента для главного опыта и титрации гемолитической системы для РДСК

Комплемент применяют в рабочем разведении 1:25 или 1:20 при титре 0,06—0,1 или 1:20—1:15 при титре 0,1—0,14.

Если титр комплемента неизвестен, определяют его рабочее разведение по следующей схеме (см. таблицу 6).

Таблица 6 — Схема определения рабочего разведения комплемента для РДСК

Компоненты		Номера пробирок и разведения комплемента									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80	1:90	1:100
Приготовление разведений комплемента											
Дополнительный ряд	Комплемент в разведении 1:10, см^3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	0,85 %-ный раствор хлористого натрия, см^3	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Титрование комплемента											
Комплемент из дополнительного ряда, см^3		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, см^3		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Гемолитическая система, см^3		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 10 мин при температуре 37 °С—38 °С											
Примерный результат		ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЗГ

Примечание — В данной таблице применены следующие сокращения: ЗГ — задержка гемолиза; ЧГ — частичный гемолиз; ПГ — полный гемолиз.

Предварительно комплемент разводят 1:10 (к 0,2 см^3 комплемента добавляют 1,8 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия).

По таблице 6 видно, что полный гемолиз получен при разведении комплемента 1:40, его рабочее разведение в 2 раза меньше, т. е. 1:20.

В главном опыте 100 пробирок + 20 пробирок для титрации гемолитической системы = 120 пробирок 0,2 см^3 = 24 см^3 необходимое количество разведенного комплемента. 24/20 = 1,2, следовательно, к 1,2 см^3 основного разведения комплемента необходимо добавить 22,8 см^3 0,85 %-ного раствора хлористого натрия.

7.5.1.14 Титрование гемолитической системы для главного опыта РДСК

Схема титрования гемолитической системы приведена в таблице 7.

Титрование гемолитической системы проводят для определения рабочей дозы гемолитической системы для постановки главного опыта.

При постановке РДСК одновременно с разведением сывороток для главного опыта разводят сыворотки для титрования гемолитической системы.

Титрование проводят на сыворотке из опыта, т. е. того вида животных, которых исследуют. Сыворотку разводят 1:5 (к 1 $см^3$ сыворотки добавляют 4 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия), вносят по 0,2 $см^3$ в два ряда по 10 пробирок и инактивируют при температуре 63 °С—64 °С в течение 30 мин.

Рабочее разведение антигена готовят по 7.5.1.8, комплемента по 7.5.1.13.

Гемолитическую систему готовят по 7.5.1.6.

После инактивирования в пробирки с разведенными сыворотками вносят антиген, 0,85 %-ный раствор хлористого натрия и комплемент.

В первый ряд пробирок вносят по 0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия, во второй ряд по 0,2 $см^3$ антигена в рабочем разведении. В оба ряда вносят по 0,2 $см^3$ комплемента в рабочем разведении.

Компоненты смешивают путем встряхивания и помещают в холодильник на 16—18 ч при температуре 2 °С—6 °С.

Через 16—18 ч штативы с пробирками и гемолитическую систему извлекают из холодильника, выдерживают при комнатной температуре 20—30 мин.

Для определения титра в пробирки вносят гемолитическую систему в дозах от 0,1; 0,2; 0,3 $см^3$ и т. д. до 1 $см^3$, компоненты смешивают путем встряхивания и помещают в водяную баню на 20 мин при температуре 37 °С—38 °С.

Таблица 7 — Схема титрования гемолитической системы для главного опыта РДСК

Компоненты реакции	Ряды пробирок в штативе	Номера пробирок									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Сыворотка в разведении 1:5, $см^3$	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 30 мин при температуре 63 °С—64 °С											
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Антиген в рабочем разведение, $см^3$	Первый	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент в рабочем разведение, $см^3$	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Холодильник 16—18 ч при температуре 2 °С—6 °С											
Гемолитическая система, $см^3$	Первый	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
	Второй	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Водяная баня 20 мин при температуре 37 °С—38 °С											
Примерный результат	Первый	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЗГ	ЗГ
	Второй	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЗГ	ЗГ
Примечание — В настоящей таблице применены следующие сокращения: ЗГ — задержка гемолиза; ЧГ — частичный гемолиз; ПГ — полный гемолиз.											

Учет результатов титрования проводят сразу после выемки штатива из водяной бани.

Титром гемолитической системы считают наибольшее ее количество, в котором произошел полный гемолиз в обоих рядах пробирок с сывороткой из опыта или в безантигенном ряду, если сыворотка оказалась позитивной. Рабочая доза на один интервал ниже (например, при титре гемолитической системы 0,7 $см^3$ рабочая доза — 0,6 $см^3$).

7.5.1.15 Контроль рабочего разведения компонентов для постановки РСК (РДСК)

Рабочие разведения всех компонентов для РСК (РДСК) готовят перед постановкой реакции. При необходимости проверяют их на антикомплементарные и гемотоксические свойства по следующей схеме, представленной в таблице 8.

Таблица 8 — Проверка антикомплементарных и гемотоксических свойств компонентов реакций

Наименование и объем компонентов реакции, $см^3$	Антикомплементарность	Гемотоксичность			
		комплемента	гемолитической сыворотки	антигена	0,85 %-ного раствора хлористого натрия
Комплемент в разведении 1:20	0,2	0,2	—	—	—
Гемолитическая сыворотка в рабочем разведении	0,2	—	0,2	—	—
Антиген в рабочем разведении	0,4	—	—	0,4	—
Эритроциты 2,5 %-ная взвесь	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,85 %-ный раствор хлористого натрия	—	0,6	0,6	0,4	0,8
Водяная баня 10 мин при 37 °С—38 °С					
Результат	Гемолиз	Полная задержка гемолиза эритроцитов			

В реакциях используют компоненты, не обладающие антикомплементарными и гемотоксическими свойствами.

7.5.2 Постановка главного опыта РСК

Реакцию проводят в серологических пробирках Флоринского в объеме 1 $см^3$ по 0,2 $см^3$ каждого компонента.

Схема постановки главного опыта РСК приведена в таблице 9.

Гемолитическую систему готовят по 7.5.1.6.

Сыворотки разводят и инактивируют по 7.5.1.7

Рабочее разведение антигена готовят по 7.5.1.8.

Титруют комплемент по 7.5.1.10 или 7.5.1.11.

Рабочее разведение комплемента готовят по 7.5.1.12.

После инактивирования разведенных сывороток в пробирки вносят антиген в рабочем разведении, 0,85 %-ный раствор хлористого натрия, комплемент в рабочем разведении.

При постановке РСК в одной пробирке во все пробирки вносят по 0,2 $см^3$ антигена в рабочем разведении и комплемента. При постановке РСК в трех пробирках в пробирки первого ряда вносят по 0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия; в пробирки второго и третьего рядов — по 0,2 $см^3$ антигена в рабочем разведении, во все пробирки — по 0,2 $см^3$ комплемента в рабочем разведении.

При определении титра сыворотки в пробирки первого ряда не вносят компоненты реакции, они служат для исходного разведения сыворотки. В пробирки второго ряда вносят по 0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия (контроль антикомплементарных свойств сыворотки), в пробирки с третьего по седьмой ряды вносят антиген в рабочем разведении. В пробирки со второго по седьмой ряды вносят комплемент в рабочем разведении по 0,2 $см^3$.

Допускается смешивание равных объемов рабочих разведений антигена и комплемента непосредственно перед внесением в пробирки.

Затем в каждую пробирку вносят по 0,4 $см^3$ гемолитической системы, смешивают путем встряхивания штатива и помещают в водяную баню на 20 мин при температуре 37 °С— 38 °С.

Таблица 9 — Схема постановки главного опыта РСК

Компоненты реакции	При массовом исследовании	При исследовании в трех разведениях		
	пробирки с исследуемыми сыворотками (разведение)	пробирки для каждой исследуемой сыворотки (разведение)		
	1 (1:5)	1 (1:5)	2 (1:5)	3 (1:10)
Исследуемые сыворотки, $см^3$	0,05	0,1	0,2	0,1
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	0,2	0,4	—	0,1

Окончание таблицы 9

Компоненты реакции	При массовом исследовании	При исследовании в трех разведениях		
	пробирки с исследуемыми сыворотками (разведение)	пробирки для каждой исследуемой сыворотки (разведение)		
	1 (1:5)	1 (1:5)	2 (1:5)	3 (1:10)
Водяная баня 30 мин при 58 °С—65 °С				
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	—	0,2	—	—
Антиген в рабочем разведении, $см^3$	0,2	—	0,2	0,2
Комплемент в рабочем разведении, $см^3$	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 мин при 37 °С—38 °С				
Гемолитическая система, $см^3$	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 20 мин при 37 °С—38 °С				

Сыворотку, 0,85 %-ный раствор хлористого натрия и другие компоненты реакции вносят при помощи дозатора одноканального со сменным наконечником или группового дозатора Флоринского.

Главный опыт сопровождается следующими контролями:

- негативной и бруцеллезной сыворотками в разведении 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (по схеме главного опыта);
- гемолитической системы (0,4 $см^3$ гемолитической системы; 0,6 $см^3$ 0,85 %-ный раствор хлористого натрия) — задержка гемолиза;
- антигена на антикомплементарность (0,2 $см^3$ комплемента в рабочем разведении; 0,4 $см^3$ антигена в рабочем разведении; 0,4 $см^3$ гемолитической системы) — полный гемолиз;
- антигена на гемотоксичность (0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия; 0,4 $см^3$ антигена в рабочем разведении; 0,4 $см^3$ гемолитической системы) — задержка гемолиза.

7.5.3 Постановка главного опыта РДСК

Реакцию длительного связывания комплемента на холоде проводят в серологических пробирках Флоринского. Сыворотку, антиген и комплемент вносят по 0,2 $см^3$, гемолитическую систему — в оттитрованной рабочей дозе.

Постановку реакции проводят в трех пробирках. Сыворотки исследуют в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (контроль на антикомплементарность сывороток).

При массовом исследовании допускается постановка реакции в одной пробирке с сывороткой в разведении 1:5 и антигеном.

