Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

3.1.7. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ПРОФИЛАКТИКА
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. ИНФЕКЦИИ,
ОБЩИЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза

Методические указания
МУК 3.1.7.3402—16

Издание официальное

Москва • 2017

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

3.1.7. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. ИНФЕКЦИИ, ОБЩИЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза

Методические указания
МУК 3.1.7.3402—16

ББК 51.9
Э71

Э71 **Эпидемиологический** надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017.—60 с.

ISBN 978—5—7508—1539—5

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А. Ю. Попова, Ю. В. Демина, Н. Д. Пакскина, Н. В. Шеенков), Федеральным казенным учреждением здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (А. Н. Куличенко, Г. И. Лямкин, Е. А. Манин, И. С. Тюменцева, Д. Г. Пономаренко, А. А. Худолеев, Д. В. Ульшина), Федеральным казенным учреждением здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (И. Н. Шарова, Н. А. Осина, Ж. А. Касьян, С. А. Щербакова, В. В. Кутырев), Федеральным казенным учреждением здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (С. В. Балахонов, Л. М. Михайлов, Н. Л. Баранникова, Л. Е. Токарева, В. И. Кузнецов, С. А. Косилко, А. К. Носков, А. Г. Трухина).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 10 ноября 2016 г.

3. Введены взамен методических указаний «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» (МУ 3.1.7.1189—03)

ББК 51.9

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 22.06.17

Формат 60x88/16 Печ. л. 3,75

Тираж 125 экз. Заказ 48

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2017
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017

Содержание

Перечень сокращений 4
1. Область применения 5
2. Общие положения 5
3. Эпидемиологические особенности бруцеллеза 7
4. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом 8
5. Клиническая диагностика бруцеллезной инфекции 11
6. Мониторинг за циркуляцией возбудителя 11
7. Эпидемиологическое районирование административной территории субъекта Российской Федерации 12
8. Эпидемиологический прогноз 13
9. Лабораторная диагностика бруцеллеза 13
9.1. Отбор, транспортирование материала и подготовка проб для исследования 13
9.2. Методы выделения возбудителя и его растворимых антигенов 17
9.3. Методы выявления специфических антител 27
9.4. Тесты, выявляющие повышенную сенсибилизацию организма к бруцеллезному антигену 37
9.5. Индикация бруцелл в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, клиническом и патологическом материале 40
9.6. Определение генотипа выделенных штаммов бруцелл методом MLVA 48
9.7. Определение чувствительности бруцелл к антибактериальным препаратам 49
10. Нормативные ссылки 50
Приложение 1. Методика проведения эпидемиологического районирования субъекта Российской Федерации по риску эпидемической опасности 53
Приложение 2. Рецепты питательных сред 56
Приложение 3. Дифференциальные свойства видов и биоваров бактерий рода *Brucella* 60

Перечень сокращений

ГИС – географические информационные системы;

НЦЭСМП – Научный центр экспертизы средств медицинского применения;

Г – гуанин;

ДДМ – диско-диффузионный метод;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДТР – диагностический титр разведения;

ИП – интенсивный показатель;

ИФА – иммуноферментный анализ;

ЛПС – липополисахарид;

МО – медицинские организации;

м.к. – микробная клетка;

МДа – мегадальтон;

МЕ – международные единицы;

мкм – микрометр;

МПА – мясопептонный агар;

МПБ – мясопептонный бульон;

МПК – минимальная подавляющая концентрация;

МУ – методические указания;

МУК – методические указания по контролю;

МФА – метод флуоресцирующих антител;

ООИ – особо опасные инфекции;

ПБА – патогенный биологический агент;

ПСЛ – показатель специфического лизиса лейкоцитов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЭО – показатель эпидемической опасности;

РА – реакция агглютинации;

РИФ – реакция иммунофлуоресцении;

РНАт – реакция нейтрализации антител;

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации;

РК – реакция Кумбса;

РЛЛ – реакция лизиса лейкоцитов;

РХ – реакция Хеддлсона;

РА– реакция агглютинации Райта;

СП – санитарные правила;

Тб – Тбилиси;

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;

ЦНС – центральная нервная система;

Ц – цитозин;

MLVA – мультилокусный анализ вариабельного числа тандемных повторов.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
10 ноября 2016 г.

3.1.7. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. ИНФЕКЦИИ, ОБЩИЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза

Методические указания МУК 3.1.7.3402—16

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания определяют организацию и порядок проведения эпидемиологического надзора, а также порядок упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторных исследований клинического материала в целях выявления этиологического агента и проведения его типирования.

1.2. Настоящие методические указания предназначены для специалистов органов и организаций, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также для специалистов медицинских организаций, осуществляющих лабораторную диагностику бруцеллеза, независимо от их организационно-правовой формы или формы собственности.

2. Общие положения

2.1. Бруцеллез – зоонозное, инфекционно-аллергическое заболевание с высокой потенциальной возможностью перехода в хроническую форму. Возбудитель бруцеллеза относится ко II группе патогенности. Человек высоковосприимчив к возбудителю бруцеллеза. Заболевание характеризуется длительным течением с поражением преимущественно

опорно-двигательного аппарата, как правило, сопровождается хронизацией инфекционного процесса с последующей инвалидизацией больного. Наиболее широко бруцеллез распространен в странах Средиземноморья, Малой Азии, Юга и Юго-Восточной Азии, Африки, Центральной и Южной Америки.

2.2. В Международную классификацию болезней Десятого пересмотра «бруцеллез» входит в блок «бактериальные зоонозы» под кодом А23.

2.3. Возбудитель бруцеллеза относится к семейству *Brucellacaea*, роду *Brucella*, который включает в себя 10 самостоятельных видов, различающихся по биохимическим, метаболическим, антигенным и вирулентным характеристикам: *B. melitensis* (3 биовара), *B. abortus* (7 биоваров), *B. suis* (5 биоваров), *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*.

2.4. Геном представлен двумя кольцевыми молекулами ДНК размером 2 100 т.п.н. и 1 500 т.п.н. *B. suis* биоваров 2 и 4 имеет две хромосомы размером 1 850 т.п.н. и 1 350 т.п.н., а *B. suis* биовара 3 – одну хромосому размером 3 100 т.п.н. Молекулярная масса ДНК возбудителя бруцеллеза составляет $2{,}37 \times 10^3$ МДа. Плазмиды у бруцелл не обнаружены.

2.5. К патогенным для человека бруцеллам, способным вызывать заболевание, относятся возбудители бруцеллеза: *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*, циркулирующие в очагах бруцеллеза крупного и мелкого скота, а также свиней. *B. abortus* и *B. suis* вызывают спорадическую заболеваемость, *B. melitensis* способен вызывать групповые заболевания.

2.6. Бруцеллы относительно стабильны в окружающей среде и способны длительное время сохраняться в различных субстратах. Во влажной среде при температуре 55 °С возбудитель бруцеллеза погибает через 60 мин, при 60 °С – через 30 мин, при 70 °С – через 10 мин, при кипячении – моментально. Сухой жар (90—95 °С) убивает бруцеллы в течение часа. При низких температурах бруцеллы сохраняют жизнеспособность при температуре минус 5—8 °С в течение 35 дней, а при минус 20 °С – в течение 20 дней. Под действием солнечного света бруцеллы погибают в сроки от нескольких минут до 7—8 дней в зависимости от интенсивности инсоляции и атмосферных условий. В сыром молоке, хранящемся в холодильнике, возбудитель бруцеллеза сохраняется до 10 дней; сливочном масле – более 4 недель; домашнем сыре – 3 недели; брынзе – 45 дней; простокваше, сметане – 8—15 дней; кумысе, шубате (сброженное верблюжье молоко) – до 3 суток; мясе – до 12 дней; во внутренних органах, костях, мышцах и лимфатических узлах инфицированных туш – в течение 1 месяца и более; в овечьей шерсти, смушках – от 1,5 до

4 месяцев. В замороженных инфицированных мясных и молочных продуктах бруцеллы остаются жизнеспособными в течение всего срока хранения.

2.7. Возбудитель бруцеллеза чувствителен к различным дезинфицирующим веществам: 2%-й раствор фенола, 3%-й раствор креолина, 0,2—1%-й раствор хлорной извести и хлорамина убивают их в течение нескольких минут.

3. Эпидемиологические особенности бруцеллеза

3.1. Основными источниками возбудителя инфекции для людей являются больные бруцеллезом овцы, козы, крупный рогатый скот и свиньи. Отмечаются случаи заражения людей от северных оленей, верблюдов, яков, собак, кошек и других животных.

3.2. Эпидемиологическое значение имеют неблагополучные по бруцеллезу овцеводческие хозяйства с циркуляцией наиболее вирулентного возбудителя вида *B. melitensis*, в которых чаще возникают вспышечные случаи заболевания людей, а также хозяйства крупного рогатого скота и свиноводческие фермы, в которых регистрируется, как правило, спорадическая заболеваемость.

3.3. Роль человека в передаче бруцеллезной инфекции эпидемиологического значения не имеет.

3.4. Инкубационный период – от 5 до 15 дней, чаще 7—10 дней.

3.5. Основными путями передачи возбудителя бруцеллеза являются контактный и алиментарный, реже аэрогенный. Особенно высока возможность инфицирования при контактном пути заражения во время оказания помощи животным при родах и абортах, когда проводят ручное отделение плаценты. Заражение может произойти при переработке мясного сырья, кожи, шерсти, шкур больных бруцеллезом животных. В таких случаях инфицирование людей происходит через кожные покровы. Проникновение бруцелл может произойти через слизистые глаз, носа, ротовой полости при несоблюдении мер личной безопасности.

Алиментарный путь передачи бруцелл реализуется при употреблении пищевых продуктов, полученных от больных животных. Наибольшую опасность представляют сырое молоко и молочные продукты (брынза, сливки, сметана, кумыс и др.), которые являются причиной инфицирования людей, профессионально не связанных с животноводством (особенно жителей городов).

Аэрогенный путь заражения человека бруцеллезом возможен при стрижке шерсти, сборе пуха, уборке скотных дворов, обработке шкур, убое скота и других производственных процессах, связанных с уходом

за больными животными, или при обработке продуктов и сырья, полученных от них, а также в бактериологических лабораториях во время манипуляций при работе с чистыми культурами (пересевы, центрифугирование и др.), когда образуются бактериальные аэрозоли.

3.6. Для бруцеллеза характерны подъемы заболеваемости, связанные с проведением окотной кампании и уходом за животными в послеродовой период. Спорадические случаи инфекции выявляются в течение всего года.

3.7. После перенесенного заболевания в сыворотке крови сохраняются антитела к антигенам возбудителя. Приобретенный после перенесенного заболевания иммунитет не предотвращает новые случаи заболевания, но способствует более легкому клиническому течению. Применение вакцины создает иммунитет продолжительностью 8—10 месяцев.

3.8. Бруцеллез поражает население всех возрастных групп, однако преимущественно болеют лица трудоспособного возраста. Заболеваемость бруцеллезом в большинстве случаев носит профессиональный характер и регистрируется среди лиц, имеющих контакт с больными животными или сырьем животного происхождения. К группам профессионального риска относятся работники животноводческих (звероводческих) хозяйств (ферм), мясомолочных комбинатов и других предприятий по переработке продуктов и сырья животного происхождения, убойных пунктов, пунктов стрижки, купки овец, ветеринарные работники, персонал бактериологических лабораторий, работающих с вирулентными культурами бруцелл.

4. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом

4.1. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом – это непрерывное наблюдение за динамикой эпидемических проявлений инфекции и эпизоотической ситуации, а также за факторами и условиями, способствующими циркуляции возбудителя с целью своевременной разработки комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий и принятия управленческих решений.

4.2. При осуществлении федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора осуществляется:

– слежение за заболеваемостью людей бруцеллезом, ее территориальным распространением и заболеваемостью отдельных групп населения (сельского, городского, по возрастным и профессиональным группам);

– активное выявление медицинскими организациями больных бруцеллезом из числа больных, с диагнозами, не исключающими заболевание бруцеллезом или сопоставимыми с этой инфекцией, лабораторное

обследование на бруцеллез, в т. ч. на гемокультуру (по показаниям), длительно лихорадящих больных (более 5 дней);

– анализ эпизоотологической ситуации по бруцеллезу по материалам, представляемым государственной ветеринарной службой, включая анализ комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на ограничение рассеивания инфекции и предупреждение заражения здоровых животных;

– слежение за численностью контингентов, подвергающихся риску заражения на эндемичных по бруцеллезу территориях, а также за контингентами, профессионально связанными с риском заражения бруцеллезом;

– слежение за динамикой эпидемиологически значимых социальных явлений (миграция населения и сельскохозяйственных животных, характер хозяйственной деятельности, санитарно-гигиенические условия работы в сельскохозяйственном производстве и на предприятиях по переработке продуктов животноводства и сырья, уровень медицинского обслуживания и др.);

– разработка тактики специфической профилактики бруцеллеза;

– оценка качества, своевременности и эффективности осуществляемых профилактических и противоэпидемических мероприятий с целью их оптимальной корректировки;

– разработка прогнозов эпидемиологической ситуации.

4.3. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом проводится органами и организациями, осуществляющими федеральный государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

4.4. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом основан на результатах эпидемиологической, клинической и лабораторной диагностики.

4.4.1. Эпидемиологическая диагностика бруцеллеза.

4.4.1.1. Эпидемиологический анализ подразделяется на ретроспективный и оперативный.

4.4.1.2. Ретроспективный эпидемиологический анализ проводится специалистами территориальных органов Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации и включает изучение многолетней и помесячной динамики заболеваемости населения, анализ эпизоотологической ситуации на конкретной территории с определением факторов риска заболевания и причинно-следственных связей.

Ретроспективный анализ ситуации предусматривает следующее:

– характеристику многолетней динамики заболеваемости с определением тенденций (рост, снижение, стабилизация) и темпов роста (прироста) или снижения;

– анализ годового и помесячного уровней заболеваемости бруцеллезом;

– изучение заболеваемости по отдельным регионам, территориям, населенным пунктам;

– изучение заболеваемости по возрасту, полу, профессии, месту жительства, субъектам хозяйственной деятельности;

– распределение заболеваемости по характеру клинических проявлений и тяжести клинического течения;

– анализ многолетних данных о циркуляции возбудителя бруцеллеза по результатам лабораторных исследований материала от людей и животных (данные ветеринарной службы);

– изучение особенностей возбудителя (виды, биовары, генотипы);

– анализ факторов риска, включая сведения об эпизоотическом состоянии по бруцеллезу административной территории, населенного пункта.