РДСК ставят в следующей последовательности:

- первый день:
  - разведение испытуемых и контрольных сывороток для главного опыта и титрования гемолитической системы,
  - разведение испытуемых и контрольных сывороток для главного опыта и титрования гемолитической системы,
  - инактивирование сывороток по 7.5.1.7,
  - контроль компонентов реакции на антикомплементарность и гемотоксичность по 7.5.1.15,
  - приготовление рабочего разведения антигена по 7.5.1.8 и комплемента по 7.5.1.13,
  - внесение антигена, 0,85 %-ного раствора хлористого натрия и комплемента в пробирки с главным опытом и титрования гемолитической системы,
  - приготовление гемолитической системы по 7.5.1.6,
  - выдерживание пробирок главного опыта, титрования гемолитической системы и гемолитической системы в холодильнике при температуре 2 °С—6 °С в течение 16—18 ч;
- второй день:
  - выдерживание пробирок главного опыта, титрования гемолитической системы и гемолитической системы в холодильнике при температуре 2 °С—6 °С в течение 20—30 мин,

- внесение гемолитической системы в пробирки для титрования гемолитической системы. Определение рабочей дозы гемолитической системы для главного опыта,

- главный опыт. Внесение гемолитической системы в рабочей дозе в пробирки с исследуемыми сыворотками,

- учет и оценка результатов реакции.

Схема постановки главного опыта РДСК приведена в таблице 10.

Таблица 10 — Схема постановки главного опыта РДСК

Компоненты реакции	При массовом исследовании	При исследовании в трех пробирках		
	пробирки с исследуемыми сыворотками (разведение)	пробирки для каждой исследуемой сыворотки (разведение)		
	1 (1:5)	1 (1:5)	2 (1:5)	3 (1:10)
Исследуемые сыворотки, $см^3$	0,05	0,1	0,2	0,1
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	0,2	0,4	—	0,1
Водяная баня 30 мин при 63 °С—64 °С				
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	—	0,2	—	—
Антиген в рабочем разведении, $см^3$	0,2	—	0,2	0,2
Комплемент в рабочем разведении, $см^3$	0,2	0,2	0,2	0,2
Холодильник 16—18 ч при 2 °С—6 °С и 20 мин при комнатной температуре				
Гемолитическая система в рабочей дозе, $см^3$	0,6	0,6	0,6	0,6
Водяная баня 20 мин при 37 °С—38 °С				

Гемолитическую систему готовят по 7.5.1.6.

Сыворотки разводят и инактивируют по 7.5.1.7.

Рабочее разведение антигена готовят по 7.5.1.8.

Рабочее разведение комплемента готовят по 7.5.1.13.

После инактивирования в пробирки с разведенными сыворотками вносят антиген в рабочем разведении, 0,85 %-ный раствор хлористого натрия, комплемент в рабочем разведении.

При постановке РДСК в трех пробирках в пробирки первого ряда вносят по 0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия; в пробирки второго и третьего рядов — по 0,2 $см^3$ антигена в рабочем разведении, во все пробирки — по 0,2 $см^3$ комплемента в рабочем разведении.

При постановке РДСК в одной пробирке в каждую из них вносят по 0,2 $см^3$ антигена и комплемента в рабочих разведениях.

При определении титра сыворотки в пробирки первого ряда не вносят компоненты реакции, они служат для исходного разведения сыворотки. В пробирки второго ряда вносят по 0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия (контроль антикомплементарных свойств сыворотки), в пробирки с третьего по седьмой ряды вносят антиген в рабочем разведении. В пробирки со второго по седьмой ряды вносят комплемент в рабочем разведении по 0,2 $см^3$.

Допускается смешивание равных объемов рабочих разведений антигена и комплемента непосредственно перед внесением в пробирки.

Компоненты смешивают путем встряхивания и помещают в холодильник на 16—18 ч при температуре 2 °С—8 °С.

Через 16—18 ч штативы с пробирками и гемолитическую систему извлекают из холодильника, выдерживают при комнатной температуре 20—30 мин и определяют рабочую дозу гемолитической системы для главного опыта по 7.5.1.14. Во все пробирки с главным опытом вносят гемолитическую систему в рабочей дозе. Компоненты реакции смешивают путем встряхивания и помещают в водяную баню на 20 мин при температуре 37 °С—38 °С.

При постановке реакции ставят контроли:

- негативной и бруцеллезной сыворотки в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (по схеме главного опыта);
- антигена на антикомплементарность (0,2 $см^3$ комплемента в рабочем разведении; 0,4 $см^3$ антигена в рабочем разведении; гемолитическая система в рабочей дозе) — полный гемолиз;
- антигена на гемотоксичность (0,2 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия; 0,4 $см^3$ антигена в рабочем разведении; гемолитическая система в рабочей дозе) — задержка гемолиза;
- гемолитической системы (0,6 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия; гемолитическая система в рабочей дозе) — задержка гемолиза.

7.5.4 Обработка результатов РСК и РДСК

Результаты опыта считаются достоверными и подлежат учету, если в пробирках с контролями главного опыта:

- бруцеллезная сыворотка без антигена в разведении 1:5 — полный гемолиз;
- с антигеном в разведениях 1:5— 1:10 — задержка гемолиза;
- негативная сыворотка: без антигена в разведение 1:5 — полный гемолиз;
- с антигеном в разведение 1:5—1:10 — полный гемолиз;
- комплемента на антикомплементарность — полный гемолиз;
- антигена на гемотоксичность — задержка гемолиза;
- гемолитическая система — задержка гемолиза.

Если контроли главного опыта не соответствуют полученным данным, результаты РСК (РДСК) считают недостоверными и реакцию повторяют.

Реакцию связывания комплемента и реакцию длительного связывания комплемента учитывают визуально. При постановке реакции в одной пробирке (при массовом исследовании) учет проводят через 40—60 мин после извлечения штативов из водяной бани. При исследовании в трех или шести пробирках — через 3—4 ч после осаждения на дно пробирки эритроцитов в контрольных пробах с бруцеллезной сывороткой, или на следующий день (в этом случае штативы с пробирками оставляют в холодильнике).

Результаты реакции оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ (четыре креста) — отсутствие гемолиза, надосадочная жидкость прозрачная и бесцветная, осадок 100 % эритроцитов на дне пробирки;

+++ (три креста) — гемолиз 25 % эритроцитов, осадок 75 % эритроцитов;

++ (два креста) — гемолиз 50 % эритроцитов, осадок 50 % эритроцитов;

+ (один крест) — гемолиз 75 % эритроцитов, осадок 25 % эритроцитов;

– (минус) — гемолиз 100 % эритроцитов, осадок эритроцитов отсутствует, жидкость интенсивно окрашена гемоглобином.

Степень гемолиза эритроцитов при необходимости определяют по шкале, которую готовят перед учетом реакции. Для этого из штатива выбирают пять пробирок с полным гемолизом, сливают их содержимое в одну и разводят по схеме, представленной в таблице 11.

Таблица 11— Шкала контроля гемолиза эритроцитов в РСК и РДСК

Наименование компонентов	Номера пробирок				
	1	2	3	4	5
Гемолизированная жидкость, $см^3$	1,0	0,75	0,5	0,25	—
0,85 %-ный раствор хлористого натрия, $см^3$	—	0,25	0,5	0,75	1,0
Гемолиз, %	100	75	50	25	—
Оценка в крестах	—	+	++	+++	++++

Процент гемолиза эритроцитов в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют путем сравнения со шкалой.

Реакцию считают положительной (см. таблицу 12):

- при задержке гемолиза в разведении сыворотки 1:5 и оценке ++ и выше при полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена) в благополучных и неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного мелкого рогатого скота, оленей, собак, пушных зверей и животных

других видов, а также у невакцинированного и вакцинированного крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота, лошадей, верблюдов, свиней, оленей в хозяйствах, имеющих статус «неблагополучное по бруцеллезу»;

- при задержке гемолиза в разведении сыворотки 1:10 с оценкой ++ и выше при полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена) у невакцинированного крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, свиней и вакцинированных оленей в хозяйствах, имеющих статус «благополучное по бруцеллезу»;

- при задержке гемолиза в разведении сыворотки 1:20 с оценкой ++ и выше при полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена) у вакцинированного крупного рогатого скота и мелкого рогатого скота в хозяйствах, имеющих статус «благополучное по бруцеллезу».

Реакцию считают сомнительной (см. таблицу 12):

- при задержке гемолиза в разведении сыворотки 1:5 с оценкой + при полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена) в благополучных и неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированного мелкого рогатого скота, оленей, собак, пушных зверей и животных других видов, а также у невакцинированного и вакцинированного крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, свиней и оленей в хозяйствах, имеющих статус «неблагополучное по бруцеллезу»;

- при задержке гемолиза в разведении сыворотки не выше 1:10 с оценкой + и полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена) у невакцинированного крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, свиней и вакцинированных оленей в хозяйствах, имеющих статус «благополучное по бруцеллезу»;

- при задержке гемолиза в разведении сыворотки не выше 1:20 с оценкой + при полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена) у вакцинированного крупного рогатого скота и мелкого рогатого скота в хозяйствах, имеющих статус «благополучное по бруцеллезу».

Реакцию считают отрицательной при полном гемолизе эритроцитов в одной (трех) пробирках.

При получении сомнительного результата в благополучных по бруцеллезу хозяйствах пробу исследуют дополнительно или повторно, как указано в таблице 12.

В благополучных по бруцеллезу хозяйствах при сохранении или снижении титра при повторном исследовании в РСК (РДСК) животных считают здоровыми. При повышении титра антител в РСК (РДСК) или положительных результатах в других серологических реакциях (см. таблицу 12), животных считают больными.

В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах, животных, исследованных с сомнительным результатом, считают больными.

Результат исследования считается неопределенным и не нормируется:

- при задержке гемолиза с оценкой от + до ++++ в разведении сыворотки 1:5 без антигена и в одной (1:5) или двух (1:5—1:10) пробирках с антигеном (самозадержка);

- при самозадержке в РСК пробу в этот или на следующий день исследуют в РДСК в трех пробирках;

- при самозадержке в РДСК пробу исследуют повторно через 25—30 дней в РСК (РДСК) и других серологических реакциях, подтверждающих диагноз, как указано в таблице 12. При повторном получении самозадержки в РСК (РДСК) диагностическую оценку пробы проводят по другим реакциям.

7.6 Реакция иммунодиффузии (РИД) с ОПС-антигеном

Сущность метода состоит в выявлении бруцеллезных антител, основанном на способности сывороточных антител и специфического антигена диффундировать в геле агара и при взаимодействии образовывать нерастворимый комплекс антиген — антитело, наблюдаемый в виде линии преципитации.

7.6.1 Приготовление 0,8 %-ного агара и подготовка чашек Петри

Взвешивают 8,5 г хлористого натрия и 0,8 г агара, смесь переносят в стеклянную колбу вместимостью 250 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды. Смесь кипятят на водяной бане до полного расплавления агара.

В чашки Петри, помещенные на горизонтальную поверхность, вносят по 16—20 $см^3$ расплавленного агара для получения слоя агара толщиной более 2 мм. После застывания агара чашки Петри накрывают крышками и помещают в холодильник при температуре от 2 °С до 8 °С, хранят не более 14 сут.