4.4.1.3. Оперативный эпидемиологический анализ проводится за определенный промежуток времени на конкретной территории с целью оценки эпидемиологической обстановки, постановки эпидемиологического диагноза, разработки адекватных противоэпидемических (профилактических) мероприятий и составления прогноза развития эпидемиологической ситуации.

Оперативный анализ заболеваемости бруцеллезом основывается на данных регистрации первичных диагнозов и позволяет своевременно установить изменения эпидемической ситуации и их причины.

Основной задачей ретроспективного и оперативного анализов является своевременное выявление предпосылок и причин осложнения эпидемической ситуации.

4.4.1.4. В качестве предпосылок, способных обусловить возникновение заболевания бруцеллезом, могут являться:

– возникновение новых неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота на административной территории;

– увеличение заболеваемости бруцеллезом на соседних территориях;

– увеличение количества сельскохозяйственных животных эпидемиологически значимых видов, заболевших бруцеллезом;

– завоз сельскохозяйственных животных эпидемиологически значимых видов из неблагополучных по бруцеллезу хозяйств, других территорий.

4.4.1.5. Предвестниками активизации эпидемического процесса являются:

– регистрация случаев заболевания людей бруцеллезом, число которых превышает среднемноголетний уровень для конкретной административной территории;

– регистрация эпидемических очагов бруцеллеза с групповой заболеваемостью на территории с неблагополучными по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота пунктами;

– установление миграции возбудителя бруцеллеза мелкого рогатого скота (*B. melitensis*) на крупный рогатый скот.

4.4.1.6. При регистрации впервые выявленных заболеваний бруцеллезом проводится эпидемиологическое расследование, осуществляемое в соответствии с действующими нормативными правовыми и методическими документами по профилактике бруцеллеза.

5. Клиническая диагностика бруцеллезной инфекции

5.1. Диагноз «бруцеллез» устанавливают на основании клинических, эпидемиологических данных и лабораторного подтверждения (обнаружение маркеров возбудителя бруцеллеза с использованием методов и диагностических препаратов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке).

5.2. При эпидемиологическом расследовании групповых случаев бруцеллеза (при регистрации 5 и более взаимосвязанных случаев заболеваний) обязательно проводят лабораторное обследование. Больным из очагов групповых заболеваний, в которых имеются лабораторно подтвержденные случаи, диагноз «бруцеллез» может быть установлен на основании клинико-эпидемиологических данных.

5.3. Окончательный диагноз должен включать: клиническую форму заболевания, тяжесть течения, осложнение и результаты лабораторных исследований.

5.4. Госпитализация больных проводится по клиническим показаниям.

5.5. Регистрация, учет и статистическое наблюдение случаев заболевания людей бруцеллезом осуществляется в соответствии с действующими нормативными правовыми и методическими документами по профилактике бруцеллеза.

6. Мониторинг за циркуляцией возбудителя

6.1. Микробиологический мониторинг за циркуляцией возбудителя осуществляют с целью изучения этиологической структуры бруцеллеза у людей, динамического слежения за распространением и циркуляцией возбудителя.

6.2. Микробиологический мониторинг возбудителя бруцеллеза проводят органы и организации, уполномоченные осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор по материалам, пред-

ставленным, в том числе, лабораториями медицинских организаций и другими лабораториями, аккредитованными для проведения соответствующих исследований в установленном порядке.

6.3. Выделенные культуры бруцелл с атипичными свойствами из групповых очагов бруцеллеза направляются в установленном порядке для дальнейшего изучения в Референс-центр по мониторингу за возбудителем бруцеллеза (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора).

6.4. Результаты микробиологического исследования учитываются в ходе эпидемиологического анализа в рамках проведения эпидемиологического надзора за бруцеллезом.

7. Эпидемиологическое районирование административной территории субъекта Российской Федерации

7.1. Районирование территории по ПЭО заболевания людей бруцеллезом используется для осуществления дифференцированного подхода при проведении эпидемиологического надзора и профилактики данной инфекции в субъекте Российской Федерации.

7.2. Эпидемиологическое районирование по ПЭО базируется на официальных статистических данных о заболеваемости людей и животных в муниципальных районах субъекта Российской Федерации за определенный период времени.

7.3. При проведении эпидемиологического районирования территории субъекта Российской Федерации по ПЭО учитываются показатели заболеваемости населения и частота эпидемических проявлений бруцеллеза в разрезе административных районов субъекта Российской Федерации, что позволяет объединить их в группы по степени эпидемической опасности и составить шкалу картограмм для эпидемиологического районирования.

7.4. Результаты эпидемиологического районирования территории субъекта Российской Федерации по уровню ПЭО представляются в виде картограммы, которая выполняется одним из способов:

– в автоматическом режиме с применением современных географических информационных систем (ГИС): *ArcGis*, *MapInfo*;

– в ручном режиме – данные могут наноситься на карту с административно-территориальным делением субъекта Российской Федерации (бумажный носитель) окраской определенной степени насыщенности (фоновая картограмма).

7.5. Данные по районированию административных территорий субъектов Российской Федерации по ПЭО, полученные в результате

анализа многолетней заболеваемости, используются для оценки эпидемиологической обстановки по бруцеллезу при проведении эпидемиологического анализа и планировании комплекса противобруцеллезных мероприятий.

7.6. Методика проведения эпидемиологического районирования субъекта Российской федерации по риску эпидемической опасности представлена в прилож. 1.

8. Эпидемиологический прогноз

Результаты оперативного, ретроспективного анализов заболеваемости бруцеллезом, районирования административной территории по ПЭО позволяют обосновать прогноз развития эпидемической ситуации как на краткосрочную перспективу (до 1 месяца), так и на среднесрочную (до 1 года).

Точность эпидемиологического прогноза при бруцеллезе зависит от правильности постановки эпидемиологического диагноза и оценки факторов, обусловливающих возможность активной реализации механизма передачи возбудителя, адекватности мероприятий, проводимых в отношении источников инфекции, прерывания путей распространения инфекции и защиты угрожаемого контингента населения.

9. Лабораторная диагностика бруцеллеза

Лабораторная диагностика бруцеллеза проводится согласно нормативным правовым и методическим документам, определяющим порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней.

Для лабораторной диагностики бруцеллеза у людей применяются три группы методов: первая – тесты, позволяющие выявить возбудителя заболевания и его растворимые антигены; вторая – методы определения специфических антител; третья – тесты, свидетельствующие о сенсибилизации организма.

При выделении культуры возбудителя бруцеллеза определяют ее чувствительность к антибактериальным препаратам, проводят генотипирование.

9.1. Отбор, транспортирование материала и подготовка проб для исследования

Отбор, транспортирование материала и подготовка проб для исследования осуществляются в соответствии с нормативными правовыми и методическими документами, определяющими порядок организации и

проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней.

9.1.1. Отбор и транспортирование проб клинического материала

Отбор проб клинического материала для исследования, их упаковку и транспортирование осуществляет медицинский персонал в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых и методических документов по безопасности работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности), по порядку учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности.

Клиническим материалом для отбора проб, предназначенных для дальнейшего исследования на бруцеллез, от лиц с подозрением на бруцеллез, больных людей в зависимости от клинической формы болезни являются: кровь, костный мозг, спинномозговая жидкость, пунктат из лимфатических узлов, моча, желчь, суставная жидкость (при артритах), гной (при абсцессах), мокрота, грудное молоко.

Материал от больных с подозрением на бруцеллез отбирают при поступлении больного до начала антибиотикотерапии.

При всех формах болезни берут кровь в объеме 10—15 мл с учетом необходимости проведения бактериологических, серологических исследований и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Непосредственно у постели больного 10 мл крови засевают в две емкости с бифазной средой для выделения гемокультуры или по 5 мл вносят иглой через предварительно обработанную спиртом резиновую пробку во флаконы с жидкой питательной средой для транспортирования материала и накопления бруцелл, использование которой позволяет совместить этапы транспортирования материала в лабораторию и подращивания бруцелл.

Кровь у больного берут натощак из локтевой вены в количестве 5—10 мл, соблюдая правила асептики, шприцем или с использованием вакуумной системы: с активатором сыворотки – для иммунологических исследований и с цитратом натрия или ЭДТА – для ПЦР. При взятии крови шприцем для получения сыворотки и предотвращения гемолиза пробирку с кровью оставляют при комнатной температуре в скошенном положении до образования сгустка. Полученную сыворотку отбирают в пластиковую пробирку, герметично закрывают и направляют в лабораторию для исследования на наличие специфических антител к возбудителю бруцеллеза.

Костный мозг получают путем пункции грудины шприцем с короткой и несколько затупленной иглой. Полученный костный мозг (в количестве нескольких капель) засевают в пробирку на питательные среды.

Спинномозговую жидкость отбирают после пункции поясничной области в количестве 0,1—0,3 мл и засевают на питательные среды.

Пробу мокроты, полученную в результате глубокого кашля, собирают в специальный стерильный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой.

Пунктат из лимфатических узлов, материал, отобранный из полости сустава (синовиальная жидкость), гной (при абсцессах) после взятия вносят иглой через предварительно обработанную спиртом резиновую пробку во флаконы с жидкой питательной средой для транспортирования материала и накопления бруцелл или в стерильную одноразовую пробирку.

При исследовании мочи собирают ее среднюю порцию (10—20 мл) в специальный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой.

Пробы желчи (среднюю порцию) собирают при зондировании в процедурном кабинете. Над пламенем спиртовки открывают пробирку для сбора материала, полученную желчь (10—12 мл) помещают в одноразовую стерильную пробирку с завинчивающейся пробкой. При использовании стерильной стеклянной пробирки, закрытой газопроницаемой пробкой, после наполнения емкости обжигают горлышко и пробку в пламени спиртовки, закрывают пробирку. При использовании пробирки с газопроницаемой пробкой пробу доставляют в лабораторию в строго вертикальном положении, чтобы не замочить пробку желчью.

Отобранный клинический материал засевают на питательные среды по методу Кастанеда или на питательную среду для накопления бруцелл.

При обследовании больных, прошедших курс лечения антибиотиками, через 1 месяц и спустя 4—6 месяцев после окончания курса антибиотикотерапии, а также больных хронической формой бруцеллеза в период обострения перед началом лечения рекомендуется проводить посевы крови, пунктатов костного мозга и лимфатических узлов на специальную питательную среду для выделения L-форм бруцелл.

Материалом для исследования методом ПЦР являются: кровь, сыворотка крови, пунктат из лимфатических узлов, синовиальная жидкость. Забор, транспортирование и хранение биологического материала для проведения ПЦР осуществляют в соответствии с действующими методическими указаниями по организации работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности.

9.1.2. Отбор и транспортирование проб сырья животного происхождения и объектов окружающей среды

Отбор проб сырья животного происхождения и объектов окружающей среды проводят с целью установления источника, факторов и путей передачи инфекции, условий, способствующих заражению, а также для организации и проведения санитарных мероприятий по локализации и ликвидации очага инфекции.

Отбор материала, его упаковка и транспортирование осуществляется с соблюдением требований безопасности работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями I—II группы патогенности (опасности).

Отбор и транспортирование проб полевого материала и сырья животного происхождения для лабораторного исследования на бруцеллез осуществляют в соответствии с нормативными правовыми и методическими документами по организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности, рекомендациями по правилам перевозки инфекционных материалов (*WHO/HSE/EPR*/2008.10), а также согласно действующим нормативным документам (ГОСТ) в зависимости от вида продукции.

9.1.3. Упаковка проб

Пробы упаковывают согласно рекомендациям по правилам перевозки инфекционных материалов 2009—2010 (*WHO/HSE/EPR*/2008.10) с соблюдением принципа тройной упаковки. Материалы помещают в первичный контейнер (водонепроницаемый герметичный), который упаковывается в достаточное количество адсорбирующего материала, чтобы в случае повреждения контейнера адсорбировать всю жидкость. Вторичная упаковка (прочная, водонепроницаемая, герметичная), которая закрывает и защищает первичный контейнер (первичные контейнеры), упакованный в адсорбирующий материал. Вторичную упаковку помещают в наружную упаковку для транспортирования с достаточным количеством амортизирующего материала. Наружную упаковку, минимальные размеры которой должны быть не менее 10 × 10 см, опечатывают, маркируют необходимое положение груза стрелками или надписью «верх, осторожно». Недопустимо помещение сопроводительных документов в тару с пробами. Материал с направлением доставляют в специализированную лабораторию специально выделенным транспортом в сопровождении медицинского работника.

9.2. Методы выделения возбудителя и его растворимых антигенов

9.2.1. Бактериологический метод

Работа по выделению и дифференциации бруцелл из исследуемого материала должна проводиться в условиях, исключающих возможность инфицирования персонала и обсеменения возбудителем объектов окружающей среды, в строгом соответствии с требованиями нормативных правовых и методических документов по безопасности работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности).

Характерной особенностью представителей рода *Brucella* является медленный рост на питательных средах, особенно в первых генерациях. При посевах крови, костного мозга и мочи культуры бруцелл обнаруживаются через 5—10 дней, а иногда через 20—30 дней после посева. При этом первые генерации культур *B. abortus* и *B. ovis* способны расти только при наличии в атмосфере повышенного содержания углекислого газа (5—10 %). *B. abortus* 5-го, 6-го и 7-го биоваров могут расти в обычных аэробных условиях.

Для выделения культур бруцелл рекомендуются следующие среды: сывороточно-декстрозный агар, агар из картофельного настоя с добавлением сыворотки и кровяной агар (5 % овечьей крови в среде), *Albimi*-агар, среда «Д», печеночные и мясопептонные агары и бульоны (pH сред – 6,8—7,2). Рецепты приготовления сред приведены в прилож. 2. В настоящее время в практике широко используется коммерческая среда для выделения бруцелл – эритрит агар. Данная среда является высокоэффективной для выделения первой генерации возбудителя, однако при последующих пересевах на этом агаре изучаемая культура бруцелл может диссоциировать.

Посевы следует производить на предварительно проверенные питательные среды. Проверку сред осуществляют согласно нормативным правовым и методическим документам по контролю диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза.

9.2.1.1. Исследование крови и другого биологического материала.

Посевы крови рекомендуется делать во время лихорадочного состояния больного, так как в этот период наблюдается наибольший процент выделения культур. Однако не исключена возможность получения гемокультуры и при нормальной температуре больного. Кровь для посева следует брать до лечения антибиотиками. Посевы крови рекомендуется проводить во флаконы емкостью 100—200 мл, в которые наливают по 30—50 мл питательного агара. После стерилизации их укладывают так, чтобы агар застыл на одной из сторон флакона. Затем в каждый

флакон стерильно добавляют по 25—30 мл предварительно простерилизованного бульона и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 2—3 суток (агар с бульоном может быть использован не позднее 5—7 дней). Кровь в количестве не менее 10 мл стерильно берут шприцем из локтевой вены и засевают по 5 мл в два флакона. Один из флаконов инкубируют при повышенном содержании CO_2 (5—10 %), а другой – в обычных условиях. Начиная с четвертого дня после посева, флаконы просматривают и при отсутствии роста культуры поверхность агара орошают бульоном. При положительном результате на поверхности агара появляются колонии бруцелл. Если в течение месяца бруцеллы не обнаруживаются, то в этом случае делают контрольный высев из бульона на твердую питательную среду.

В последнее время в практике работы бактериологических лабораторий применяется питательная среда жидкая для транспортирования биоматериала и накопления бруцелл. Использование ее позволяет совместить этапы транспортирования крови в лабораторию и подращивания нативного материала. Исследуемая кровь в количестве 5 мл, взятая шприцем стерильно из локтевой вены больного, вносится той же иглой во флаконы со средой через предварительно обработанную спиртом резиновую пробку. Хранить засеянные флаконы до отправки можно в течение 2 недель в зависимости от конкретных условий: в термостате, при комнатной температуре или в холодильнике. В бактериологической лаборатории содержимое флакона высевают на плотные питательные среды или во флаконы для выращивания по методу Кастанеда, после чего один флакон помещают в термостат при температуре 37 °С на 7—10 суток в условиях избыточного содержания CO_2, а другой – при обычных условиях. При появлении на поверхности агара колоний бруцелл, последние снимают петлей и пересевают на плотные питательные среды для дальнейшего изучения.

При бактериологическом обследовании больных, прошедших курс лечения антибиотиками, через 1 месяц и спустя 4—6 месяцев после окончания курса антибиотикотерапии, а также больных хронической формой бруцеллеза в период обострения (особенно при субфебрильной температуре) перед началом лечения рекомендуется проводить посевы крови, пунктатов костного мозга и лимфатических узлов на специальные питательные среды для выделения бруцелл в L-форме (прилож. 2).

Способ бактериологического посева материала для выделения L-культур идентичен методу выделения бактериальных гемокультур. Посевы выдерживаются в термостате не менее 35—40 дней.

Бруцеллы можно выделить также из костного мозга, мочи, спинномозговой жидкости, экссудата из бурситов, грудного молока, желчи, мокроты, трупного материала. Посевы производят на твердые и жидкие питательные среды. В случаях исследования загрязненного материала для задержки роста посторонней микрофлоры в среду следует добавлять генцианвиолет из расчета 1 : 200 000. С этой целью также добавляют антибиотики, в частности полимиксин В – 3 мкг/мл и амфоглюкамин – 3 мкг/мл.

9.2.2. Биологический метод

Для выделения бруцелл из материала, загрязненного посторонней микрофлорой, и при малой концентрации бруцелл в исследуемом материале используются биопробные животные – морские свинки (массой 300—350 г) или белые мыши (массой 17—18 г). Исследуемый материал вводят подкожно в паховую область в дозах не более 0,5 мл для мышей и 1 мл для морских свинок.

Вскрытие белых мышей проводится через 20—25 дней, морских свинок – через 30—35 дней после введения исследуемого материала. Перед вскрытием у свинок следует взять кровь из сердца для исследования сыворотки в реакции агглютинации на наличие специфических антител. Для посевов у морских свинок берут лимфатические узлы (регионарные к месту введения исследуемого материала): паховый, подчелюстной, шейный, парааортальный, кусочки селезенки, печени, костный мозг, кровь, мочу; у белых мышей – лимфатические узлы: паховый, акселярный, парааортальный, подчелюстной, кусочки селезенки и печени. Лимфатические узлы, кусочки печени и селезенки помещают в стерильную чашку. Костный мозг для посева берут пипеткой из рассеченной бедренной кости. Посевы крови из сердца, а также мочи и костного мозга проводят стерильной пипеткой непосредственно на питательные среды (агар и бульон). Лимфатические узлы животных перед посевом рекомендуется надсекать ножницами. После этого каждый лимфатический узел и кусочки органов берут «уколом» стерильной деревянной палочки (палочка должна быть длиной 25—30 см, диаметром 4—5 мм с гладкой поверхностью и несколько заостренным концом) и вносят первоначально в пробирку с агаром, где той же палочкой материал раздавливают и тщательно втирают в поверхность питательной среды. Затем остатки посевного материала переносят в пробирку с бульоном. После использования палочки погружают на 1 ч в дезинфицирующий раствор (3%-й раствор перекиси водорода) или кипятят в воде 40 мин, после чего тщательно промывают, стерилизуют для последующего использования. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37 °С 20—25 дней.

Просмотр посевов в пробирках с агаром и бульоном проводят каждые 3—4 дня, из помутневших бульонов делают высевы в пробирки со скошенным агаром.

Результат исследования оценивается положительно при выделении хотя бы одной колонии бруцелл из организма животного или при выявлении специфических антител в сыворотках крови животных в РА в титре не менее 1 : 20.

Для выделения бруцелл в L-форме морских свинок рекомендуется вскрывать на 7-е, 14-е и 30-е сутки после введения исследуемого материала, так как вероятность получения изолятов в L-форме на 7-е, 14-е сутки выше, чем на 30-е сутки.

9.2.3. Методы идентификации бруцелл

Для определения принадлежности выделенных культур к роду *Brucella* используют следующие методы: изучение морфологии колоний, микроскопия окрашенных препаратов по Граму или Козловскому, люминесцентная микроскопия и проба со специфической сывороткой в реакции агглютинации на стекле, выявление родоспецифичных локусов методом ПЦР, ИФА.

Морфология колоний. Колонии бруцелл на агаре бесцветны, выпуклы (холмиком) с гладкой поверхностью, гомогенны, иногда с нежной зернистостью в центре колонии. С возрастом нежные и прозрачные колонии постепенно мутнеют. В падающем свете белесоватые, в проходящем – янтарно-желтого цвета.

Величина колоний может быть различной. Наряду с крупными, достигающими в диаметре 3—4 мм и больше, могут быть очень мелкие – точечные колонии диаметром 0,1—0,05 мм. Различные факторы (pH питательной среды, влажность, наличие бактериофага в культуре и др.), влияющие на биологию культуры, могут привести также к изменению внешнего вида колоний (встречаются зернистые, стекловидные колонии, растущие в толще агара, эрозированные, сухие, слизистые, радиально исчерченные и др.).

Для изучения структуры колоний целесообразно использовать стереоскопическую лупу, обычный световой микроскоп с объективом наименьшего увеличения.

Микроскопия окрашенных препаратов. При окраске по Граму бруцеллы окрашиваются в красный цвет (грамотрицательны). Окрашивание препаратов по способу Козловского: фиксированные препараты окрашивают 0,5%-м водным раствором сафранина при подогревании до появления пузырьков, промывают дистиллированной водой и докрашивают 0,5%-м водным раствором малахитовой или бриллиантовой зелени

в течение 40—50 с. Бруцеллы сохраняют красную окраску сафранина. Другие бактерии окрашиваются в зеленый цвет.

Проба со специфической сывороткой. Для предварительной, быстрой идентификации культуры ставят реакцию агглютинации на стекле. На предметное стекло наносят каплю бруцеллезной поливалентной сыворотки, разведенной 1 : 25 0,9%-м раствором натрия хлорида, в которой эмульгируют одну петлю исследуемой культуры. В положительных случаях быстро (в течение 1 мин) наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев, в отрицательных – суспензия остается гомогенной. Для контроля исследуемую культуру эмульгируют в капле нормальной кроличьей сыворотки или 0,9%-м растворе натрия хлорида.

Люминесцентная микроскопия (см. раздел 9.5.2 «Метод флуоресцирующих антител (МФА)»).

Полимеразная цепная реакция (см. раздел 9.5.6 «Полимеразная цепная реакция (ПЦР)»).

Иммуноферментный анализ (см. раздел 9.5.4 «Иммуноферментный анализ (ИФА)»).

9.2.4. Методы идентификации L-форм бруцелл

Для определения принадлежности выделенных L-культур к роду *Brucella* используют следующие методы: изучение характера роста и морфологии колоний, микроскопия нативных препаратов, проба со специфической сывороткой в реакциях слайд-агглютинации и объемной РА, а также ПЦР-анализ.

Характер роста и морфология L-форм бруцелл. Бруцеллы в L-форме могут быть изолированными или в виде нежного сплошного налета. На плотных питательных средах формируются колонии различного размера: мелкие 0,5—2 мм и крупные до 5 мм, круглые, янтарно-желто-го цвета в проходящем и серо-голубоватого в падающем свете, имеют, слизистую или крошковатую консистенцию, часто врастают в агар, плохо снимаются петлей. При просмотре через стереоскопическую лупу L-колонии могут иметь вид «яичницы» – плотный центр и ажурные светлые края.

Микроскопия нативных препаратов. Для изучения морфологии L-клеток отбирают характерные колонии и готовят нативные препараты: на предметное стекло наносят каплю 0,9%-го раствора натрия хлорида, в которой эмульгируют одну петлю исследуемой культуры, закрывают покровным стеклом, края заливают парафином и просматривают в световом микроскопе в фазовом контрасте с иммерсией.

По морфологии L-формы бруцелл представляют собой полиморфные клетки в виде шаров, грушевидных и неправильной формы тел от 1 до 6 мкм с цитоплазмой разной оптической плотности с вакуолями и зернистостью. Зерна-гранулы могут располагаться внутри крупных клеток, или находиться в виде свободных зернистых масс. В препарате могут находиться гетероморфные клетки от 0,2 до 0,5 мкм или близкие по морфологии к S-формам бруцелл.

Проба со специфической сывороткой. L-культуры бруцелл сохраняют антигенное родство с исходными штаммами бруцелл. Для предварительной быстрой идентификации L-культур бруцелл ставят реакцию агглютинации на стекле со специфической агглютинирующей поливалентной сывороткой в разведении 1 : 25. Необходимо учитывать, что L-культуры бруцелл очень плохо эмульгируются, что затрудняет учет реакции. Рекомендуется сначала петлю культуры тщательно растереть стеклянной палочкой в небольшом количестве 0,9%-го раствора натрия хлорида и после этого каплю эмульсии перенести в каплю специфической сыворотки на предметном стекле и параллельно в каплю нормальной кроличьей сыворотки или 0,9%-го раствора натрия хлорида в качестве контроля.

Для дальнейшего изучения бруцелл в L-форме необходимо проводить их реверсию на питательных средах без трансформирующего агента или на лабораторных животных.

9.2.5. Методы дифференциации бруцелл

После идентификации культуры бруцелл проверяют на диссоциацию с применением следующих тестов: проба с трипафлавином, реакция термоагглютинации (проба с нагреванием), проба Уайт-Вильсона. Дифференциации подлежат культуры бруцелл, находящиеся только в S-форме.

Проба с раствором трипафлавина. На предметное стекло наносят каплю солевого (0,85%-го) раствора трипафлавина 1 : 500, в котором эмульгируют испытуемую культуру. У диссоциированных культур через 1—2 минуты наступает агглютинация с образованием хлопьев. Взвесь из культур в S-форме остается гомогенной.

Реакция термоагглютинации. Двухсуточную культуру бруцелл в 0,9%-м растворе натрия хлорида в количестве 2—3 мл 1×10^9 м.к./мл прогревают в пробирке на водяной бане при температуре 90 °С в течение 30 мин. Результаты учитывают через 30 мин, 1 ч и окончательно через 24 ч пребывания при комнатной температуре. В эти сроки при наличии диссоциации наступает ясно выраженная агглютинация клеток бруцелл, тогда как суспензия недиссоциированных (S) штаммов остается гомогенной.

Проба Уайт-Вильсона. Проба основана на способности диссоциированных колоний окрашиваться красителем кристаллическим фиолетовым. Для постановки пробы на агаровую пластинку со средой Альбими проводят посев взвеси исследуемой культуры в концентрации, позволяющей получить изолированные колонии. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 2—4 суток. Когда сформируются колонии на поверхность агара наливают раствор кристаллического фиолетового в разведении 1 : 2 000 (водный раствор) и выдерживают в течение 5 мин, после чего краску отбирают при помощи пипетки. Колонии культур после окрашивания просматривают с помощью лупы или стереоскопического микроскопа. При этом S-колонии остаются неокрашенными, а диссоциированные принимают окраску красителя: от темно-фиолетового до светло-синего.

Тестами дифференциации бруцелл являются способность бруцелл к росту в присутствии повышенного содержания углекислого газа (CO_2), образование сероводорода (H_2S), устойчивость к красителям – фуксину и тионину, способность агглютинироваться бруцеллезными моноспецифическими сыворотками (анти-М, анти-А), отношение к бруцеллезному бактериофагу «Тб», а также *Wb*, *Fi*, *Bk2*.

Отношение к избыточному содержанию CO_2. Культуры бруцелл видов *B. suis* и *B. melitensis* растут в аэробных условиях, тогда как *B. abortus, B. ovis* и *B. pinnipedialis* удается выделить лишь в присутствии повышенного содержания углекислого газа (5—10 %). При последующих пересевах культуры *B. abortus* утрачивают способность расти при повышенном содержании CO_2 и растут в обычных условиях (прилож. 3).

Дифференциация по способности образования сероводорода. В качестве реактива для постановки теста применяют водный раствор уксусно-кислого свинца, которым пропитывают полоски фильтровальной бумаги размером 1 × 8 см. Затем полоски просушивают. Заготовленные впрок сухие полоски фильтровальной бумаги хранят в емкости из темного стекла с притертой пробкой не более 1—2 месяцев.