В геле агара в чашке Петри делают отверстия (лунки) с использованием штампа-пробойника, не допуская отслоения геля от дна чашки. В каждой чашке Петри прорезают не менее шести розеток, каждая из которых состоит из семи лунок: одна лунка в центре диаметром 3 мм, остальные шесть лунок

диаметром 5 мм по окружности, расстояние между центральной и периферийными лунками — 3 мм. Образовавшиеся диски геля удаляют из лунок канюлей, соединенной с вакуумным или водоструйным насосом (или любым другим способом).

7.6.2 Проведение исследования

7.6.2.1 Сыворотку крови крупного, мелкого рогатого скота и северных оленей исследуют в РИД с ОПС-антигеном с целью дифференциации инфицированных животных от вакцинированных и для дифференциации неспецифических реакций, обусловленных бактериями, имеющими антигенное сходство с бруцеллами.

7.6.2.2 Реакцию ставят в двух вариантах.

Вариант 1: в центральную лунку вносят 0,02 см^3 ОПС-антигена, а в периферические — по 0,04 см^3 исследуемых сывороток крови (лунки 1—5) и 0,04 см^3 СБП (см. рисунок 1).

Вариант 2: для повышения достоверности и чувствительности РИД проводят по схеме, позволяющей оценить слияние полос преципитации, образуемых исследуемыми сыворотками крови животных с контрольными полосами преципитации, образуемыми СБП и ОПС-антигеном (см. рисунок 2).

В центральную лунку каждой розетки вносят 0,02 см^3 ОПС-антигена. В две противоположные периферийные лунки каждой розетки вносят по 0,04 см^3 СБП, а в оставшиеся четыре периферийные лунки розетки вносят по 0,04 см^3 исследуемых сывороток (лунки 1—4).

7.6.2.3 С целью уточнения полученного результата проводят повторное исследование проб сыворотки. При этом в две рядом расположенные лунки вносят СБП и испытуемую сыворотку по 0,04 см^3, а лунки справа и слева от них оставляют пустыми. В центральную лунку вносят 0,02 см^3 ОПС-антигена.

После внесения компонентов чашки Петри накрывают крышками и выдерживают при температуре от 18 °С до 25 °С.

7.6.3 Обработка результатов

7.6.3.1 Учет результатов проводят визуально с использованием осветителя в косом проходящем свете через 24 и 48 ч после постановки реакции.

Линии преципитации между лунками с ОПС-антигеном и СБП (контрольные линии преципитации) должны формироваться через 24 ч, что свидетельствует о правильности постановки реакции и активности СБП (лунка с СБП — см. рисунок 1; лунки с СБП — см. рисунок 2).

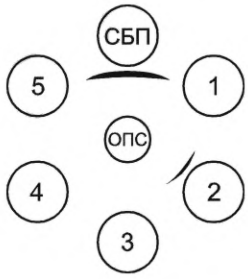

Рисунок 1 — Схема постановки и учета результатов реакции (вариант 1)

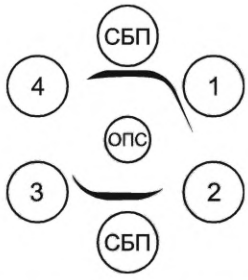

Рисунок 2 — Схема постановки и учета результатов реакции (вариант 2)

Линии преципитации, сформировавшиеся между лунками с ОПС-антигеном и испытуемыми сыворотками через 24—48 ч, свидетельствуют о положительной реакции (лунка 2 — см. рисунок 1; лунка 1 — см. рисунок 2).

Реакция считается положительной, если между лункой с испытуемой сывороткой и лункой с ОПС-антигеном образуется полоса преципитации, которая соединяется с контрольной линией преципи-

тации (лунка 1 — см. рисунок 2), или контрольная линия преципитации образует изгиб, формирующий начало линии преципитации испытуемой сыворотки с ОПС-антигеном (лунка 3 — см. рисунок 2).

Реакция считается отрицательной, если между лункой с испытуемой сывороткой и лункой с ОПС-антигеном полоса преципитации не образуется (лунки 1, 3, 4, 5 — см. рисунок 1; лунки 2, 4 — см. рисунок 2).

При получении положительного результата в реакции иммунодиффузии животное считают больным бруцеллезом.

7.6.3.2 Применение РИД с ОПС-антигеном при диагностике бруцеллеза:

а) крупного рогатого скота:

1) в благополучных по бруцеллезу хозяйствах, в которых вакцины против бруцеллеза не применяли, исследуют сыворотки крови животных, сомнительно и положительно реагирующих на бруцеллез при исследовании в других серологических реакциях, для дифференциации неспецифических реакций, обусловленных грамотрицательными бактериями, имеющими антигенное сходство с бруцеллами, в том числе и иерсиниями, одновременно с исследованием в других подтверждающих диагноз серологических реакциях и при необходимости с проведением бактериологического и (или) молекулярно-генетического исследования;

2) в благополучных по бруцеллезу хозяйствах, в которых животных вакцинируют против бруцеллеза агглютиногенными вакцинами для контроля эпизоотического состояния по бруцеллезу животных и дифференциации поствакцинальных антител не ранее чем через 1,5 мес после вакцинации или ревакцинации. В случае получения положительного результата исследования продолжают с интервалом в 1 мес до истечения 6 мес после введения вакцины;

3) в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах, в которых животных вакцинируют против бруцеллеза агглютиногенными вакцинами — не ранее чем через 1,5 мес после вакцинации или ревакцинации и далее с интервалом в 1 мес до истечения 6 мес после введения вакцины;

б) северных оленей:

1) в благополучных по бруцеллезу хозяйствах, в которых вакцины против бруцеллеза не применяли, исследуют сыворотки крови животных, сомнительно и положительно реагирующих на бруцеллез, для дифференциации неспецифических реакций, обусловленных грамотрицательными бактериями, имеющими антигенное сходство с бруцеллами, в том числе и иерсиниями, одновременно с исследованием в других подтверждающих диагноз серологических реакциях и при необходимости с проведением бактериологического и (или) молекулярно-генетического исследования;

2) в благополучных по бруцеллезу хозяйствах, в которых животных вакцинируют против бруцеллеза агглютиногенными вакцинами:

- для контроля эпизоотического состояния по бруцеллезу животных и дифференциации поствакцинальных антител не ранее чем через 2 мес после вакцинации или ревакцинации. В случае получения положительного результата исследования продолжают с интервалом в 1 мес до истечения 6 мес после введения вакцины;

3) в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах, в которых животных вакцинируют против бруцеллеза агглютиногенными вакцинами:

- не ранее чем через 2 мес с целью раннего выявления больных бруцеллезом животных и далее при возможности ежемесячно до истечения 6 мес после вакцинации;

в) овец и коз:

1) в благополучных по бруцеллезу хозяйствах, в которых вакцины против бруцеллеза не применяли, исследуют сыворотки крови животных, сомнительно и положительно реагирующих на бруцеллез, для дифференциации неспецифических реакций, обусловленных грамотрицательными бактериями, имеющими антигенное сходство с бруцеллами, в том числе и иерсиниями, одновременно с исследованием в других подтверждающих диагноз серологических реакциях и при необходимости с проведением бактериологического и (или) молекулярно-генетического исследования;

2) в благополучных по бруцеллезу мелкого рогатого скота хозяйствах, где проводится иммунизация животных бруцеллезными агглютиногенными вакцинами — для дифференциальной диагностики бруцеллеза овец и коз не ранее чем через 5 мес, только после однократной иммунизации;

3) в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах, в которых животных вакцинируют против бруцеллеза агглютиногенными вакцинами с целью более раннего выявления больных бруцеллезом животных и дифференциации поствакцинальных антител не ранее чем через 5 мес, только после однократной их иммунизации.

7.7 Реакция иммунодиффузии (РИД) с *R*-бруцеллезным антигеном при диагностике бруцеллеза собак, вызываемым *B.canis*

Сущность метода состоит в способности бруцеллезных антител и специфического антигена диффундировать в геле агара и при взаимодействии образовывать нерастворимый комплекс антиген — антитело в виде линии преципитации.

Исследованию подлежат собаки при проявлении у них типичных клинических и иных признаков бруцеллеза, вызываемого *B.canis*. В частности, абортов на поздних сроках щенности, периодических репродуктивных нарушений в форме ранней гибели и рассасывания плодов у сук; эпидидимитов и простатитов, отека и дерматита мошонки, фиброза канальцев семенников, дефектов сперматозоидов, олиго- или азооспермии и бесплодия у кобелей, а также в виде артритов, диспондилитов, лимфаденопатии заглоточных или паховых лимфатических узлов или общей лимфаденопатии, увеитов у животных обоих полов.

7.7.1 Подготовка к исследованию

7.7.1.1 Приготовление 0,8 %-ного геля агара по 7.6.1.

7.7.1.2 Пробы сыворотки крови собак исследуют в РИД в свежем или консервированном виде.

7.7.2 Проведение исследования

Методика проведения исследования — по 7.6.2.

7.7.3 Обработка результатов

Обработка и интерпретация результатов по 7.6.3.1.

7.8 Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

7.8.1 Сущность метода

Метод основан на выявлении бруцеллезным эритроцитарным антигеном специфических антител в сыворотке крови больных бруцеллезом животных.

7.8.2 Подготовка к исследованию

7.8.2.1 Приготовление 1 %-ного раствора хлорамина

Для приготовления 1 %-ного раствора хлорамина 1 г хлорамина растворяют в 100 $см^3$ водопроводной воды. Раствор используют свежеприготовленным.

7.8.2.2 Приготовление хромовой смеси

В фарфоровую чашку вместимостью 300—500 $см^3$ помещают 5 г тонкоизмельченного в фарфоровой ступке двухромовокислого калия или 6 г бихромата натрия, добавляют 100 $см^3$ концентрированной технической серной кислоты и осторожно нагревают на водяной бане до полного растворения двухромовокислого калия (бихромата натрия). Хромовую смесь хранят при комнатной температуре до момента изменения цвета с темно-оранжевого до темно-зеленого.

7.8.2.3 Подготовка планшетов

Планшеты подготавливают к работе следующим образом: новые, погружают на 20—30 мин в теплый раствор с моющим средством и каждую лунку моют вращательным движением ватной или ватно-марлевой пробки. Ершом не пользуются, во избежание повреждения поверхности лунки. Затем планшеты не менее шести раз промывают проточной водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и сушат.

Допускается обработка планшетов хромовой смесью в течение одного дня, затем их промывают проточной водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и сушат.

При работе лицо, руки, одежду защищают от попадания хромовой смеси.

7.8.3 Проведение исследования

Крупный рогатый скот, иммунизированный против бруцеллеза, исследуют в сроки, предусмотренные инструкциями по применению вакцин.