Взвесь испытуемой культуры в 0,9%-м растворе натрия хлорида ($1,7 \times 10^9$ мкл в 1 мл) засевают стандартной петлей (2 мм) на скошенную поверхность печеночного агара (pH – 6,8—7,2). Затем полоску фильтровальной бумаги, импрегнированную уксуснокислым свинцом, зажимают между пробиркой и ватной пробкой так, чтобы нижний ее конец свободно свисал над верхним краем посева и не касался агаровой среды. Ватная пробка должна быть рыхлой, не задерживать выхода газа из пробирки. Пробирки с посевами ставят в термостат при температуре 37 °С.

Показателем интенсивности образования сероводорода является почернение нижнего, свисающего над посевом, конца полоски фильтровальной бумаги. Почернение полоски фильтровальной бумаги измеряется в миллиметрах.

Результаты учитываются через 2 дня в течение 6 дней. При каждом учете потемневшую полоску фильтровальной бумаги заменяют новой. Для окончательной оценки способности культуры к образованию сероводорода все показатели складывают.

Для *B. suis* (биовар 1) суммарный показатель образования сероводорода равен 12—20 мм, для *B. abortus* (биовар 1), *B. inopinata* – около 5—7 мм. *B. Melitensis* (биовар 1) не образует сероводорода или вызывает только легкое потемнение свинцовой бумажки. У штаммов *B. neotomae* показатель образования сероводорода в среднем равен 5—8 мм. Культуры *B. ovis, B. canis, B. pinnipedialis, B. ceti, B. microti* – сероводород не образуют.

Дифференциация по редуцирующей активности в отношении красок. Для постановки теста рекомендуется применять твердые питательные среды (агар Альбими, мясо-пептонный агар) и краски – основной фуксин и тионин, предварительно оттитрованные по отношению к референтным штаммам бруцелл трех основных видов (*B. melitensis, B. abortus, B. suis*). Концентрация фуксина – 1 : 50 000, тионина – 1 : 50 000.

При отсутствии стандартных оттитрованных красок их рабочие дозы можно оттитровать с использованием референтных штаммов бруцелл. Для этого испытуемые краски добавляют к среде в различных концентрациях. Концентрация красок в среде, с которой получается четкая дифференциация референтных штаммов бруцелл (*B. melitensis* 16 M, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330), и являются рабочей дозой данной краски. Основные растворы фуксина и тионина готовят в концентрации 1 : 1000 (0,1 г краски, 20 мл 96%-го спирта и 80 мл дистиллированной воды). Флаконы с краской хранят в темном месте в течение 6—10 месяцев. Готовят питательную среду с краской следующим образом: к 100 мл охлажденного до температуры 45—50 °С агара стерильно добавляют 2 мл основного раствора краски для получения концентрации 1 : 50 000.

Питательную среду с краской разливают по 20—25 мл в каждую чашку Петри. Затем среду подсушивают, не открывая чашки. Среды с красками пригодны для работы в течение 10—15 дней при хранении в холодильнике (4 °С). Обесцвеченные среды применять нельзя.

Взвесь бруцелл готовят из двухсуточной агаровой культуры. Посевы референтных и испытуемых штаммов проводят петлей диаметром 2 мм из взвеси, содержащей в 1 мл 1,7 млрд микробных клеток (по стан-

дарту мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России 10 единиц (ОСО 42-28-85П). Одну петлю такой взвеси засевают штрихом на поверхность агара. На чашку можно одновременно засевать 4—6 культур, предварительно разделив чашку Петри на 4—6 секторов. Посевы помещают в термостат при температуре 37 °С. Учет результатов проводят через трое суток инкубации.

Схема учета:

– интенсивный рост по всему штриху – 4+;

– интенсивный рост в начале и более слабый в конце штриха – 3+;

– менее интенсивный в начале или слабый рост по всему штриху – 2+;

– очень слабый рост по ходу штриха или отдельные колонии – +.

Оценка результатов (прилож. 3).

Реакция агглютинации с бруцеллезными моноспецифическими сыворотками (анти-А, анти-М). Моноспецифическую сыворотку последовательно разводят до ее предельного титра (1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 и т. д. в объеме 0,5 мл). В качестве антигена применяют суспензию двухсуточной агаровой культуры изучаемого штамма в разведении до $1{,}7 \times 10^9$ м.к. в 1 мл физиологического раствора (по стандарту мутности 10 единиц (ОСО 42-28-85П). Для разведения сыворотки и антигена применяют 0,9%-й раствор натрия хлорида, pH 7,0. Антиген добавляют по 0,5 мл во все пробирки. Разведение сыворотки удваивается (1 : 10, 1 : 20 и т. д.).

Реакцию ставят с двумя контролями: а) контроль с референтным штаммом *B. Melitensis* 16 М; б) контроль с референтным штаммом *B. abortus* 544. Пробирки со смесью сыворотки и антигена выдерживают в термостате при температуре 37 °С 18—20 ч, а затем в течение 2 ч при комнатной температуре. После этого проводят учет реакции. Реакция считается положительной, начиная с разведения сыворотки 1 : 20, но не менее чем на два креста.

Для культур бруцелл вида *B. ovis* и *B. canis*, а также для культур других видов и биоваров бруцелл, находящихся в R-форме, для реакции агглютинации используют R-сыворотку. Техника постановки реакции аналогична. Используется 0,9%-й раствор натрия хлорида на фосфатном буфере, pH 8,2—8,4.

Определение чувствительности культур бруцелл к бактериофагу. Для постановки теста используется бруцеллезный бактериофаг «Тб», избирательно лизирущий бруцеллы вида *abortus*, находящиеся в S-форме.

Исследуемую культуру бруцелл рассевают на одну из сред: агар Альбими (pH 7,2 ± 0,1), печеночный агар (pH 7,2 ± 0,1), эритрит-агар (pH 7,2 ± 0,1). Через 48 ч инкубации при температуре 37 °С готовят взвесь

агаровой культуры исследуемого штамма в 0,9%-м растворе натрия хлорида до конечной концентрации $1,7 \times 10^9$ м.к./мл. Концентрацию бруцеллезного микроба определяют по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц (ОСО 42-28-85П), эквивалентного $1,7 \times 10^9$ м.к. бруцелл/мл.

Путем последовательных десятикратных разведений бактериофаг титруют в бульоне Альбими до диагностического титра разведения (ДТР).

На предварительно подсушенные пластины агара Альбими в чашках Петри наносят 0,2 мл взвеси исследуемого штамма и покачиванием равномерно распределяют по поверхности агара. Засеянные чашки подсушивают в течение 1 ч, после чего бактериологической петлей диаметром 2 мм (по одной петле) или пастеровской пипеткой (по одной капле) наносят на газон бактериофаг в ДТР. Чашки быстро наклоняют и капли бактериофага стекают по дорожке. Места нанесения капель и путь стекания капли можно заранее расчертить карандашом на внешней стороне дна чашки.

После подсыхания нанесенных капель чашки переворачивают и инкубируют в течение 48 ч при температуре 37 °С.

Учет результатов. Регистрация результатов проводится по выраженности лизиса в месте нанесения бактериофага.

Лизис оценивают по четырехкрестовой системе:

– четыре креста (++++) – сливной (полный) лизис культур с прозрачным дном литического пятна;

– три креста (+++) – прозрачное пятно с единичными колониями вторичного роста или множество изолированных литических пятен;

– два креста (++) – прозрачное пятно лизиса со значительным вторичным ростом или единичные изолированные литические пятна;

– один крест (+) – полупрозрачное слабо заметное литическое пятно;

– отрицательный результат (–) – отсутствие литического пятна.

Оценка результатов. Положительной считают пробу при лизисе не менее чем на два креста. В качестве контролей рекомендуются референтные штаммы *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544 и *B. suis* 1330.

Для постановки данного теста может быть рекомендовано применение набора бруцеллезных диагностических бактериофагов (Тбилиси (Тб), *Weybridge* (*Wb*), *Firenze* (*Fi*), *Berkley* (*Bk2*), проявляющих различную степень литической активности в отношении штаммов бруцелл различных видов. При этом бруцеллы вида *B. abortus* лизируются всеми четырьмя бактериофагами; *B. melitensis* – только бактериофагом *Bk2*; *B. suis* – *Bk2* и *Wb*; *B. pinnipedialis* и *B. ceti* – *Wb*, *Fi*, *Bk2*; бактериофаг Fi

лизирует культуры *B. abortus*, *B. neotomae* и частично *B. suis*. Культуры *B. ovis* и *B. canis* фагами не лизируются.

Для ускорения анализа можно использовать диски фильтровальной бумаги, импрегнированные бактериофагами, которые помещают на газон исследуемой культуры на плотной питательной среде.

Дифференциальные свойства видов и биоваров рода *Brucella* представлены в прилож. 3.

9.2.6. Иммунологические и молекулярно-генетические тесты выявления бруцелл и их растворимых антигенов

Данная группа тестов, основана на регистрации иммунологического взаимодействия специфического бруцеллезного антигена и антител (метод флуоресцирующих антител, РНГА, РНАт, ИФА. Молекулярно-генетический метод ПЦР основан на амплификации специфического, маркерного для бруцелл определенного вида фрагмента ДНК-мишени. Техника постановки этих методов изложена в соответствующих разделах.

9.3. Методы выявления специфических антител

Для диагностики бруцеллеза рекомендуется применять несколько методов, которые используются в зависимости от целей исследования.

При проведении эпидемиологического расследования в очагах бруцеллеза для обследования населения рекомендуется использовать: реакцию агглютинации – пластинчатая (Хеддлсона), РА, РНГА, ИФА, непрямой иммунофлуоресцентный метод, аллерготесты (кожно-аллергическая проба Бюрне, реакция лизиса лейкоцитов, определение экспрессии на базофилах рецепторов CD63 методом проточной цитометрии).

При обследовании населения перед профилактической вакцинацией целесообразно использовать пластинчатую реакцию агглютинации (Хеддлсона), РНГА или ИФА и аллерготесты (кожно-аллергическая проба Бюрне, реакция лизиса лейкоцитов, определение экспрессии на базофилах рецепторов CD63 методом проточной цитометрии).

Для диагностики острого и подострого бруцеллеза проводят бактериологические и серологические исследования (РА, РНГА, ИФА). В случаях отрицательного результата используют постановку реакции Кумбса и ИФА.

Для диагностики хронического бруцеллеза и при проведении диспансерного наблюдения за переболевшими бруцеллезом рекомендуется постановка реакции Кумбса, ИФА и аллергических тестов.

Серологические реакции и аллергические пробы по своему диагностическому значению в различные периоды заболевания не равноценны,

вследствие чего не могут заменять друг друга. Это обусловливает необходимость применения комплексного серо-аллергологического метода, являющегося наиболее надежным способом диагностики бруцеллеза.

В ранние сроки от начала заболевания (первые 6 месяцев) диагностическая ценность серологического метода выше, чем аллергического. Серологические реакции в этот период оказываются положительными почти в 98 % случаев. По мере удлинения срока заболевания процент положительных серологических реакций (РА, РНГА) уменьшается. В поздние периоды заболевания большую диагностическую ценность имеет реакция Кумбса, ИФА и аллергическая проба.

При проведении обследования нужно учитывать следующую особенность: титры антител почти всегда указывают на наличие инфекции, антитела в низких титрах или их полное отсутствие не исключают возможности заболевания. В связи с этим рекомендуется проводить повторные исследования с интервалом 1—2 недели, особенно при подозрении на острую форму бруцеллеза.

Следует иметь в виду, что положительную реакцию агглютинации с бруцеллезным антигеном могут давать также сыворотки, содержащие антитела к микроорганизмам, имеющим общие антигенные детерминанты с бруцеллами (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*).

9.3.1. Пластинчатая реакция агглютинации (реакция Хеддлсона)

Преимущество реакции заключается в простоте постановки, быстром получении результата и высокой чувствительности. В качестве антигена для постановки реакции применяют единый бруцеллезный диагностикум. Реакцию ставят на обычном, тщательно вымытом, обезжиренном стекле, расчерченном на квадраты величиной 4 × 4 см каждый, по горизонтали должно быть 5 квадратов. На первом квадрате с левой стороны записывается номер испытуемой сыворотки, в последующие квадраты слева направо разливают (микропипеткой или градуированной пипеткой объемом 1 мл) испытуемую сыворотку в следующих дозах: 0,04, 0,02, 0,01 и 0,03 (контроль сыворотки). К первым трем дозам сыворотки добавляют по 0,03 мл антигена. К последней дозе сыворотки (0,03) добавляют 0,03 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. Сыворотку осторожно смешивают с антигеном палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. Контроль антигена ставят, добавляя 0,03 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида к 0,03 мл антигена. Затем стекло слегка подогревают над пламенем спиртовки так, чтобы происходило равномерное нагревание всей поверхности стекла.

При положительной реакции в первые же минуты в каплях сыворотки с антигеном появляются хлопья (агглютинат). Максимальный срок наблюдения 8 мин. Контроль сыворотки ставят с каждой испытуемой сывороткой для исключения спонтанной агглютинации. Контроль антигена ставят один (при любом числе испытуемых сывороток) для исключения спонтанной агглютинации применяемого антигена.

Учет реакции проводят визуально по следующей схеме:

а) полное просветление жидкости с крупными и мелкими хлопьями, т. е. 100 % агглютинации (4+);

б) почти полное просветление жидкости с ясно заметными хлопьями, т. е. 75 % агглютинации (3+);

в) незначительное просветление жидкости с заметными хлопьями, т. е. 50 % агглютинации (2+);

г) мутная жидкость с едва заметной зернистостью (+);

д) равномерная мутная жидкость (–).

Для *оценки результатов* рекомендуется следующая схема:

а) агглютинация на 4+ во всех дозах сыворотки – результат «резко положительный»;

б) агглютинация не менее 2+ во всех дозах сыворотки – результат «положительный»;

в) агглютинация только в первой или в первой и второй дозах сыворотки – результат «сомнительный»;

г) отсутствие агглютинации во всех дозах сыворотки – реакция «отрицательная».

Для диагностики бруцеллеза имеет значение только положительный результат реакции. При сомнительном или отрицательном результатах реакции и наличии эпидемических и эпизоотических показаний, а также в стационаре и при обследовании доноров, когда необходимо определение титров агглютининов и их динамики, следует применять реакции Райта и Кумбса, РНГА и ИФА.

9.3.2. Реакция агглютинации в пробирках (реакция Райта)

Наибольшую диагностическую ценность реакция агглютинации Райта представляет при острой и подострой формах бруцеллеза. В качестве антигена для постановки РА используют диагностикум бруцеллезный жидкий для РА.

Техника постановки реакции

В пробирки разливают 0,9%-й раствор натрия хлорида: во вторую – 2,4 мл, в остальные по 0,5 мл. Во вторую пробирку добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки, перемешивают, переносят 0,5 мл в третью пробирку и т. д. Из последней пробирки 0,5 мл смеси удаляют, в результате

получают в каждой пробирке по 0,5 мл следующих разведений 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 и т. д. Из второй пробирки 0,5 мл исследуемой сыворотки, переносят в первую пробирку (контроль сыворотки в разведении 1 : 50), а 1,0 мл удаляют в дезинфицирующий раствор, во второй пробирке должно остаться 0,5 мл исследуемой сыворотки.

Диагностикум разводят 0,9 %-м раствором натрия хлорида согласно прилагаемой к нему инструкции по применению и добавляют по 0,5 мл во все пробирки, кроме контроля. После добавления диагностикума разведение сыворотки соответственно удваивается, т. е. получается 1 : 50, 1 : 100 и т. д. Сыворотки с антигеном смешивают путем встряхивания и помещают в термостат 37 °С на 18—20 ч. После инкубации пробирки выдерживают 1—2 часа при комнатной температуре и проводят учет реакции по стандарту мутности в зависимости от степени осаждения агглютината и просветления жидкости.

Для приготовления стандарта мутности антиген, применяемый для постановки РА, еще раз разводят в два раза.

Дальнейшее разведение антигена 0,9%-м раствором натрия хлорида проводят в соответствии с табл. 1.

Таблица 1

Разведение антигена 0,9%-м раствором натрия хлорида

	Степень агглютинации				
	++++	+++	++	+	–
Антиген, разведенный 1 : 2	0	0,25	0,5	0,75	1,0
0,9%-й раствор натрия хлорида	1,0	0,75	0,5	0,25	0
% просветления	100	75	50	25	0

Стандарт мутности готовят каждый раз при постановке РА и ставят в термостат одновременно с основной реакцией.

Титром сыворотки является максимальное ее разведение, дающее 50 % агглютинации, – просветление, оцениваемое на 2+.

При применении стандартизированного диагностикума титры исследуемых сывороток соответствуют количеству международных единиц антител (МЕ/мл).

Так, титры 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 и т. д. соответственно равны 50, 100, 200 и т. д. МЕ/мл.

При диагностической оценке РА рекомендуется следующая схема:

– титр сыворотки 1 : 100 (100 МЕ/мл) – результат положительный;

– титр сыворотки 1 : 200 (200 МЕ/мл) – результат положительный;

– титр сыворотки 1 : 400 (400 МЕ/мл) – результат резко положительный.

Диагностическим титром принято считать реакцию агглютинации не менее 2+ при разведении сыворотки 1 : 100 и выше.

9.3.3. Антиглобулиновая проба (реакция Кумбса)

В диагностике бруцеллеза у людей, особенно при хроническом течении инфекции, когда реакция агглютинации может быть отрицательной или положительной в низких титрах, важное место отводится выявлению неполных антител. При постановке реакции Кумбса используют предварительно оттитрованную антиглобулиновую сыворотку против глобулинов человека.

Техника постановки РК

В начале ставят реакцию Райта. После учета реакции агглютинации (через 20 ч) берут не менее трех пробирок первых разведений при отрицательном результате реакции агглютинации или не менее трех пробирок, начиная со слабоположительного результата (+, ++). Эти пробирки центрифугируют при 3 000 об./мин в течение 20 мин для осаждения комплекса антигена с неполными антителами. Надосадочную жидкость осторожно отбирают с помощью пастеровской пипетки и удаляют, затем в каждую пробирку наливают по 1 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида, тщательно встряхивают и снова центрифугируют. Таким образом, осадок промывают три раза. После последнего центрифугирования к осадку отмытого комплекса антигена с неполными антителами добавляют 0,5 мл антиглобулиновой сыворотки в рабочем титре, пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат при 37 °С на 18—20 ч. Учет реакции проводят так же, как при реакции агглютинации. Диагностическим титром РК считается агглютинация не менее 2+ в разведении сыворотки 1 : 50.

Для контроля антиглобулиновой сыворотки в опыт берут сыворотку, содержащую неполные антитела с известным титром.

Контроль антигена. Взвесь антигена в 0,9%-м растворе натрия хлорида подвергается отмыванию центрифугированием, как в основной реакции, после чего добавляют 0,5 мл антиглобулиновой сыворотки. При учете в контроле антигена наблюдается равномерное помутнение.

Схема титрования антиглобулиновой сыворотки для РК

Для титрования антиглобулиновой сыворотки (против глобулинов человека) необходимо иметь сыворотку крови человека, заведомо содержащую неполные антитела к бруцеллам в высоком титре. Титрование антиглобулиновой сыворотки проводят следующим образом. Вначале титруют положительную бруцеллезную сыворотку в реакции Райта. При этом делают приблизительно восемь рядов разведений сыворотки (табл. 2).

Таблица 2

Результаты реакции агглютинации

№ рядов	Разведения сыворотки, содержащей неполные антитела							
	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	1 : 6400
1	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
2	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
3	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
4	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
5	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
6	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
7	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
8	4+	4+	2+	–	–	–	–	–

После учета реакции агглютинации во всех рядах отбирают пробирки, в которых отсутствует агглютинация, в приведенном примере начиная с 1 : 400 (табл. 2) и в каждой из них отмывают антиген согласно методике постановки реакции Кумбса. Затем (табл. 3) делают несколько разведений титруемой антиглобулиновой сыворотки (в приведенном примере от 1 : 10 до 1 : 250) и добавляют по 0,5 мл каждого разведения этой сыворотки в один ряд пробирок с оставшимся после отмывания антигеном. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при температуре 37 °С. Результаты учитывают так же, как реакцию агглютинации. За титр антиглобулиновой сыворотки принимают ее наибольшее разведение (в приведенном примере 1 : 80 – 4 ряд), которое выявляет неполные антитела в максимальном титре (1 : 3 200). Для реакции Кумбса антиглобулиновая сыворотка применяется в удвоенном титре (1 : 40).

Таблица 3

Результаты реакции Кумбса

№ рядов	Разведение антиглобулиновой сыворотки	Разведения сыворотки, содержащей неполные антитела				
		1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400
1	1 : 10	4+	4+	4+	4+	–
2	1 : 20	4+	4+	4+	4+	–
3	1 : 40	4+	4+	4+	4+	–
4	1 : 80	4+	4+	3+	2+	–
5	1 : 100	4+	3+	2+	–	–
6	1 : 150	4+	3+	–	–	–
7	1 : 200	3+	2+	–	–	–
8	1 : 250	–	–	–	–	–

9.3.4. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Реакция непрямой гемагглютинации является специфичным и высокочувствительным методом выявления бруцеллезных антител в сыворотке крови человека. Для постановки РНГА необходимо иметь: а) бруцеллезный эритроцитарный антигенный диагностикум; б) контрольные (несенсибилизированные) эритроциты; в) разводящую жидкость (нормальная сыворотка кролика, твин); г) бруцеллезную сыворотку.

Для титрования испытуемых сывороток нормальную сыворотку кролика инактивируют при 56 °С в течение 30 мин и разводят 0,9%-м раствором натрия хлорида 1 : 100.

Испытуемую сыворотку разводят 0,9%-м раствором натрия хлорида 1 : 25 (0,1 мл сыворотки + 2,4 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида) и инактивируют в течение 30 мин при температуре 56 °С. Перед исследованием сыворотку адсорбируют 50%-й взвесью контрольных эритроцитов. К 1,2 мл инактивированной сыворотки добавляют 0,2 мл 50%-х эритроцитов, встряхивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Затем смесь центрифугируют при 1 000 об./мин в течение 2 мин.

Можно оставить сыворотки с эритроцитами на 8—12 ч в холодильнике (4 °С), в этом случае исключается этап центрифугирования.

Эритроцитарный диагностикум перед применением разводят 0,9%-м раствором натрия хлорида (pH 7,0—7,2) согласно инструкции по применению и получают 2,5%-ю взвесь, которая применяется в РНГА. Контрольные (несенсибилизированные) эритроциты также разводят согласно инструкции и применяют полученную 2,5%-ю взвесь для контроля сывороток.

Техника постановки РНГА

Реакцию ставят в прозрачных полистироловых пластинках с лунками. Каждую сыворотку исследуют не менее чем в 6—8 разведениях, начиная с 1 : 50. Сначала разведенную 1 : 100 инактивированную сыворотку кролика разливают во все лунки по 0,5 мл. Затем в первую лунку (контроль сыворотки) вносят 0,5 мл испытуемой сыворотки, предварительно инактивированной и разведенной 1 : 25, перемешивают и 0,5 мл удаляют. Во вторую лунку также добавляют 0,5 мл испытуемой сыворотки (1 : 25), перемешивают, переносят 0,5 мл в третью лунку и титруют сыворотку до конца ряда. Из последней лунки 0,5 мл удаляют. Таким образом, получают ряд последовательных двукратных разведений испытуемой сыворотки, начиная с 1 : 50, в объеме 0,5 мл.

В первые лунки (контроль сыворотки) добавляют микропипеткой по 0,05 мл контрольных эритроцитов. Затем в каждую лунку, начиная со второй, с помощью микропипетки добавляют по 0,05 мл диагностикума.

Пластины осторожно встряхивают до полного перемешивания содержимого лунки, следя, чтобы не было разбрызгивания жидкости, и оставляют при комнатной температуре. Учет реакции проводят через 2—3 ч.

При постановке РНГА предусматриваются следующие контроли:

а) контроль разводящей жидкости (контроль качества нормальной сыворотки кролика (1 : 100) проводят в двух лунках. К 0,5 мл сыворотки добавляют в первую лунку 0,05 мл 2,5%-й взвеси диагностикума, во вторую – 0,05 мл контрольных эритроцитов;

б) качество диагностикума проверяют путем титрования специфической бруцеллезной сыворотки, начиная с разведения 1 : 50 до 1 : 100 000. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 мл 2,5%-й взвеси диагностикума.

Реакция считается специфической, если в контролях исследуемых и контрольной сывороток отсутствует гемагглютинация, а титр специфической сыворотки в реакции будет соответствовать титру, указанному в инструкции по применению эритрицитарного диагностикума.

Оценка реакции проводится по следующей схеме:

4+ – эритроциты покрывают все дно лунки равномерным слоем, иногда в виде зонтика;

3+ – эритроциты покрывают все дно лунки тонким равномерным слоем, но площадь его меньше, чем при 4-крестовой реакции, размеры зонтика также меньше;

2+ – агглютинат небольшой, расположен в центре лунки;

1+ – вокруг осадка эритроцитов в центре виден небольшой агглютинат.

Отрицательная реакция – осадок эритроцитов на дне лунки в виде пуговки или маленького кольца.

За титр сыворотки принимают ее последнее разведение с оценкой реакции не менее чем 3+. Оценка результатов исследования сывороток на бруцеллез в РНГА у людей: титр 1 : 50 – реакция сомнительная, титр 1 : 100 и выше – реакция положительная. При записи результатов РНГА следует указывать титр сыворотки.

РНГА может быть выполнена микрометодом, титрование проводится в объемах 25 и 50 мкл. Техника постановки реакции, последовательность всех операций такая же, как и при использовании макрометода. В лунки после титрования добавляют 25 мкл эритроцитарного диагностикума, разведенного 1 : 10, пластины слегка встряхивают до получения гомогенной взвеси. Учет проводят через 2—3 ч по аналогичной схеме, как и при использовании макрометода.

Следует учитывать то, что чувствительность микрометода обычно на одно разведение ниже, чем макрометода.

9.3.5. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод используют для диагностики всех форм заболевания, а также при эпидемиологическом обследовании населения и отборе лиц для вакцинации против бруцеллезной инфекции.

Для постановки ИФА используют диагностическую тест-систему иммуноферментную для определения бруцеллезных антител. Выявление специфических антител в сыворотках людей происходит за счет взаимодействия бруцеллезного антигена (ЛПС), адсорбированного на полистироловом планшете (плоскодонном) с антителами исследуемой сыворотки. Образовавшийся комплекс «антиген + антитело» выявляют с помощью антител против иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой хрена.

Тест-система представляет собой набор ингредиентов для проведения ИФА на твердофазном носителе и включает в себя: бруцеллезный ЛПС (либо планшет, сенсибилизированный этим антигеном), антитела против иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой (конъюгат), контрольные (положительную и отрицательную) сыворотки человека, набор солей, необходимых для приготовления буферных растворов, субстрат – ортофенилиндиамин. Твин-20, бычий сывороточный альбумин, планшеты для ИФА однократного применения.

Техника постановки ИФА

1. Сенсибилизация твердой фазы. В лунки планшета вносят с помощью дозатора по 200 мкл раствора бруцеллезного антигена в концентрации 10 мкг/мл в 0,02 М растворе фосфатно-солевого буфера, pH – 7,2. Адсорбцию антигена на планшетах проводят в течение 2 ч в термостате при температуре 37 °С или в течение 18 ч при 4 °С. Затем антиген удаляют встряхиванием планшета с последующей трехкратной отмывкой (по 5 мин) раствором ФСБ, содержащим 0,1 % детергента – твин-20 (ФСБ-Т).

2. Внесение исследуемого материала. Испытуемые сыворотки, разведенные 1 : 200, вносят по 100 мкл в первую лунку ряда и далее титруют последовательно путем двукратных разведений в ФСБ-Т, содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Параллельно на каждом планшете ставят отрицательный и положительный контроли. Планшеты встряхивают и выдерживают при температуре 37 °С в течение 1 ч. После чего жидкость удаляют и отмывают планшеты, как указано в п. 1.

3. Внесение коньюгата. В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл раствора коньюгата в рабочем разведении (коньюгат разводят в

ФСБ с добавлением твин-20 и 1% БСА). Планшеты помещают в термостат на 40 мин, после чего жидкость удаляют, а планшеты отмывают 4—5 раз, как указано в п. 1.