Мелкий рогатый скот, иммунизированный против бруцеллеза, в РНГА не исследуют.

Реакцию выполняют с использованием набора для серологической диагностики бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота в РНГА.

Реакцию проводят в объеме 0,55 $см^3$ (0,5 $см^3$ разведения сыворотки и 0,05 $см^3$ антигена) с использованием сыворотки крови животных в четырех последовательно удваивающихся разведениях в полистироловых планшетах с 72 лунками.

Все сыворотки (испытуемые и контрольные) проверяют на отсутствие гемагглютинирующих свойств.

Для разведения испытуемых и контрольной сывороток, рабочего разведения антигена, несенсибилизированных эритроцитов используют 0,85 %-ный раствор хлористого натрия. Сыворотку бруцеллезную сухую восстанавливают дистиллированной водой или 0,85 %-ным раствором хлористого натрия до объема, указанного на флаконе.

Сыворотки от не иммунизированного или иммунизированного неагглютиногенными бруцеллезными вакцинами крупного рогатого скота исследуют, начиная с разведения 1:50. Исходное разведение 1:25 готовят путем внесения 0,1 $см^3$ сыворотки в пробирки, содержащие 2,4 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия.

Сыворотки от крупного рогатого скота, иммунизированного агглютиногенными бруцеллезными вакцинами, исследуют, начиная с разведения 1:100. Исходное разведение 1:50 готовят путем внесения 0,1 $см^3$ сыворотки в пробирку с 4,9 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия или по 0,05 $см^3$ сыворотки и 2,45 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия, если используют пробирки вместимостью до 5 $см^3$.

Сыворотки от мелкого рогатого скота исследуют, начиная с разведения 1:25. Исходное разведение 1:12,5 готовят путем внесения 0,2 $см^3$ сыворотки в пробирки, содержащие 2,3 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия.

Одновременно с исследуемыми сыворотками аналогично готовят разведения контрольных сывороток: бруцеллезной и негативной.

Исследуемые и контрольные сыворотки в исходных разведениях в пробирках выдерживают в водяной бане при температуре 60 °С—62 °С в течение 30 мин.

В лунки первого, второго, третьего и четвертого рядов планшета вносят по 0,5 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия, в лунки пятого ряда по 0,25 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия (контроль гемагглютинирующих свойств образцов сыворотки).

В лунки первого ряда добавляют по 0,5 $см^3$, а в лунки пятого ряда — по 0,25 $см^3$ исследуемых и контрольных сывороток в исходном разведении. После смешивания путем пипетирования по 0,5 $см^3$ разведенных сывороток из лунок первого ряда переносят в лунки второго ряда, из лунок второго — в лунки третьего, из лунок третьего — в лунки четвертого, из лунок четвертого ряда по 0,5 $см^3$ разведенных сывороток удаляют.

Во все лунки первых четырех рядов с разведенными сыворотками добавляют по 0,05 $см^3$ антигена в рабочем разведении, которое готовят путем смешивания равных объемов антигена и 0,85 %-ного раствора хлористого натрия. В лунки пятого ряда вносят 0,05 $см^3$ взвеси несенсибилизированных эритроцитов в рабочем разведении (1 объем несенсибилизированных эритроцитов + 1 объем 0,85 %-ного раствора хлористого натрия).

При массовых исследованиях постановку реакции допускается проводить в одном разведении сыворотки. После прогревания испытуемые и контрольные сыворотки по 0,25 $см^3$ вносят в лунки планшета и добавляют в них по 0,25 $см^3$ 0,85 %-ного раствора хлористого натрия. В каждую лунку вносят по 0,05 антигена в рабочем разведении.

Содержимое лунок перемешивают путем легкого постукивания по краю планшета до получения равномерной взвеси антигена в сыворотке, выдерживают при температуре от 18 °С до 24 °С в течение 3—4 ч и проводят учет реакции.

При получении положительного результата в одном разведении, для определения титра сыворотки исследуют в четырех разведениях с проведением контроля гемагглютинирующих свойств.

Результат контроля на гемагглютинирующие свойства исследуемых и контрольных сывороток должен быть отрицательным.

Допускается постановка реакции в два этапа: накануне готовят исходные разведения исследуемых и контрольных сывороток крови, инактивируют при указанном выше режиме. Разведенные сыворотки выдерживают при температуре от 2 °С до 8 °С и исследуют на следующий день.

После постановки реакции планшеты выдерживают в 1 %-ном растворе хлорамина или другом антисептическом растворе 1,5—2,0 ч и моют, как указано выше.

7.8.4 Обработка результатов

Реакции учитывают визуально и оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ (четыре креста) — 100 %-ная агглютинация эритроцитов, агглютинат в виде хорошо выраженного «зонтика» покрывает все дно лунки, возможно сползание и заворачивание краев агглютината;

+++ (три креста) — 75 %-ная агглютинация эритроцитов, агглютинат в виде хорошо выраженного «зонтика» меньшего диаметра, чем при оценке реакции на четыре креста. В центре лунки возможно образование с трудом различаемого кольца (точки) из осевших неагглютинированных эритроцитов;

++ (два креста) — 50 %-ная агглютинация эритроцитов, осевшие неагглютинированные эритроциты образуют на дне лунки ровное кольцо с зернистостью вокруг него;

+ (один крест) — на дне лунки ровное кольцо коричнево-красного цвета;

– (минус) — эритроциты оседают в виде компактной «пуговки» или колечка.

За титр антител принимают наибольшее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация эритроцитов с оценкой четыре или три креста. Реакцию с оценкой два креста ++, один крест + и минус — считают отрицательной.

Реакцию считают положительной:

- у крупного рогатого скота, не иммунизированного или иммунизированного неагглютиногенными вакцинами в благополучных и неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки 1:100 с оценкой +++ и выше;

- у крупного рогатого скота, иммунизированного агглютиногенными вакцинами, в благополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки 1:400 с оценкой +++ и выше;

- у крупного рогатого скота, иммунизированного агглютиногенными вакцинами, в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки 1:200 с оценкой +++ и выше;

- у мелкого рогатого скота в благополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки 1:100 с оценкой +++ и выше;

- у мелкого рогатого скота в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки 1:50 с оценкой +++ и выше.

Животных, исследованных с положительным результатом в РНГА, считают больными бруцеллезом.

Реакцию считают сомнительной:

- у крупного рогатого скота, не иммунизированного или иммунизированного неагглютиногенными вакцинами, в благополучных и неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки не выше 1:50 с оценкой ++++;

- у крупного рогатого скота, иммунизированного агглютиногенными вакцинами, в благополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки не выше 1: 200 с оценкой ++++;

- у крупного рогатого скота, иммунизированного агглютиногенными вакцинами, в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки не выше 1:100 с оценкой ++++;

- у мелкого рогатого скота в благополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки не выше 1:50 с оценкой ++++;

- у мелкого рогатого скота в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах в разведении сыворотки не выше 1:25 с оценкой ++++.

При получении сомнительного результата в благополучных по бруцеллезу хозяйствах (пунктах) пробу исследуют дополнительно или повторно, как указано в таблице 12.

В благополучных по бруцеллезу хозяйствах при сохранении или снижении титра при повторном исследовании в РНГА животных считают здоровыми. При повышении титра антител в РНГА или положительных результатах в других серологических реакциях (см. таблицу 12) животных считают больными.

В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах при серологическом исследовании с сомнительным результатом животное считают больным.

При выявлении гемагглютинирующих свойств образцов сыворотки диагностическую оценку животного проводят по результатам серологического исследования в других реакциях, как указано в таблице 12.

7.9 Иммуноферментный анализ (ИФА), непрямой

Принцип непрямого варианта ИФА заключается в выявлении комплекса, образованного *S*-антигеном, иммобилизованным на поверхности лунок полистиролового планшета, и специфическими антителами, содержащимися в пробах сыворотки крови животных или молоке. Специфический комплекс взаимодействует с антивидовым конъюгатом моноклональных антител к IgG крупного и мелкого рогатого скота с пероксидазой и обнаруживается по изменению окраски раствора в результате химических превращений субстрата и хромогена. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемой пробе.

7.9.1 Подготовка компонентов к работе

Подготовка промывочного буферного рабочего раствора: компонент № 8 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают.

Подготовка буферного рабочего раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата: компонент № 7 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают.

Подготовка рабочего раствора конъюгата: компонент № 6 разбавляют буферным рабочим раствором для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата согласно концентрации, указанной на этикетке. Рабочий раствор конъюгата применяют свежеприготовленным.

Компоненты набора № 4 и № 5 (положительный и отрицательный контроли) и № 11 (останавливающий раствор) не требуют предварительной подготовки.

7.9.2 Проведение анализа

Из пакета с компонентом № 1 (полистироловый 96-луночным планшет для иммуноферментного анализа с иммобилизованными моноклональными антителами к *S*-антигену) отбирают требуемое количество стрипов, помещают в рамку-держатель и маркируют водостойким маркером из-за возможного выпадения их из рамки во время проведения исследования. Неиспользованные стрипы помещают в пакет с влагопоглотителем, немедленно заклеивают их герметичной водонепроницаемой пленкой и хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С.

Планшет используют однократно.

Сыворотки крови животных исследуют в разведении 1:26 в буферном рабочем растворе для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата. Все контрольные и испытуемые пробы сывороток разводят непосредственно в лунках планшета.

В лунки стрипов полистиролового планшета вносят по 0,1 $см^3$ буферного рабочего раствора для разведения контрольных и испытуемых проб сывороток крови и конъюгата, затем в лунки вносят контроли:

- в лунку А1 полистиролового планшета вносят 0,004 $см^3$ компонента № 2;
- в лунку В1 полистиролового планшета вносят 0,004 $см^3$ компонента № 3.

Внесение контролей в лунки А1, В1 не обязательно, они могут быть внесены в другие лунки планшета.

В остальные лунки полистиролового планшета вносят по 0,004 $см^3$ испытуемых проб сывороток крови. Сыворотки тщательно перемешивают в лунках.

Пробы молока (молозива) исследуют без разведения.

Внесение контролей:

- в лунку А1 полистиролового планшета вносят 0,1 $см^3$ компонента № 4;
- в лунку В1 полистиролового планшета вносят 0,1 $см^3$ компонента № 5.

Примечание — Внесение контролей в лунки А1, В1 не обязательно, они могут быть внесены в другие лунки планшета.

В остальные лунки полистиролового планшета вносят по 0,1 $см^3$ испытуемых проб молока.

Для внесения каждой пробы сыворотки крови или молока используют новый наконечник.

Допускается проведение исследований сывороток крови, молока, молозива и секрета вымени сухостойных коров на одном планшете. В этом случае в лунки планшета вносят все четыре контроля (компоненты № 2—5).

Для повышения достоверности результатов рекомендуется внесение проб испытуемых сывороток или молока в двух повторностях.

Полистироловый планшет накрывают крышкой (или пленкой) и инкубируют 1 ч (±5 мин) при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

Содержимое лунок полистиролового планшета удаляют, используя автоматические или ручные промывающие системы. Все лунки планшета промывают три раза рабочим промывочным буферным рабочим раствором (по 0,3 $см^3$ в каждую лунку), затем раствор удаляют. Во время обработки большого количества планшетов (с целью синхронизации этапов) допускается оставлять планшеты с промывочным буферным рабочим раствором до 20 мин.

В каждую лунку планшета вносят по 0,1 $см^3$ рабочего раствора конъюгата. Планшет накрывают крышкой (или пленкой) и инкубируют 1 ч (±5 мин) при температуре (37,0 ± 0,5) °С. Затем четырехкратно проводят процедуру промывания лунок планшета.

После завершения промывания лунок готовят субстратную смесь. Для приготовления 10 $см^3$ раствора субстратной смеси, необходимого для проведения реакции на одном планшете, смешивают 10 $см^3$ раствора компонента № 9 и 0,25 $см^3$ раствора компонента № 10. Подготовленный раствор суб-

стратной смеси должен быть бесцветным и стабильным в течение 15 мин. Раствор субстратной смеси с измененным цветом не используют.

В каждую лунку полистиролового планшета вносят по 0,1 $см^3$ субстратного раствора. Вносить раствор необходимо аккуратно, не касаясь планшета.

Планшет накрывают крышкой и инкубируют при температуре от 18 °С до 24 °С в защищенном от прямых солнечных лучей месте от 2 до 10 мин до проявления ярко выраженного синего окрашивания в лунках с положительными контролями.

В каждую используемую лунку полистиролового планшета вносят по 0,08 $см^3$ компонента № 11 (останавливающего раствора). Не допускается контакт наконечника, содержащего останавливающий раствор, с содержимым лунки, т. к. перенос окрашенного раствора из лунки в лунку или резервуар с раствором может исказить результаты. Тщательно вытирают наружную нижнюю поверхность планшета.

7.9.3 Обработка результатов

Сразу после остановки реакции измеряют оптическую плотность (ОП) продуктов реакции в каждой лунке, используя спектрофотометр (ридер) для микропланшетов с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм.

Оценивают значения оптической плотности, полученные в реакциях с контрольными компонентами № 2—5.

Результаты считают достоверными, если контрольные показатели соответствуют критериям:

- значение ОП, полученное в реакции с положительными контролями, ($ОП^+$) ≥ 0,500 оптических единиц для компонента № 2 и для компонента № 4;
- значение ОП, полученное в реакции с отрицательными контролями, ($ОП^-$) < 0,300 оптических единиц для компонента № 3 и < 0,250 оптических единиц для компонента № 5;
- отношение между значениями, полученными в реакциях с положительными ($ОП^+$) и отрицательными контролями: для сывороток крови ≥ 3 [$ОП^+$ (компонента № 2)/$ОП^-$ (компонента № 3) ≥ 3,0];
- для молока ≥ 5 [$ОП^+$ (компонента № 4)/$ОП^-$ (компонента № 5) ≥ 5,0].

Если значение ОП, полученные в реакциях с компонентами № 2—5, не соответствуют указанным критериям, результаты считаются недостоверными и исследование проводят повторно.

Если отношения ОП, полученные в реакциях с компонентами № 2—5 соответствуют вышеуказанным критериям, то проводят оценку результатов реакций в лунках с испытуемыми пробами.

Оценку результатов реакции испытуемых проб проводят с использованием коэффициента K, который рассчитывают по формуле

$$K = \frac{ОП_{исп}}{ОП^-}, \quad (2)$$

где $ОП_{исп}$ — оптическая плотность испытуемой пробы;

$ОП^-$ — оптическая плотность отрицательного контроля.

Реакцию считают положительной для проб сыворотки крови или молока, если значение $K \geq 2,5$.

Реакцию считают отрицательной для проб сыворотки крови или молока, если значение $K < 2,5$.

7.9.4 Интерпретация результатов исследования с набором для выявления специфических антител к бактериям рода *Brucella* методом непрямого ИФА

При выявлении в благополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллеза или иммунизированного неагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, животных, исследованных с положительным результатом, считают больными бруцеллезом.

При сомнительном результате иммуноферментного анализа пробы сыворотки крови от этих животных исследуют повторно через 25—30 дней. При сохранении коэффициента активности сыворотки на прежнем уровне проводят еще одно исследование через 25—30 дней. В случае сохранения коэффициента активности сыворотки на исходном уровне или его снижения заболевание животных бруцеллезом исключают. При повышении коэффициента активности сыворотки в любом из повторных исследований заболевание животных бруцеллезом считают установленным.

При выявлении в неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота, не иммунизированного против бруцеллеза или иммунизированного неагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, животных, исследованных с положительным или сомнительным результатом, считают больными бруцеллезом.

7.10 Иммуноферментный анализ (ИФА), конкурентный

Принцип конкурентного ИФА основан на конкуренции конъюгата меченных пероксидазой моноклональных антител к антигенам *B.species* и бруцеллезных антител, присутствующих в сыворотке крови исследуемого животного, за связывание с антигенами *B. species*, адсорбированными на поверхности лунок планшета. Каждую пробу сыворотки вносят в две лунки планшета: одну — в нечетном ряду с иммобилизованным *S*-антигеном, и одну в четном ряду с иммобилизованным *R*-антигеном. При отсутствии в исследуемой сыворотке крови бруцеллезных антител конъюгат свободно взаимодействует и полностью связывается с адсорбированным на поверхности лунки антигеном *B.species*, формируя иммунный комплекс. Последний выявляется в процессе выполнения последовательных этапов ИФА, включающих его взаимодействие с субстратной смесью и останавливающим раствором, в результате чего в лунке планшета развивается окраска. Если образец исследуемой сыворотки содержит бруцеллезные антитела, то они взаимодействуют с адсорбированным на поверхности лунок *S*- или *R*-антигеном *B.species*, частично или полностью блокируя связывание конъюгата с антигеном, что в свою очередь снижает интенсивность развития окраски. Таким образом, интенсивность окраски реакционной смеси в лунке обратно пропорциональна концентрации антител в исследуемой сыворотке крови. Используя результаты реакций, полученные с контрольными сыворотками, можно определить наличие *S-, R-* или *SR*-бруцеллезных антител в исследуемом образце.

7.10.1 Подготовка компонентов к работе

Подготовка промывочного буферного рабочего раствора: компонент № 6 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают.

Подготовка буферного рабочего раствора для разведения конъюгата: компонент № 7 разбавляют дистиллированной водой в 20 раз и тщательно перемешивают.

Подготовка рабочего раствора конъюгата: компонент № 5 разбавляют буферным рабочим раствором для разведения конъюгата согласно концентрации, указанной на этикетке. Рабочий раствор конъюгата применяют свежеприготовленным.

Компонент набора № 10 (останавливающий раствор) не требует предварительной подготовки.

Сыворотки крови животных исследуют в разведении 1:10 в рабочем растворе конъюгата моноклональных антител непосредственно в лунках планшета.

Из комплекта набора берут пакет с компонентом № 1 [полистироловым 96-луночным планшетом для иммуноферментного анализа с адсорбированными в лунках *S*-антигенами (нечетные ряды) и *R*-антигенами *B.species* (четные ряды)]. При необходимости отбирают требуемое количество стрипов, помещают в рамку-держатель и маркируют водостойким маркером из-за возможного выпадения их из рамки во время проведения исследования. Неиспользованные стрипы помещают в пакет с влагопоглотителем и хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С. Компонент № 1 (планшет) используют однократно.

7.10.2 Проведение исследования

В лунки стрипов полистиролового планшета в соответствии с подготовленным планом исследования вносят по 0,09 $см^3$ рабочего раствора конъюгата и непосредственно после этого в лунки добавляют по 0,01 $см^3$ образцов контрольных и исследуемых сывороток:

- в лунки А1 и А2 — компонента № 2 (положительного *S*-контроля);
- в лунки В1 и В2 — компонента № 3 (положительного *R*-контроля);
- в лунки С1 и С2 — компонента № 4 (отрицательного контроля);
- в лунки D1 и D2 — испытуемой пробы сыворотки крови № 1;
- в лунки Е1 и Е2 — испытуемой пробы сыворотки крови № 2;
- в лунки F1 и F2 — испытуемой пробы сыворотки крови № 3 и т. д.

Для внесения каждого образца используют новый наконечник.

После внесения сывороток крови аккуратно перемешивают содержимое лунок встряхиванием на шейкере или вручную осторожным вращением планшета в горизонтальной плоскости в течение 1—2 мин, не допуская разбрызгивания содержимого лунок.

Планшет накрывают крышкой (или пленкой) и инкубируют 1 ч (±5 мин) при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

Содержимое лунок планшета удаляют, используя автоматические или ручные промывающие системы. Все лунки планшета промывают четыре раза рабочим промывочным буферным раствором (по 0,3 $см^3$ в каждую лунку), затем раствор удаляют. Во время обработки большого количества планшетов (с целью синхронизации этапов) допускается оставлять планшеты с промывочным буферным рабочим раствором до 20 мин.

После завершения промывания лунок готовят субстратную смесь. Для приготовления 10 см^3 раствора субстратной смеси, необходимого для проведения реакции на одном планшете, смешивают 10,0 см^3 раствора компонента № 8 и 0,25 см^3 раствора компонента № 9. Подготовленный раствор субстратной смеси должен быть бесцветным и стабильным в течение 15 мин. Раствор субстратной смеси с измененным цветом не используют.

В каждую лунку планшета вносят по 0,1 см^3 субстратного раствора. Планшет накрывают крышкой и инкубируют при температуре от 18 °С до 24 °С в защищенном от прямых солнечных лучей месте в течение 2—10 мин до достижения ярко выраженного синего окрашивания в лунках с компонентом № 4 (отрицательным контролем).

В каждую используемую лунку планшета вносят по 0,08 см^3 компонента № 10 (останавливающего раствора). Не допускается контакт наконечника, содержащего останавливающий раствор, с содержимым лунки, т. к. перенос окрашенного раствора из лунки в лунку или резервуар с раствором может исказить результаты. Тщательно вытирают наружную нижнюю поверхность планшета.

7.10.3 Обработка результатов

Результаты анализа учитывают инструментальным способом. Сразу после остановки реакции измеряют оптическую плотность продуктов реакции в каждой лунке, используя спектрофотометр (ридер) для микропланшетов с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм.