4. Проявление реакции. В каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного раствора, содержащего 0,04 % ОФД и 0,04 % H_2O_2 в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере, pH – 5,5. Инкубацию проводят при комнатной температуре 15—30 мин. Реакцию останавливают внесением 50 мкл 0,5 М серной кислоты.

5. Учет и оценка результатов ИФА. Результат реакции учитывают с помощью спектрофотометра типа *Multiskan* при длине волны 492 нм. Появление желто-оранжевого окрашивания в опытных лунках и его отсутствие в лунках с отрицательными контролями свидетельствует о положительной реакции. Проба считается положительной, если оптическая плотность в два и более раз превосходит наивысшее значение ОП отрицательных контролей.

Диагностическим титром в ИФА считается разведение сыворотки более чем 1 : 400.

Использование ИФА в эпидемиологической практике

При проведении массовых обследований на бруцеллез для постановки ИФА может быть использована не сыворотка крови, а цельная кровь. Для этого кровь из пальца объемом 10 мкл с помощью микропипетки вносится в микропробирку с 0,9%-м раствором натрия хлорида в объеме 1 мл. Пробирку встряхивают и затем либо центрифугируют при 1 000 об./мин 5 мин, либо дают отстояться в холодильнике при 4 °С в течение 18 ч. Таким образом, получают разведение сыворотки 1 : 200. Для постановки ИФА используют надосадочную жидкость. Метод ИФА как скрининг-тест можно ставить в двух лунках микропланшета, при получении сомнительного или положительного результата ИФА повторяют для определения титра специфических антител в надосадочной жидкости. При получении положительного результата необходимо исследовать сыворотку крови.

9.3.6. Непрямой иммунофлуоресцентный метод

При использовании непрямого иммунофлуоресцентного метода для обнаружения антител к бруцеллам заранее готовят мазки из 1—2-суточной агаровой культуры возбудителя (1×10^9 м.к./мл). На одном предметном стекле делают 8 мазков, фиксируют их в этиловом спирте в течение 30 мин, высушивают на воздухе и помещают во влажную камеру. Исследуемую сыворотку разводят 2-кратно, начиная с разведения 1 : 2, до 1 : 320 и наносят пастеровской пипеткой на мазки, начиная с больше-

го разведения. Влажную камеру с препаратом помещают в термостат при температуре 37 °С на 30 мин. Мазок отмывают от несвязавшихся антител, после подсыхания его вновь помещают во влажную камеру, докрашивая антивидовой люминесцирующей сывороткой в рабочем разведении. Дальнейшая обработка препарата ведется, как при прямом иммуннофлуоресцентном методе (раздел 9.5.2.). После просмотра препарата под люминесцентным микроскопом устанавливают титр антител в исследуемой сыворотке.

В качестве контролей используют препараты, в которых бруцеллы обработаны бруцеллезной сывороткой (положительный контроль) и сывороткой, не содержащей антитела к бруцеллам (отрицательный контроль). Диагностическим титром считается титр не менее 1 : 4.

9.4. Тесты, выявляющие повышенную сенсибилизацию организма к бруцеллезному антигену

9.4.1. Кожно-аллергическая проба Бюрне

Внутрикожная аллергическая проба основана на способности организма, сенсибилизированного бруцеллезным антигеном, специфически отвечать местной реакцией (отек, болезненность) на внутрикожное введение бруцеллезного аллергена – бруцеллина. Бруцеллин представляет собой фильтрат убитой нагреванием бульонной культуры бруцелл. Реакция специфична, но выявляется у больных позднее, чем антитела, и сохраняется очень долго (иногда годами), после исчезновения клинических симптомов. Необходимо иметь в виду, что аллергическая реакция может быть положительной в случаях бессимптомной инфекции, а также у привитых живой бруцеллезной вакциной и у лиц, длительно контактировавших со специфическим антигеном.

Техника постановки пробы

Бруцеллезный аллерген вводится внутрикожно в количестве 0,1 мл. Инъекция делается с соблюдением асептики на ладонной поверхности предплечья шприцем с тонкой иглой. Учет реакции проводится через 24—48 ч после введения аллергена путем осмотра и ощупывания кожи. В некоторых случаях аллергическая реакция становится положительной к 72 ч.

При положительной реакции на месте введения аллергена появляется красноватая или бледная болезненная отечность удлиненной или овальной формы. Отек может быть хорошо контурирован с ясным возвышением над уровнем кожи. При слабо выраженной реакции отек распознается только при ощупывании (сравнить с аналогичным участком кожи на другой руке). Гиперемию кожи при отсутствии отека принима-

ют за отрицательный результат. При учете реакции отмечается размер отека в сантиметрах (длина и ширина), степень болезненности через 24 и 48 ч. При отрицательном результате следует учитывать реакцию и через 72 ч.

Оценка реакции

Наличие выраженного отека кожи на месте введения аллергена считается положительной аллергической реакцией. Отсутствие болезненности и гиперемии при наличии отека не исключает положительной оценки пробы.

Реакция, появившаяся и исчезнувшая ранее шести часов после введения аллергена, считается неспецифической.

У людей, сенсибилизированных бруцеллезным антигеном, возможна общая реакция организма на введение бруцеллина с повышением температуры, ознобом, головной болью и недомоганием.

Оценка реакции: «слабо положительная» – слабо выраженный отек не более 2 см в диаметре, «положительная» – отек размером от 2 до 6 см в диаметре, «резко положительная» – отек свыше 6 см, иногда сопровождающийся лимфаденитом и общей реакцией организма.

9.4.2. Реакция лизиса лейкоцитов

Реакция лизиса лейкоцитов основана на учете разрушения лейкоцитов сенсибилизированного организма под влиянием специфического антигена, регистрируемого методом *in vitro*. РЛЛ обладает строгой специфичностью, дает возможность количественного учета степени сенсибилизации организма, позволяет получить ответ через 3—4 ч после взятия крови.

Техника постановки РЛЛ

Реакция лизиса лейкоцитов проводится в пробирках из химически чистого стекла. В качестве антигена используется взвесь убитых нагреванием бруцелл (может быть использован вакцинный штамм *B. abortus* 19 ВА) в концентрации 1×10^7 м.к./мл.

Кровь для исследования берется в количестве 1 мл и вносится в колбочку с гепарином из расчета 75—80 МЕ гепарина на 1 мл крови. По 0,4 мл гепаринизированной крови помещается в 2 пробирки. В первую пробирку добавляют 0,1 мл бруцеллезного антигена (опытная пробирка), во вторую – 0,1 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида для установления неспецифического лизиса лейкоцитов (контрольная пробирка). Пробирки встряхивают в течение 2—3 мин, после чего проводят подсчет лейкоцитов в камере Горяева по принятому в гематологии методу. Затем пробирки помещают в термостат на 2 ч при температуре 37 °С и периодически встряхивают их через 15—20 мин. После инкубации пробирки

вновь встряхивают в течение 2—3 мин и проводят подсчет лейкоцитов. Подсчет проводится не менее 2—3 раз для каждой пробирки, а затем выводится среднее их количество.

Процент лейкоцитов после инкубации в опытной и контрольной пробирках определяют отношением количества лейкоцитов после инкубации к количеству лейкоцитов до инкубации.

Показатель специфического лизиса лейкоцитов подсчитывается путем определения разницы – процент уменьшения лейкоцитов в опытной пробирке минус процент уменьшения лейкоцитов в контроле. Показатель ПСЛ выражается отрицательной величиной и колеблется в пределах от 10 до 30 %. Показатель ПСЛ меньше 10 % свидетельствует о неспецифическом лизисе.

9.4.3. In vitro аллергодиагностика методом проточной цитофлуориметрии

Определение аллергической перестройки организма проводят в условиях *in vitro* с помощью наборов для постановки тестов активации базофилов, который может применяться для определения *in vitro* аллергической реакции немедленного типа и гиперчувствительности к предполагаемым антигенам. Тесты используются для определения экспрессии CD63 на поверхности базофилов цельной крови методом проточной цитофлуориметрии после антигенной стимуляции. В качестве антигена используют аллерген бруцеллезный жидкий – бруцеллин.

Принцип метода

При контакте аллергена с молекулами IgE на специализированных эффекторных клетках – базофилах, происходит каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции клеток и высвобождению медиаторов из гранул (гепарин, гистамин). Маркером клеточной перестройки базофилов является $CD63^+$ (gp53). В результате инкубации конъюгированных с флуорохромом моноклональных антител против $CD63^+$ со стабилизированной кровью сенсибилизированного пациента происходит специфическое связывание антител с поверхностными рецепторами активированных базофилов. Количество активированных бруцеллином базофилов учитывается с помощью проточного цитофлуориметра.

Техника постановки реакции

1. Подготовить три отдельные пробирки:

– фоновая проба, внести 50 мкл стимулирующего буфера;

– положительный контроль, внести 50 мкл положительного контроля;

– проба с аллергеном, внести 50 мкл бруцеллина.

2. Во все пробирки внести по 100 мкл стимулирующего буфера и добавить 50 мкл исследуемой стабилизированной крови.

3. Перемешать на вортексе в течение 10 с.

4. Во все пробирки добавить 20 мкл суспензии моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом против CD63.

5. Перемешать пипетированием и инкубировать 15 мин на водяной бане при температуре 37 °С.

6. Во все пробирки добавить 2,0 мл предварительно прогретого до температуры 18—28 °С лизирующего раствора в разведении 1 : 10.

7. Инкубировать 5—10 мин при температуре 18—28 °С.

8. Центрифугировать 5 мин при 2 тыс. об./мин.

9. Удалить супернатант.

10. Добавить 450 мкл отмывочного буфера.

11. Перемешать на вортексе в течение 10 с.

12. Анализировать на проточном цитометре (анализировать пробу в течение 2—3 ч) с помощью программ для оценки результатов исследования на проточном цитофлуориметре (*CellQuest* или аналог).

Учет результатов

При учете результатов из процента базофилов, экспрессирующих рецепторы к CD63 в пробе с аллергеном, вычитают процент активированных базофилов, полученный в фоновой пробе, полученная разница и является искомым результатом.

Оценка результатов:

– от 0 до 5 % – отрицательная реакция;

– > 5 % – положительная реакция.

Преимуществом данного метода является исключение дополнительной сенсибилизации организма при введении бруцеллезного аллергена, исключение ложноположительных и ложноотрицательных реакций, быстрое получение ответа.

9.5. Индикация бруцелл в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, клиническом и патологическом материале

Для быстрого обнаружения (индикации) возбудителя бруцеллеза в первичных посевах, пищевых продуктах, объектах окружающей среды, клиническом и патологическом материале рекомендуются следующие методы: микроскопия, МФА, РНАт, ИФА и ПЦР.

9.5.1. Микроскопия

Мазки, приготовленные из первичных посевов, из центрифугата или фильтрата (при исследовании воды, молока), и препараты-отпечатки из клинического материала после фиксации окрашивают по Граму или Козловскому и просматривают в световом микроскопе.

9.5.2. Метод флуоресцирующих антител (МФА)

При исследовании материала от больных людей и животных, а также из объектов окружающей среды используют прямой иммунофлуоресцентный метод, позволяющий выявлять как живые, так и нежизнеспособные бактерии по свечению в них специфического антигена. Для обнаружения бруцелл применяют флуоресцирующие бруцеллезные антитела.

а. *Приготовление препаратов для люминесцентной микроскопии*

При исследовании проб воды готовят мазки (не менее 3—4) из осадка после центрифугирования и с мембранных фильтров. Мазки фиксируют в этиловом спирте 30 мин.

Мазки, приготовленные из проб цельного молока и сливок, после центрифугирования обезжиривают эфиром в течение 20 мин и дополнительно фиксируют 96%-м спиртом в течение 30 мин.

Мазки, приготовленные из мясного экстракта или осадка, фиксируют 96%-м спиртом в течение 30 мин.

Из селезенки белых мышей, которым был введен исследуемый материал, готовят препараты-отпечатки, которые фиксируют 96%-м спиртом в течение 30 мин. При исследовании материала от больных людей, абортированных плодов, экссудатов и органов инфицированных животных готовят препараты-отпечатки, прикладывая предметное стекло к поверхности свежего среза. Затем препараты подсушивают на воздухе и фиксируют этиловым спиртом в течение 30 мин.

б. *Обработка препаратов флуоресцирующими антителами*

На фиксированные мазки наносят каплю бруцеллезной люминесцирующей сыворотки. Для гашения неспецифического свечения фона применяют бычий альбумин, меченный родамином, который придает клеткам и другим органическим частицам тусклое оранжево-красное свечение. Перед обработкой препаратов бруцеллезную люминесцирующую сыворотку и альбумин разводят до удвоенного рабочего разведения, указанного в инструкции по применению (например, если рабочее разведение равно 1 : 20, то готовят разведение 1 : 10). После этого альбумин и сыворотку смешивают в равных объемах и наносят на исследуемый препарат, который помещают во влажную камеру (чашка Петри с влажной фильтровальной бумагой на дне) на 15—20 мин, затем промывают проточной водопроводной водой в течение 10 мин и высушивают на воздухе. На препарат наносят каплю забуференного глицерина (9 частей глицерина и 1 часть забуференного 0,9%-го раствора натрия хлорида), покрывают покровным стеклом и исследуют под люминесцентным микроскопом.

в. *Микроскопия препаратов*

Мазки просматривают с помощью люминесцентного микроскопа с системой подобранных светофильтров и иммерсионным объективом. При этом необходимо пользоваться нефлуоресцирующим иммерсионным маслом. В случае его отсутствия применяют смесь, содержащую 1 часть 0,9%-го раствора натрия хлорида и 9 частей химически чистого глицерина.

В положительных случаях, т. е. когда в исследуемом материале имеются бруцеллы, в микроскопе на темном или оранжево-красном фоне видны клетки с ярким зеленым свечением по периферии. Центральная часть клетки не светится. Конгломераты бруцеллезного антигена имеют также яркое зеленое свечение.

Учет результатов

Для оценки интенсивности специфического свечения используют четырехкрестовую систему.

Сверкающая флуоресценция зеленого цвета с четко выраженной формой клетки – четыре креста. Яркая флуоресценция зеленого цвета – три креста. Заметная, но слабо выраженная флуоресценция, – два и один крест.

Положительным результатом считается флуоресценция, оцениваемая на четыре и три креста при наличии 2—3 клеток в каждом поле зрения препарата.