Оценивают значения оптической плотности, полученные в реакциях с компонентами № 2—4 (контрольными сыворотками крови).

Результаты считают достоверными, если:

- значение ОП, полученное в реакции с компонентом № 2 в лунке нечетного ряда, не менее чем в два раза меньше значения ОП, полученной в реакции с компонентом № 3 в лунке нечетного ряда;
- значение ОП, полученное в реакции с компонентом № 3 в лунке четного ряда, не менее чем в два раза меньше значения ОП, полученной в реакции с компонентом № 2 в лунке четного ряда;
- значения ОП, полученные в реакциях с компонентом № 4 в лунках нечетного и четного рядов, превышают значения ОП, полученные в реакциях с компонентом № 2 в лунке нечетного ряда и с компонентом № 3 в лунке четного ряда.

Если значения ОП, полученные в реакциях с компонентами № 2—4, не соответствуют указанным критериям, результаты считаются недостоверными и исследование проводят повторно.

Если значения ОП, полученные в реакциях с компонентами № 2—4, соответствуют вышеуказанным критериям, то проводят оценку результатов реакций в лунках с исследуемыми образцами сывороток.

Определяют пороговое значение оптической плотности (K_S или K_R) наличия специфических антител к *S*- и *R*-антигенам по формулам:

$$K_S = \frac{\text{ОП-компонент № 4}_{\text{нечет.ряд}}}{1{,}5} \text{ (для } S\text{-антигена)}, \quad (3)$$

$$K_R = \frac{\text{ОП-компонент № 4}_{\text{чет.ряд}}}{1{,}5} \text{ (для } R\text{-антигена)}. \quad (4)$$

При значении величины оптической плотности в лунке нечетного ряда меньшем значения величины K_S исследуемый образец сыворотки считают содержащим антитела к *S*-бруцеллезному антигену и реакцию оценивают как положительную.

При значении величины оптической плотности в лунке четного ряда меньшем значения величины K_R исследуемый образец сыворотки считают содержащим антитела к *R*-бруцеллезному антигену и реакцию оценивают как положительную.

При значении величин оптической плотности в лунках нечетного и четного рядов меньше значений величин K_S и K_R исследуемый образец сыворотки считают содержащим антитела к *S*- и *R*-бруцеллезным антигенам и реакции оценивают как положительные.

При значениях величин оптической плотности в лунках нечетного и четного рядов, равных или больше значений величин K_S и K_R, исследуемый образец сыворотки считают не содержащим бруцеллезных антител и реакции оценивают как отрицательные.

7.10.4 Диагностическая оценка результатов

Диагностическая оценка результатов реакции с набором для выявления специфических антител к бактериям рода *Brucella* методом конкурентного ИФА:

а) крупный рогатый скот:

1) в благополучных и неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота:

- животных, не иммунизированных против бруцеллеза или иммунизированных неагглютиногенными вакцинами, при положительном результате реакции с *S*-бруцеллезным или одновременно с *S*- и *R*-бруцеллезными антигенами считают больными бруцеллезом;

- животных, не иммунизированных против бруцеллеза, при положительном результате реакции с *R*-бруцеллезным антигеном исследуют на бруцеллез повторно через 25—30 дней. В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с *R*-бруцеллезным антигеном, заболевание животных исключают путем проведения одновременного серологического и молекулярно-генетического исследований через 25—30 дней после предыдущего тестирования.

2) в благополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота:

- животных, исследованных не ранее чем через 6 мес после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, при положительном результате реакции с *S*- или одновременно с *S*- и *R*-бруцеллезными антигенами, исследуют на бруцеллез повторно через 25—30 сут.

В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с *S*-бруцеллезным антигеном при увеличении разницы между показателем оптической плотности в лунках с тестируемыми сыворотками и K_S, животных считают больными бруцеллезом независимо от результатов реакции с *R*-бруцеллезным антигеном.

В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с *S*-бруцеллезным антигеном при той же величине или снижении разницы между показателем оптической плотности в лунках с тестируемыми сыворотками и K_S, заболевание животных бруцеллезом исключают независимо от результатов реакции с *R*-бруцеллезным антигеном.

В случае получения при повторном исследовании отрицательных результатов или при положительных результатах реакции только с *R*-бруцеллезным антигеном заболевание животных бруцеллезом исключают;

3) в неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота:

- животных, исследованных не ранее чем через 6 мес после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, при положительной реакции с *S*- или одновременно с *S*- и *R*-бруцеллезными антигенами, исследуют на бруцеллез повторно через 25—30 дней.

В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с *S*-бруцеллезным антигеном при той же величине или увеличении разницы между показателем оптической плотности в лунках с тестируемыми сыворотками и K_S, животных считают больными бруцеллезом независимо от результатов реакции с *R*-бруцеллезным антигеном.

В случае получения при повторном исследовании отрицательных результатов или при снижении разницы между показателями оптической плотности в лунках с *S*-бруцеллезным антигеном и K_S, заболевание животных бруцеллезом исключают.

При получении положительного результата только с бруцеллезным антигеном в *R*-форме, заболевание животных бруцеллезом исключают.

б) мелкий рогатый скот, свиньи, собаки, не вакцинированные против бруцеллеза:

- животных при положительном результате реакции с *S*-бруцеллезным или одновременно с *S*- и *R*-бруцеллезными антигенами считают больными бруцеллезом;

- мелкий рогатый скот, при положительном результате реакции с *R*-бруцеллезным антигеном исследуют повторно через 25—30 дней. В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с *R*-бруцеллезным антигеном, заболевание животных исключает путем проведения одновременно ИФА, серологического исследования с овисными диагностикумами и молекулярно-генетического исследования через 25—30 дней после предыдущего тестирования;

- свиней при положительном результате реакции с *R*-бруцеллезным антигеном исследуют повторно через 25—30 дней. В случае получения при повторном исследовании положительного результата в реакции с *R*-бруцеллезным антигеном, заболевание животных исключает путем проведения одновременно ИФА и молекулярно-генетического исследования через 25—30 дней после предыдущего тестирования;

- собак при положительном результате реакции с *R*-бруцеллезным антигеном считают больными бруцеллезом, вызванным *B.canis*.

Примечание — Для проведения ИФА допускается применять другие коммерческие тест-системы, работу с которыми проводят в соответствии с инструкциями производителей после верификации в лаборатории.

7.11 Иммунохроматографический анализ (ИХА)

Сущность метода заключается в выявлении специфических антител к липополисахаридному антигену *B.abortus* и *B.melitensis*, содержащихся в сыворотке крови крупного рогатого скота и овец.

7.11.1 Подготовка к исследованию

Перед началом работы компоненты набора и анализируемые пробы сыворотки крови выдерживают в течение 30 мин при температуре от 18 °С до 25 °С.

7.11.2 Проведение исследования

7.11.2.1 Метод ИХА применяют для серологического исследования невакцинированного крупного и мелкого рогатого скота; крупного рогатого скота, вакцинированного неагглютиногенными (из штамма *B.abortus* КВ17/100 или аналогичными) или слабоагглютиногенными бруцеллезными вакцинами (из штаммов *B.abortus* 82, 75/79-АВ или аналогичными), но не ранее чем через 8 мес после введения вакцины.

7.11.2.2 Для исследования используют пробы сыворотки крови животных с 4-месячного возраста без признаков гемолиза и бактериальной контаминации, объемом не менее 0,5 $см^3$.

7.11.2.3 Пробы сыворотки крови животных исследуют в разведении 1:5 с использованием компонента К2. Для этого во флаконы с компонентом К2, пронумерованные в соответствии с количеством исследуемых проб, добавляют по 0,2 $см^3$ каждой исследуемой пробы сыворотки крови и перемешивают.

7.11.2.4 Компонент К1 извлекают из пакета и каждую тест-полоску в вертикальном положении (по стрелкам, направленным вниз) погружают до уровня ограничительной линии в подготовленную по 7.11.2.3 пробу сыворотки.

Через 10 мин тест-полоски извлекают из флаконов и помещают в горизонтальном положении маркированной стороной вверх на чистую сухую, не поглощающую влагу поверхность (эмалированный или металлический кювет).

Через 30 мин после начала анализа (но не позднее 40 мин) визуально учитывают результаты реакции.

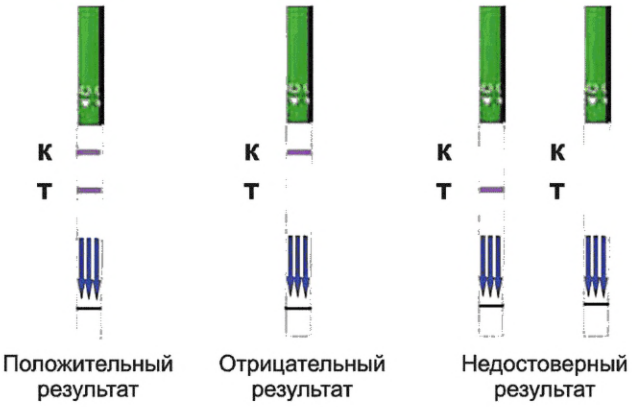

Рисунок 3 — Учет результатов иммунохроматографического анализа

7.11.3 Обработка результатов

Результаты реакции оценивают по наличию на тест-полосках линий розового цвета в К- и Т-зонах. Реакцию считают:

- положительной — при наличии на тест-полоске в Т- и К-зонах двух параллельных линий розового цвета. То есть, в анализируемой пробе сыворотки крови содержатся специфические антитела к ЛПС-антигену *B.abortus* и *B.melitensis;*

- отрицательной — при наличии окрашенной линии розового цвета только в К-зоне тест-полоски. То есть в анализируемой пробе сыворотки крови специфические антитела к ЛПС-антигену *B.abortus* и *B.melitensis* отсутствуют;

- недостоверной — при наличии линии розового цвета только в Т-зоне или при отсутствии окрашенных в розовый цвет линий в Т- и К-зонах. В этом случае рекомендуется провести повторное тестирование пробы сыворотки крови с использованием новой тест-полоски.

Таблица 12 — Методы и диагностическая оценка результатов серологических исследований на бруцеллез (включая инфекционный эпидидимит баранов)

Вид животных	Статус животных по вакцинации	Метод исследования	Статус хозяйства по бруцеллезу (включая инфекционный эпидидимит баранов)	Диагностическая оценка		Методы, подтверждающие сомнительные или положительные результаты исследований в благополучных хозяйствах
				Сомнительный результат	Положительный результат	
Крупный рогатый скот (яки, зебу, буйволы)	Невакцинированные или вакцинированные неагглютиногенными вакцинами, приведенными в приложении А	РБП	Благополучное	—	Выявлены антитела	РА и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА, и (или) РНГА
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РА	Благополучное	Не выше 100 МЕ	200 МЕ и выше	РБП и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА, и (или) РНГА
			Неблагополучное	50 МЕ	100 МЕ и выше	Подтверждение не проводится
		РСК (РДСК)	Благополучное	Не выше 1:10 с оценкой +	1:10 с оценкой ++ и выше	РА и РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА, и (или) РНГА
			Неблагополучное	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	Подтверждение не проводится
		РНГА	Благополучное	Не выше 1:50 с оценкой ++++	1:100 с оценкой +++ и выше	РА и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		ИФА	Благополучное	Выявлены антитела	Выявлены антитела	РА и РСК (РДСК)
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		КР с молоком	Вне зависимости от статуса	Оценка +	Оценка ++ или +++	РА и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА, и (или) РНГА
		РИД с ОПС-антигеном	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
		МПФ	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
		ИХА	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата

Продолжение таблицы 12

Вид животных	Статус животных по вакцинации	Метод исследования	Статус хозяйства по бруцеллезу (включая инфекционный эпидидимит баранов)	Диагностическая оценка		Методы, подтверждающие сомнительные или положительные результаты исследований в благополучных хозяйствах
				Сомнительный результат	Положительный результат	
Крупный рогатый скот (яки, зебу, буйволы)	Вакцинированные слабо или агглютиногенными вакцинами, приведенными в приложении А	РА	Благополучное	Не выше 100 МЕ	200 МЕ и выше	РСК и (или) РСК с *S*- и *R*-антигенами, РИД с ОПС-антигеном и (или) РНГА
			Неблагополучное	50 МЕ	100 МЕ и выше	Подтверждение не проводится
		РСК (РДСК)	Благополучное	Не выше 1:20 с оценкой +	1:20 с оценкой ++ и выше	РА и РИД с ОПС-антигеном, РСК с *S*- и *R*-антигенами и (или) РНГА
			Неблагополучное	Не выше 1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	Подтверждение не проводится
		РНГА	Благополучное	Не выше 1:200 с оценкой ++++	1:400 с оценкой +++ и выше	РСК и (или) РСК с *S*- и *R*-антигенами, РИД с ОПС-антигеном и (или) РНГА
			Неблагополучное	Не выше 1:100 с оценкой ++++	1:200 с оценкой +++ и выше	Подтверждение не проводится
		РИД с ОПС-антигеном	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
Мелкий рогатый скот (овцы и козы)	Невакцинированные	РБП	Благополучное	—	Выявлены антитела	РА и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА, и (или) РНГА
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РА	Благополучное	Не выше 50 МЕ	100 МЕ и выше	РБП и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА, и (или) РНГА
			Неблагополучное	25 МЕ	50 МЕ и выше	Подтверждение не проводится
		РСК (РДСК)	Благополучное	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	РА и РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА, и (или) РНГА
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РНГА	Благополучное	Не выше 1:50 с оценкой ++++	1:100 с оценкой +++ и выше	РА и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА

Продолжение таблицы 12

Вид животных	Статус животных по вакцинации	Метод исследования	Статус хозяйства по бруцеллезу (включая инфекционный эпидидимит баранов)	Диагностическая оценка		Методы, подтверждающие сомнительные или положительные результаты исследований в благополучных хозяйствах
				Сомнительный результат	Положительный результат	
Мелкий рогатый скот (овцы и козы)	Невакцинированные	РНГА	Неблагополучное	Не выше 1:25 с оценкой ++++	1:50 с оценкой ++++ и выше	Подтверждение не проводится
		ИФА	Благополучное	Выявлены антитела	Выявлены антитела	РА и РСК (РДСК)
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РИД с ОПС-антигеном	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
		РДСК с *R*-антигеном (инфекционный эпидидимит баранов)	Вне зависимости от статуса	Не выше 1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	В соответствии с Наставлением по диагностике инфекционной болезни, вызываемой *B.ovis* (инфекционный эпидидимит баранов)
		ИФА с *R*-антигеном (инфекционный эпидидимит баранов)	Вне зависимости от статуса	Выявлены антитела	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
	Вакцинированные агглютиногенными вакцинами, приведенными в приложении А	РА	Благополучное	Не выше 100 МЕ	200 МЕ и выше	РСК (РДСК) и РИД с ОПС-антигеном
			Неблагополучное	25 МЕ	50 МЕ и выше	Подтверждение не проводится
		РСК (РДСК)	Благополучное	Не выше 1:20 с оценкой +	1:20 с оценкой ++ и выше	РА и РИД с ОПС-антигеном
			Неблагополучное	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	Подтверждение не проводится
		РИД с ОПС-антигеном	Благополучное	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата

Продолжение таблицы 12

Вид животных	Статус животных по вакцинации	Метод исследования	Статус хозяйства по бруцеллезу (включая инфекционный эпидидимит баранов)	Диагностическая оценка		Методы, подтверждающие сомнительные или положительные результаты исследований в благополучных хозяйствах
				Сомнительный результат	Положительный результат	
Мелкий рогатый скот (овцы и козы)	Вакцинированные агглютиногенными вакцинами, приведенными в приложении А	РДСК с *R*-антигеном (инфекционный эпидидимит баранов)	Вне зависимости от статуса	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	В соответствии с Наставлением по диагностике инфекционной болезни, вызываемой *B.ovis* (инфекционный эпидидимит баранов)
Лошади (семейство лошадиных), верблюды (семейство верблюжьих)	Невакцинированные	РБП	Благополучное	—	Выявлены антитела	РА и РСК (РДСК)
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РА	Благополучное	Не выше 100 МЕ	200 МЕ и выше	РБП и РСК (РДСК)
			Неблагополучное	50 МЕ	100 МЕ и выше	Подтверждение не проводится
		РСК (РДСК)	Благополучное	Не выше 10 МЕ с оценкой +	1:10 с оценкой ++ и выше	РБП и РА
			Неблагополучное	1:5 с оценкой +	1: 5 с оценкой ++ и выше	Подтверждение не проводится
Олени (северные олени, маралы, лоси)	Невакцинированные	РБП	Благополучное	—	Выявлены антитела	РА и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РА	Благополучное	25 МЕ	50 МЕ и выше	РБП и РСК (РДСК), РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РСК (РДСК)	Благополучное	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	РБП или РА и РИД с ОПС-антигеном и (или) ИФА
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РИД с ОПС-антигеном	Благополучное	Выявлены антитела	Выявлены антитела	РА и РСК (РДСК)
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится

Продолжение таблицы 12

Вид животных	Статус животных по вакцинации	Метод исследования	Статус хозяйства по бруцеллезу (включая инфекционный эпидидимит баранов)	Диагностическая оценка		Методы, подтверждающие сомнительные или положительные результаты исследований в благополучных хозяйствах
				Сомнительный результат	Положительный результат	
Олени (северные олени, маралы, лоси)	Вакцинированные	РА	Благополучное	50 МЕ	100 МЕ и выше	РСК и РИД с ОПС- антигеном
			Неблагополучное	25 МЕ	50 МЕ и выше	Подтверждение не проводится
		РСК (РДСК)	Благополучное	Не выше 1:10 с оценкой +	1:10 с оценкой ++ и выше	РА и РИД с ОПС- антигеном
			Неблагополучное	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	Подтверждение не проводится
		РИД с ОПС-антигеном	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
Пушные звери	Невакцинированные	РА	Вне зависимости от статуса	—	10 МЕ и выше	РСК и (или) ИФА
		РСК	Вне зависимости от статуса	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	РА и (или) ИФА
		ИФА	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
Собаки	Невакцинированные	РБП	Благополучное	—	Выявлены антитела	РА и РСК с *S*-антигеном и (или) ИФА с *S*-антигеном
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РА с *S*-антигеном	Благополучное	25 МЕ	50 МЕ и выше	РБП и РСК и (или) ИФА с *S*-антигеном
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		РА с *R*-антигеном *B.canis*	Вне зависимости от статуса	Не выше 1:50 с оценкой ++++	1:100 с оценкой ++ выше	РИД с *R*-антигеном
		РСК с *S*-антигеном	Благополучное	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	РБП или РА и (или) ИФА с *S*-антигенами
			Неблагополучное			Подтверждение не проводится
		ИФА с *S*-антигеном	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата

Продолжение таблицы 12

Вид животных	Статус животных по вакцинации	Метод исследования	Статус хозяйства по бруцеллезу (включая инфекционный эпидидимит баранов)	Диагностическая оценка		Методы, подтверждающие сомнительные или положительные результаты исследований в благополучных хозяйствах
				Сомнительный результат	Положительный результат	
Собаки	Невакцинированные	ИФА с *R*-антигеном *B.canis*	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
		РИД с *R*-антигеном *B.canis*	Вне зависимости от статуса	—	Выявлены антитела	В соответствии с инструкцией по применению диагностического препарата
Морские свинки (биологическая проба)	Невакцинированные	РА	—	—	10 МЕ и выше	Дополнительные методы исследования отсутствуют
Животные других видов	Невакцинированные	РА	Вне зависимости от статуса	25 МЕ	50 МЕ и выше	РСК и (или) ИФА
		РСК (РДСК)	Вне зависимости от статуса	1:5 с оценкой +	1:5 с оценкой ++ и выше	РА и (или) ИФА
Животные всех видов, в период карантинирования (кроме свиней)	Невакцинированные	РА и РСК (РДСК), или ИФА, или РНГА	Вне зависимости от статуса	Диагностическая оценка методов в соответствии с настоящей таблицей в зависимости от вида животных		Методы исследований, подтверждающие диагноз в соответствии с настоящей таблицей
Свиньи в период карантинирования	Невакцинированные	РСК и (или) ИФА	Вне зависимости от статуса	Диагностическая оценка методов в соответствии с настоящей таблицей		Методы исследований, подтверждающие диагноз в соответствии с настоящей таблицей

Примечания

1 Диагностическую оценку впервые полученных сомнительных или положительных результатов, планового или иного серологического исследования на бруцеллез, включая инфекционный эпидидимит баранов, в благополучных хозяйствах вне зависимости от эпизоотического статуса региона по бруцеллезу, проводят путем дополнительного исследования исходных образцов сыворотки крови в подтверждающих диагноз реакциях согласно данной таблице 12. При получении положительных результатов исследования в диагностических титрах и (или) положительных результатов бактериологического и (или) молекулярно-генетического исследования животных считают больными.

При получении отрицательных или сомнительных результатов животных исследуют повторно через 25—30 дней. При снижении исходных титров антител или получении отрицательного результата при повторном исследовании животных считают здоровыми, при повышении диагностических титров антител в два и более раза — больными.