9.5.3. Реакция нейтрализации антител (РНАт)

Метод РНАт является модификацией реакции непрямой гемагглютинации и основана на нейтрализации антител специфическим антигеном, находящимся в исследуемом материале. Тем самым специфическая сыворотка лишается способности агглютинировать эритроциты, сенсибилизированные специфическим антигеном.

Применяется РНАт для обнаружения бруцеллезного антигена в клиническом материале, пищевых продуктах и объектах окружающей среды.

Подготовка исследуемого материала

Материал, подозрительный на зараженность бруцеллами, перед постановкой реакции обеззараживают путем прогревания при 100 °С (в кипящей водяной бане) в течение 20 мин, после чего добавляют формалин до конечной концентрации 2 % и оставляют на 12 ч при температуре 22 °С. Жидкости (вода, молоко) прогревают в нативном виде. После прогревания воду и молоко центрифугируют при 3 000 об./мин 2 ч и берут для исследования осадок. Исследуемый твердый материал (кусоч-

ки органов, брынзу и т. п.) предварительно измельчают и растирают в ступке с добавлением 9 объемов 0,9%-го раствора натрия хлорида, полученную суспензию прогревают. Прогретую суспензию фильтруют через 2 слоя марли или бумажный фильтр и исследуют фильтрат или же центрифугируют его и берут для реакции надосадочную жидкость и осадок.

Реакцию ставят в полистироловых пластинах с лунками, которые должны быть тщательно вымыты, т. к. реакция отличается высокой чувствительностью, и присутствие даже следов антигена может исказить ее результаты. Для постановки РНАт нужны те же ингредиенты, что и для РНГА, и, кроме того, взвесь убитых бруцелл в концентрации 5×10^8 м.к./мл и бруцеллезная сыворотка с высоким титром гемагглютинирующих антител.

Бруцеллезную сыворотку предварительно титруют в РНГА, определяя ее предельное разведение, дающее реакцию не менее чем 3+. Это разведение принимают за одну сывороточную гемагглютинирующую единицу. Для РНАт берут разведение сыворотки, соответствующее 4 единицам. Например, если 1 единица соответствует разведению 1 : 25 600, то 4 единицы – 1 : 6 400. Поскольку в РНАт бруцеллезная сыворотка берется в объеме 0,25 мл, ее следует разводить в удвоенном титре (титр 1 : 3 200). Реакцию ставят в 4 рядах лунок, первый ряд – опытный (8—10 лунок), остальные – контрольные (6 лунок).

В первом (опытном) ряду титруют испытуемый материал. Во втором ряду (контроль 1) контролируется возможность неспецифической реакции за счет тканевых антигенов или гетерогенных антител. В третьем ряду (контроль 2) контролируется специфичность РНАт с заведомо бруцеллезным антигеном. В четвертом ряду (контроль 3) проверяется активность бруцеллезной сыворотки.

Если одновременно исследуют несколько проб, то для каждой пробы ставят только первый контроль, а второй и третий контроли ставят для всей партии проб.

Техника постановки РНАт

В лунки первого, второго и третьего рядов вносят нормальную сыворотку кролика (разведенную 1 : 100) по 0,25 мл, а в четвертый ряд по 0,5 мл в каждую лунку, кроме первой лунки. Затем в первые лунки опытного и второго (контроль 1) рядов вносят по 0,25 мл исследуемого материала и титруют. В третий (контроль 2) ряд вносят бруцеллезный антиген в объеме 0,25 мл и также титруют. Во все лунки первого (опытного) и третьего (контроль 2) рядов добавляют по 0,25 мл положитель-

ной бруцеллезной сыворотки 4 сывороточных гемагглютинирующих единиц (например, 1 : 3 200).

Во все лунки второго (контроль 1) ряда добавляют 0,25 мл нормальной сыворотки кролика (1 : 100). В четвертом (контроль 3) ряду разводят бруцеллезную положительную сыворотку в объеме 0,5 мл, начиная с разведения, которое было использовано в первом (опытном) и третьем (контроль 2) рядах, и проверяют соответствие разведения сыворотки 4 сывороточным единицам (например, 1 : 6 400). Пластины встряхивают и инкубируют в термостат при температуре 37 °С 2 ч. Затем во все лунки четырех рядов добавляют по 0,05 мл 2,5%-й взвеси бруцеллезного эритроцитарного диагностикума. Пластины встряхивают и оставляют при температуре 18—24 °С на 2—3 ч.

Учет реакции

При наличии бруцеллезного антигена в исследуемом материале эритроциты выпадают в осадок в виде «пуговки» или маленького кольца – реакция нейтрализации положительная. Если в исследуемом материале антиген отсутствует, то специфические антитела остаются свободными и склеивают эритроциты – реакция нейтрализации отрицательная.

За титр РНАт принимают последнее разведение исследуемого материала, которое вызывало полное подавление гемагглютинации. Результат РНАт считается положительным, если подавление гемагглютинации отмечается не менее чем в первых 2—3 лунках.

Техника постановки РНАт в микрообъемах

В лунки микротитровальных пластинок помещают по 0,025 мл 1 %-й нормальной сыворотки кролика. Затем дозаторами, вмещающими 0,025 мл, набирают исследуемый материал 1 : 5—1 : 10 и титруют переносом по 0,025 мл из одной лунки в другую в 7—8 разведениях. Из последней лунки 0,025 мл удаляют (так же, как в РНГА). После этого в лунки добавляют по 0,025 мл раствора бруцеллезной сыворотки в такой концентрации, чтобы в этом объеме содержалось четыре гемагглютинирующих единиц сыворотки. Пластины оставляют на 1 ч при комнатной температуре и затем во все лунки добавляют по 0,025 мл диагностикума бруцеллезного эритроцитарного в концентрации 0,5 %. За титр реакции принимают последнее разведение исследуемого материала, в котором отмечено полное подавление гемагглютинации.

9.5.4. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод используется для выявления бруцеллезного антигена в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и клиническом материале, а также для идентификации выделенных культур бруцелл. Метод характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, воз-

можностью количественной и автоматизированной оценки результатов, воспроизводимостью и стандартностью основных ингредиентов анализа. С помощью ИФА можно выявить бруцеллы в концентрации 10^3—10^4 м.к./мл или 1—5 нг/мл бруцеллезного растворимого антигена.

Постановку ИФА осуществляют в соответствии с инструкцией по применению иммуноферментной тест-системы для определения бруцеллезного антигена, в которую входят: иммуноглобулины бруцеллезные, бруцеллезный конъюгат, бруцеллезный антиген (ЛПС), набор солей, необходимых для приготовления буферных растворов, субстрат – ортофенилиндиамин, твин-20, бычий сывороточный альбумин, полистироловые планшеты для иммунологических реакций.

Выявление бруцеллезного антигена в ИФА происходит за счет специфического взаимодействия бруцеллезных иммуноглобулинов, сорбированных на планшете, с бруцеллезным антигеном, содержащимся в исследуемом материале. Образовавшийся комплекс «антиген + антитело» выявляют с помощью конъюгата (бруцеллезные антитела, меченные пероксидазой хрена).

Техника постановки ИФА

1. Сенсибилизация твердой фазы. В лунки планшета вносят с помощью дозатора по 200 мкл раствора бруцеллезных иммуноглобулинов в рабочем разведении (20 мкг/мл) в 0,02М растворе ФСБ, pH 7,2. Планшеты помещают в термостат на 2 ч при температуре 37 °С или в холодильник на 18 ч при температуре 4 °С. После окончания адсорбции иммуноглобулины удаляют из лунок планшета встряхиванием и трехкратно отмывают раствором ФСБ, содержащим 0,1 % твина-20 (ФСБ-Т).

2. Внесение исследуемого материала. Исследуемый материал в разведениях (двух- или десятикратных) в ФСБ-Т, содержащем 1 % БСА, вносят по 100 мкл в каждую лунку. Параллельно с исследуемыми образцами готовят серию последовательных разведений контрольного образца бруцеллезного антигена в концентрациях от 1 до 1 000 нг/мл и каждое разведение антигена вносят в количестве 100 мкл в лунки планшета. Планшеты выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение часа, после чего жидкость из планшета удаляют встряхиванием и планшеты отмывают, как указано в п. 1.

3. Внесение конъюгата. В каждую лунку вносят по 100 мкл раствора коньюгата в рабочем разведении (коньюгат разводят в ФСБ-Т, содержащем 1 % БСА). Планшеты помещают в термостат на 40 мин, а затем отмывают, как указано в п. 1.

4. Проявление реакции. В каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного раствора, содержащего 0,04 % ОФД и 0,04 % H_2O_2 в 0,1 М

цитратно-фосфатном буфере, pH – 5,5. Планшеты помещают в темное место при температуре 18—24 °С на 15—20 мин. Реакцию останавливают внесением в лунки 50 мкл серной кислоты в концентрации 0,5 моль/л.

5. Оценка результатов. Оценку результатов проводят по изменению окраски субстрата с помощью фотометра при длине волны 492 нм, сравнивая интенсивность окраски контрольных и опытных проб. Появление желто-оранжевого окрашивания в опытных лунках и положительном контроле при его отсутствии в лунках с отрицательными контролями свидетельствует о наличии в пробе бруцеллезного антигена. Проба считается положительной, если ее оптическая плотность в два и более раза превосходит наивысшее значение ОП отрицательных контролей, которое не должно превышать 0,2.

9.5.5. Использование магноиммуносорбентов для селективного концентрирования возбудителя бруцеллеза в пробах из объектов окружающей среды с последующей постановкой ИФА

Для выделения и концентрирования антигенного материала различной природы применяются магноиммуносорбенты, представляющие собой органокремнеземные микрогранулы с включенным в них магнитным материалом, связанные со специфическими иммуноглобулинами.

Магноиммуносорбенты могут быть применены при поиске антигенов бруцелл в объектах окружающей среды при проведении бактериологического, биологического, иммунофлуоресцентного, иммуноферментного, радиоиммунного и других иммунобиологических методов. Чувствительность этих методов с применением МИС достигает 10^3—10^4 м.к. в неограниченных по объему пробах. При бактериологическом методе исследования процесс выделения чистой культуры из загрязненных проб значительно сокращается за счет высокой специфичности препаратов.

При иммунофлуоресцентном и иммуноферментном анализах возможно проведение исследований с помощью магноиммуносорбентов непосредственно после доставки проб.

Для селективного концентрирования возбудителя бруцеллеза из исследуемых бактериальных культур и объектов окружающей среды с последующей постановкой ИФА применяется тест-система диагностическая магноиммуносорбентная для выявления возбудителя бруцеллеза в ИФА.

1. Подготовка исследуемого материала. Материалом для исследования могут служить подозрительные на контаминацию бруцеллами органы и ткани животных, абортированные плоды, пищевые продукты, объекты окружающей среды.

Подозрительный на содержание возбудителя бруцеллеза исследуемый материал отсевают на скошенный агар Альбими в пробирки и выращивают в течение 48 ч при температуре 37 °С. Из выросших культур готовят взвеси в 0,9%-м растворе натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу 10 единиц (ОСО 42-28-85П). Взвеси прогревают при температуре 100 °С в течение 20 мин, после чего добавляют формалин до конечной концентрации 2 % и оставляют на 12 ч при температуре 22 °С.

Пробы органов и тканей от подозрительных на зараженность бруцеллезом животных или абортированных плодов размельчают, растирают в ступке, прогревают при температуре 100 °С в течение 20 мин с последующим добавлением проверенного на бактерицидное действие формалина до 1—2 % концентрации с последующим выдерживанием не менее 12 ч или до концентрации 4 % с экспозицией при комнатной температуре в течение 1 ч. Надосадочную жидкость фильтруют через марлевый или бумажный фильтр.

2. Концентрирование на магноиммуносорбентах. После подготовки исследуемого материала проводят его селективное концентрирование на магноиммуносорбенте путем внесения 50 мкл 10%-й взвеси МИС в суспензию исследуемого материала в соответствии с инструкцией по применению тест-системы диагностической магноиммуносорбентной для выявления возбудителя бруцеллеза в ИФА.

3. Проведение иммуноферментного анализа. Проведение иммуноферментного анализа с использованием МИС осуществляют в соответствии с инструкцией по применению тест-системы диагностической магноиммуносорбентной для выявления возбудителя бруцеллеза в ИФА.

4. Учет результатов. Учет результатов проводят на регистрирующем устройстве или на фотометре для ИФА при длине волны 492 нм. Положительными считают результаты, если ОП образцов в два и более раза превышает ОП отрицательного контроля.

9.5.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для определения наличия ДНК бруцелл в биологическом материале, объектах окружающей среды и пищевых продуктах, а также для определения принадлежности выделенных культур к роду *Brucella* используется ПЦР с родоспецифичными праймерами. В основе метода ПЦР лежит многократное копирование (амплификация) специфического фрагмента ДНК-мишени, который является маркерным для данного вида. Метод обладает высокой чувствительностью, позволяет выявить 100—1 000 бактериальных клеток в пробе. Важным преимуществом пе-

ред иммунологическими тестами выявления бруцеллезного антигена является высокая специфичность ПЦР. Подготовку проб для исследования (выделение ДНК) и проведение ПЦР осуществляют с помощью специальных наборов, в которые включены все необходимые ингредиенты. Современные методические подходы подготовки образцов для проведения ПЦР позволяют осуществлять выявление возбудителя бруцеллеза в биологическом материале от животных (кровь, молоко, плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных, материал от абортированного плода, содержимое бурс и гигром, лимфатические узлы, паренхиматозные органы, семенники), в пробах клинического материала (кровь, сыворотка крови, пунктат из лимфоузлов, синовиальная жидкость), в объектах окружающей среды (вода, почва, смывы), в пищевых продуктах (молоко, сыр, брынза, кисломолочные продукты). Подготовку материала и проведение реакции осуществляют в соответствии с нормативными правовыми и методическими документами по организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности. ПЦР-анализ проводят с использованием зарегистрированных тест-систем в соответствии с инструкцией по применению диагностических препаратов.

При оценке результатов ПЦР следует учитывать, что праймеры, используемые в тест-системе, обеспечивают амплификацию специфичных фрагментов ДНК всех видов бруцелл, в т. ч. и вакцинных штаммов.