2 Животных разных видов в хозяйствах со статусом «благополучные без вакцинации» и «благополучные с вакцинацией» по бруцеллезу (включая инфекционный эпидидимит баранов), исследованных дважды с интервалом 25—30 дней с сомнительным результатом, без повышения титра антител считают здоровыми.

Продолжение таблицы 12

3 В хозяйствах, имеющих статус «неблагополучное» по бруцеллезу (включая инфекционный эпидидимит баранов) животных (кроме лошадей), исследованных с сомнительным или положительным результатом, считают больными бруцеллезом и не исследуют дополнительно или повторно.

4 Скрининговые серологические методы РБП, КР с молоком, ИХА, аллергической пробы с бруцеллином ВИЭВ при положительном результате исследования в хозяйствах имеющих статус «благополучное по бруцеллезу» требуют дополнительного и (или) повторного исследования с использованием других, представленных в таблице методов, подтверждающих диагноз на бруцеллез, за исключением некоторых тест-систем для ИФА, результаты которых также требуют подтверждения комплексом классических реакций.

5 РИД с ОПС-антигеном, помимо исследования всех животных при проведении оздоровительных мероприятий в течение 6 месяцев после иммунизации слабоагглютиногенными бруцеллезными вакцинами, может применяться для диагностической оценки положительных результатов исследования животных на бруцеллез, полученных в хозяйствах, имеющих статус «благополучные по бруцеллезу», в том числе невакцинированных или вакцинированных неагглютиногенными вакцинами. Получение при этом отрицательных результатов исследования в РИД с ОПС-антигеном не исключает постановку диагноза:

- при выделении чистой культуры бруцелл при бактериологическом исследовании биологического (патологического) материала от животных культуральным методом или при положительном результате биологической пробы (за исключением животных, с момента вакцинации которых против бруцеллеза прошло не менее 18 мес), которое проводят с целью подтверждения диагноза при диагностическом убое животных, подозреваемых в заражении и сомнительно или положительно реагирующих при серологическом исследовании на бруцеллез в хозяйствах, благополучных по бруцеллезу. При выделении культуры бруцелл от вакцинированных животных, после ее дифференциации от культур вакцинных штаммов бруцелл и от культуры *Yersinia enterocolitica* в тесте на подвижность;

- при выделении генетического материала бруцелл по результатам молекулярно-генетического исследования (ПЦР), которое проводится с целью подтверждения диагноза при выявлении животных сомнительно или положительно реагирующих при серологическом исследовании на бруцеллез в хозяйствах, благополучных по бруцеллезу. Отрицательные результаты бактериологического или молекулярно-генетического исследований не исключают инфицирование животного бруцеллами, особенно при проведении прижизненной диагностики болезни;

- у крупного рогатого скота (яков, зебу, буйволов) (*B.abortus*), невакцинированного против бруцеллеза или неагглютиногенными вакцинами, при положительном результате в благополучном по бруцеллезу хозяйстве (далее — в благополучном): в РА с наличием 200 МЕ и выше, РНГА — 1:100 с оценкой +++ и выше, РСК (РДСК) — 1:10 с оценкой ++ и выше, РИД с ОПС-антигеном, ИФА; в неблагополучном по бруцеллезу хозяйстве (далее — в неблагополучном): в РА с наличием 100 МЕ и выше, РНГА — 1:100 с оценкой +++ и выше, РСК (РДСК) — 1:5 с оценкой ++ и выше, РИД с ОПС-антигеном, ИФА;

- у крупного рогатого скота (яков, зебу, буйволов), вакцинированного слабо и агглютиногенными вакцинами, при положительном результате серологического исследования, проведенного в сроки, предусмотренные инструкцией по применению вакцины, в благополучном по бруцеллезу хозяйстве: в РА с наличием 200 МЕ и выше, РНГА − 1:400 с оценкой +++, РСК (РДСК) — 1:20 с оценкой ++ и выше, РИД с ОПС-антигеном; в неблагополучном: в РА с наличием 100 МЕ и выше и (или) РНГА − 1:200 с оценкой +++ и выше, РСК (РДСК) — 1:5 с оценкой ++ и выше, РИД с ОПС-антигеном;

- у мелкого рогатого скота (*B.melitensis*) невакцинированного бруцеллезными вакцинами при положительном результате серологического исследования:
  - в благополучном: в РА с наличием 100 МЕ и выше, РНГА — 100 с оценкой +++ и выше, РСК — 1:5 с оценкой ++ и выше, ИФА, РИД с ОПС-антигеном;
  - в неблагополучном: в РА с наличием 50 МЕ и выше, РСК — 1:5 с оценкой ++ и выше, РНГА − 1:50 с оценкой +++ и выше, ИФА, РИД с ОПС-антигеном;

- вакцинированных (за исключением баранов-производителей и пробников) агглютиногенными вакцинами при положительном результате серологического исследования:
  - в благополучном хозяйстве: в РА с наличием 200 МЕ и выше, РСК — 1:10 с оценкой ++ и выше, РИД с ОПС-антигеном;
  - в неблагополучном хозяйстве: в РА с наличием 50 МЕ и выше, РСК — 1:5 с оценкой ++ и выше, РИД с ОПС-антигеном;
- у животных всех видов в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах при положительном результате серологического исследования в РБП;
- (инфекционный эпидидимит баранов, *B.ovis*) баранов-производителей, пробников, овец, ярок в благополучном или неблагополучном по бруцеллезу хозяйстве не вакцинированных и вакцинированных против бруцеллеза агглютиногенными вакцинами (за исключением баранов-производителей и пробников) при положительном результате серологического исследования в РДСК — 1:5 с оценкой ++ и выше или ИФА с *R*-антигеном;

Окончание таблицы 12

- у лошадей и верблюдов (*B.abortus*) в благополучных по бруцеллезу хозяйствах при положительном результате в РА с наличием 200 МЕ и выше, РСК в титре 1:10 с оценкой ++ и выше, ИФА; в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах при положительном результате в РА с наличием 100 МЕ и выше, РСК — 1:5 с оценкой ++ и выше, ИФА;
- у свиней (*B.suis*) в благополучных по бруцеллезу хозяйства — 1:10 с оценкой ++ и выше и (или) ИФА или в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах при положительном результате в РБП и (или) аллергической пробе и (или) РСК (РДСК) — 1:5 с оценкой ++ и выше и (или) ИФА;
- у оленей и маралов (*B.suis, B.abortus*) в благополучных или неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах у невакцинированных и неблагополучных хозяйствах у вакцинированных животных при положительном результате в РА с наличием 50 МЕ и выше, РСК — 1:5 с оценкой ++ и выше, РИД с ОПС-антигеном; в благополучных хозяйствах у вакцинированных животных при положительном результате в РА с наличием 100 МЕ и выше, РСК — 1:10 с оценкой ++ и выше, РИД с ОПС-антигеном;
- у собак (*B.abortus, B.melitensis, B.suis*) при положительном результате в РА с *S*-антигеном с наличием 50 МЕ и выше, РСК — 1:5 с оценкой ++ и выше;
- у собак (*B.canis*) при положительном результате в РА с *R*-антигенами − 1:100 с оценкой ++ и выше, РА с *R*-антигеном на стекле, РИД с *R*-антигеном, ИФА;
- у пушных зверей при положительном результате в РА с наличием 10 МЕ и выше, РСК − 1:5 с оценкой ++ и выше;
- у морских свинок при положительном результате в РА с наличием 10 МЕ и выше.

При получении отрицательных результатов серологического исследования на бруцеллез животных в РБП по всему стаду, отаре, табуну, группе их считают благополучными по бруцеллезу.

В благополучном по бруцеллезу хозяйстве при получении отрицательных результатов в КР с молоком по всему стаду, группе крупного рогатого скота (зебу, яков, буйволов) их считают благополучными по бруцеллезу.

6 Поступивших из благополучных по бруцеллезу хозяйств регионов со статусом «неопределенный регион» или «неблагополучный регион» по бруцеллезу исследуют в РА и РСК (РДСК) или РА и РИД с ОПС-антигеном, или в ИФА, или в РНГА (за исключением овец и коз, иммунизированных против бруцеллеза), свиней — РСК (РДСК) и (или) в ИФА. Допускается применение указанных серологических методов в иных сочетаниях, в том числе с дополнением другими серологическими методами, подтверждающими диагноз.

7 Серологические методы (реакции), представленные в данной таблице, предназначены для групповой диагностики бруцеллеза.

Индивидуальное диагностическое исследование отдельных животных в регионах, имеющих статус «благополучный по бруцеллезу», или в благополучных по бруцеллезу хозяйствах, расположенных в регионах, имеющих статус «неопределенный» или «неблагополучный по бруцеллезу», может быть проведено с использованием двух-трех серологических реакций в разных сочетаниях, а также с использованием методов, основанных на выделении культуры и (или) ДНК возбудителя и аллергической пробы.

Приложение А
(справочное)

Вакцины, применяемые для специфической профилактики бруцеллеза у животных

Вакцины, применяемые для специфической профилактики бруцеллеза у животных, условно делятся на две группы: агглютиногенные и неагглютиногенные.

Агглютиногенные вакцины (из штаммов *B.abortus* 19, *B.abortus* 82, *B.abortus* 75/79-АВ, *B.abortus* Рев-1 и др.) производят из культур бруцелл в *S*- или в *SR*-форме (*RS*-форме). В организме животных, иммунизированных такими вакцинами, синтезируются специфические антитела, гомологичные *S*-антигену, выявляемые при серологическом исследовании со стандартными бруцеллезными диагностическими препаратами в РА, РСК, РДСК, РБП, РНГА, КР с молоком, РИД с ОПС-антигеном и др.).

Неагглютиногенные вакцины являются живыми культурами бруцелл в *R*-форме — *B.abortus RB*-51 или инактивированные культуры бруцелл в *R*-форме, эмульгированные в масляном или другом адъюванте из штамма *B.abortus* КВ17/100 и др. Такие вакцины в организме иммунизированных здоровых животных не вызывают образования антител, выявляемых антигенами, изготовленными из бруцелл в *S*-форме (антиген бруцеллезный единый для РА, РСК и РДСК, антиген бруцеллезный для КР с молоком, антиген бруцеллезный для роз бенгал пробы, ОПС-антиген для РИД, антиген бруцеллезный эритроцитарный для РНГА и др.).

УДК 619:616:98:579:841.93:616-076:006.354 МКС 11.220

Ключевые слова: животные, бруцеллез, диагностика, серологические реакции, антиген, иммуноферментный анализ, сыворотка, реакция агглютинации, реакция связывания комплемента, комплемент, благополучные хозяйства, неблагополучные хозяйства, интерпретация результатов

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.В. Смирнова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 22.03.2023. Подписано в печать 31.03.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 5,02.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ 34105—2023 Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 6 2025 г.)

gost.e-ecolog.ru