Для определения видовой принадлежности выделенных штаммов бруцелл возможно использование ПЦР с видоспецифичными праймерами. Материалом для исследования являются бактериальные суспензии чистых культур возбудителя. Работу осуществляют в соответствии с инструкциями к генодиагностическим препаратам.

9.6. Определение генотипа выделенных штаммов бруцелл методом MLVA

Для молекулярно-генетической дифференциации и установления генетического родства изучаемых изолятов рекомендуется применять метод мультилокусного VNTR-типирования с использованием известных вариабельных локусов бруцелл. В геноме бруцеллезного микроба описаны более 100 локусов. Определение MLVA-генотипа штаммов бруцеллезного микроба рекомендуется проводить по схеме, описанной Le Fleche P. et. al. (2006 г.), основанной на амплификации двух групп маркерных локусов, содержащих тандемные повторы. Для практического использования предложено 15 локусов, среди которых 8 маркеров с

хорошей возможностью к видовой идентификации, обозначенные как минисателлитный набор, и 7 – с большей дискриминационной способностью (микросателлитный набор).

Использование MLVA дает возможность типировать изоляты бруцелл до уровня штаммовых различий и систематизировать штаммы бруцелл в соответствии с существующим таксономическим положением видов и биоваров возбудителя.

MLVA-типирование бруцелл проводится специализированными лабораториями Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза и Национального центра верификации диагностической деятельности в соответствии с нормативными правовыми и методическими документами по молекулярному типированию возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности.

9.7. Определение чувствительности бруцелл к антибактериальным препаратам

Определение антибиотикочувствительности/устойчивости бруцелл проводят методом серийных разведений препаратов в плотной питательной среде и ДДМ.

Мерой чувствительности бруцелл при использовании метода серийных разведений является МПК антибактериального препарата, подавляющая видимый рост возбудителя бруцеллеза.

Определение антибиотикограмм штаммов возбудителя бруцеллеза, выделяемых от людей, является основой для выбора наиболее эффективного препарата для этиотропной терапии бруцеллеза, а также служит дополнительным признаком при проведении дифференциации штаммов бруцеллезного микроба.

Регламентированные методы постановки и учета результатов тестов антибиотикочувствительности бруцелл, а также перечень рекомендованных антибактериальных препаратов изложены в нормативных правовых и методических документах по определению чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап и мелиоидоз) к антибактериальным препаратам.

Определение антибиотикочувствительности бруцелл проводится в лабораториях особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, Региональных центрах по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I—II групп патогенности, Центрах индикации и диагностики возбудителей опасных

инфекционных болезней, Референс-центре по мониторингу за возбудителем бруцеллеза.

10. Нормативные ссылки

1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. Постановление Правительства Российской Федерации от 06 апреля 2012 г. № 31 «О лицензировании деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных (за исключением случая, если указанная деятельность осуществляется в медицинских целях) и генно-инженерно-модифицированных организмов III и IV степеней потенциальной опасности, осуществляемой в замкнутых системах».

3. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 24 февраля 2009 г. № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера».

4. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 17 марта 2008 г. № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней».

5. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 7 июля 2009 г. № 415н «Об утверждении квалификационных требований к специалистам с высшим и послевузовским медицинским и фармацевтическим образованием в сфере здравоохранения».

6. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

7. СП 1.3.3118—13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

8. СП 1.3.1318—03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I—IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами».

9. СП 3.4.2318—08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации».

10. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

11. СП 1.3.2518—09 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Дополнения и изменения № 1 к СП 1.3.2322—08.

12. СанПиН 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

13. СП 3.1.7.2613—10 «Профилактика бруцеллеза».

14. МУ 4.2.2039—05 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

15. МУ 3.3.2.2124—06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза».

16. МУК 4.2.2316—08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

17. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

18. МУ 4.2.2495—09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чумы, сибирской язвы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза) к антибактериальным препаратам».

19. МУК 4.2.3010—12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

20. МУ 3.4.3008—12 «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней».

21. Руководство по вакцинопрофилактике особо опасных инфекций / Под ред. профессора И.В. Борисевича, профессора И.В. Дармова. Киров: ООО «Кировская областная типография», 2011. 152 с., ил.

22. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М., 2013. С. 191—215.

23. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко. М.: ЗАО «МП Гигиена». 2006. 288 с.

24. ГОСТ 9792—73 «Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб».

25. ГОСТ 21237—75 «Мясо. Методы бактериологического анализа».

26. ГОСТ 9225—84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа».

27. ГОСТ 26809—86 «Молоко и молочные продукты. Общие методы анализа».

28. ГОСТ Р ИСО 51448—99 (ИСО 3100-2-88) «Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований».

29. ГОСТ Р ИСО 7218—2008 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям».

30. ГОСТ Р 51447—09 (ИСО 3100-1-91) «Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб».

31. Рекомендации по правилам перевозки инфекционных материалов 2009—2010. WHO/HSE/EPR/2008.10.

Приложение 1

Методика проведения эпидемиологического районирования субъекта Российской Федерации по риску эпидемической опасности (общие положения)

Для осуществления эпидемиологического районирования по ПЭО необходимо использовать статистические данные официальной регистрации заболеваемости людей впервые выявленным бруцеллезом (ИП – количество больных на 100 тыс. населения) в субъекте Российской Федерации за определенный период (не менее трех лет) с учетом частоты встречаемости заболевших бруцеллезом людей в разрезе административных районов субъекта Российской Федерации, а также индекса эпизоотичности. Эпидемиологическое районирование позволяет сгруппировать административные территории субъекта Российской Федерации по степени эпидемической опасности и составить шкалу картограмм, позволяющих визуализировать эпидемическую ситуацию на карте.

Эпидемиологическое районирование проводят с использованием картографического метода, основанного на применении географических карт, а также статистических методов, необходимых для обработки данных.

Для каждого административного района (города) в субъекте Российской Федерации величина ПОЭ (Z) рассчитывается по формуле:

$$Z = A \times ИЭ, \text{ где} \quad (1)$$

Z – показатель эпидемической опасности;

A – интегрированный показатель риска инфицирования бруцеллезом (РИБ);

ИЭ – индекс эпизоотичности.

Показатель степени РИБ рассчитывается по методу О.В. Кедровой с соавт. (1996) по формуле:

$$A = \frac{\bar{X} \cdot t}{T}, \text{ где} \quad (2)$$

A – интегрированный показатель риска инфицирования;

$\bar{X}$ – средний интенсивный показатель заболеваемости;

t – число лет регистрации заболевания на конкретной территории;

T – продолжительность изучаемого периода (число лет наблюдения).

Расчет среднего интенсивного показателя многолетней заболеваемости ($\bar{X}$) людей бруцеллезом проводится по формуле:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{T}, \text{ где} \quad (3)$$

$\bar{X}$ – средний интенсивный показатель многолетней заболеваемости (на 100 тыс. населения);

X – заболеваемость людей в районе (городе краевого, областного и т. д. подчинения) по годам (на 100 тыс. населения);

T – продолжительность изучаемого периода (число лет).

Индекс эпизоотичности рассчитывается по формуле:

$$ИЭ = \frac{tж}{Tж}, \text{ где} \quad (4)$$

ИЭ – индекс эпизоотичности;

tж – число лет регистрации заболеваемости животных на конкретной территории;

Тж – продолжительность изучаемого периода (число лет наблюдения).

При районировании территории субъекта Российской Федерации по уровню эпидемической опасности используется критерий Мартина, в котором среднее квадратическое отклонение (σ) характеризует степень рассеивания вариант распределения ПЭО (Z) на различных административных территориях субъекта и рассчитывается по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (Z - \bar{Z})^2}{n-1}}, \text{ где} \quad (5)$$

σ – среднее квадратическое отклонение;

Z – показатель эпидемической опасности по отдельным районам (городам краевого, областного и т. д. подчинения);

$\bar{Z}$ – усредненный показатель эпидемической опасности;

n – количество административных районов (городов краевого, областного и т. д. подчинения).

Расчет усредненного показателя эпидемиологической опасности рассчитывается по формуле:

$$\bar{Z} = \frac{\sum Z}{n}, \text{ где} \quad (6)$$

$\bar{Z}$ – усредненный интегрированный показатель эпидемической опасности;

Z – показатель эпидемической опасности по отдельным районам (городам краевого, областного и т. д. подчинения);

n – количество административных образований (районов и городов краевого, областного подчинения).

Среднее квадратическое отклонение (σ) рассматривается как критерий группировки по уровню ЭО. Варианты изучаемого признака ЭО, отклоняющегося от средней величины в пределах $\overline{Z} \pm 0{,}5\sigma$, считают относящимся к средней величине (средний уровень ЭО), тогда как лежащие за пределами $\overline{Z} \pm 0{,}5\sigma$, но не более чем $\overline{Z} \pm 1\sigma$, (ЭО – 68,2 % от всех случаев) отличаются от средней величины умеренно (высокий и низкий уровни РИБ), а за пределами $\overline{Z} \pm 1\sigma$ – резко отличаются от средних величин (очень высокий и очень низкий уровни ЭО).

Расчеты, группировка первичных данных, вычисление средних величин выполняются на персональном компьютере с использованием программного продукта *Microsoft Office Excel* 2007 по методам биометрии.

Картограмма выполняется одним из способов:

– данные могут наноситься на карту с административно-территориальным делением субъекта Российской Федерации (бумажный носитель) штриховкой различной густоты или окраской определенной степени насыщенности (фоновая картограмма);

– выполнение картограммы на персональном компьютере с помощью графических редакторов, например *Adobeillustrator*, *CorelDraw*;

– в автоматическом режиме с применением географических информационных систем: *ArcGis*, *MapInfo*.

Приложение 2

Рецепты питательных сред

Печеночные среды

Свежую говяжью печень освобождают от жира и пленок и пропускают через мясорубку. Фарш заливают водопроводной водой (на 1 кг фарша – 1 л воды) и настаивают при температуре 25—30 °С в течение 3 ч или при температуре 4—10 °С в течение 6—10 ч. Затем смесь перемешивают и автоклавируют текучим паром в течение 20 мин. Можно варить и в котле, постоянно помешивая в течение одного часа после закипания. В процессе варки снимают накипь. После варки настой фильтруют через тонкий ватно-марлевый фильтр.

Приготовленный таким образом печеночный настой разливают по бутылям и стерилизуют в течение 20 мин при температуре 115—120 °С.

Печеночный бульон

К 500 мл печеночного настоя добавляют 500 мл водопроводной воды, 10 г сухого пептона и 5 г химически чистого хлористого натрия. Смесь кипятят, устанавливают pH 7,4, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют 20 мин при температуре 115—120 °С, pH бульона после стерилизации должен быть 7,1—7,2.

Печеночный агар

К 500 мл печеночного настоя добавляют 500 мл водопроводной воды, 10 г сухого пептона, 5 г химически чистого хлористого натрия и 25 г агар-агара, промытого водопроводной водой и хорошо отжатого, pH среды устанавливают 7,8. Затем среду варят до полного расплавления агара и разливают в необходимую посуду (по 1—2 л).

В дальнейшем среду автоклавируют при температуре 115 °С в течение 20 мин, отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, предварительно смоченный теплой водой и вновь устанавливают pH 7,1—7,2.

Среду разливают в необходимую по емкости посуду и стерилизуют при температуре 115 °С в течение 20 мин.

Мясопептонные среды

Мясная вода

Свежее говяжье мясо освобождают от костей, жира и сухожилий и пропускают через мясорубку. Фарш заливают водопроводной водой из расчета 500 г фарша на 1 л воды и выдерживают в течение 15 ч в прохладном месте.

В дальнейшем настой варят 30—40 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Полученную мясную воду стерилизуют при температуре 121 °С в течение 20 мин.

Мясопептонный бульон

На 2 л мясной воды добавляют 10 г сухого пептона и 5 г химически чистого хлористого натрия. Смесь подщелачивают до pH 7,4 и кипятят в течение 20 мин. После этого фильтруют через бумажный фильтр, разливают в необходимую посуду и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 20 мин, pH среды после стерилизации должен быть 7,2.

Мясопептонный агар

К 1 л мясной воды добавляют 10 г сухого пептона, 5 г химически чистого хлористого натрия и 25 г агар-агара. Смесь подщелачивают до pH 7,8, варят до полного расплавления агара. Затем автоклавируют при температуре 120 °С в течение 30 мин для стерилизации и расплавления агара. После стерилизации среду отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, предварительно смоченный теплой водой, корректируют pH среды до 7,2, разливают в необходимую посуду и вновь стерилизуют 20—30 мин при температуре 110 °С.

Сывороточно-декстрозный агар

Основой среды является питательный агар, который готовят следующим образом: к 835 мл дистиллированной воды добавляют 10 г агара микробиологического, 10 г пептона, 5 г химически чистого хлористого натрия и 165 мл мясной воды. Все ингредиенты помещают в сосуд, устанавливают pH 7,8 и кипятят 2—3 минуты до полного расплавления агара. Затем сосуд ставят в автоклав и подвергают одномоментному давлению 1 атмосферы при температуре 121 °С в течение 20 мин для выпадения в осадок фосфатов. Среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают pH 7,4, а затем разливают в мерную посуду и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 20 мин. Заготовленный таким образом питательный агар по мере надобности расплавляют в водяной бане или автоклаве и охлаждают до 50 °С. Затем к нему добавляют нормальную инактивированную (при температуре 56 °С 30 мин) лошадиную или бычью сыворотку и раствор декстрозы, предварительно простерилизованный путем фильтрации через фильтр Зейтца так, чтобы окончательная концентрация сыворотки была 5 % и декстрозы – 1 %.

Кровяной агар

Основой среды является питательный агар, применяемый при изготовлении сывороточно-декстрозной среды.

Для приготовления кровяного агара к основной среде добавляют 5 % крови бараньей дефибринированной.

Картофельная среда

Крупный отборный картофель моют и очищают. На 1 кг картофеля добавляют 1 л дистиллированной воды и варят до готовности картофеля. Затем жидкость сливают, замеряют объем, доливают дистиллированной водой до 1 л и фильтруют через двойной марлевый фильтр. После этого

добавляют следующие ингредиенты: пептон – 10 г, химически чистый хлористый натрий – 5 г, глицерин – 30 мл и агар микробиологический – 10 г. Все помещают в кастрюлю и варят до полного расплавления агара. устанавливают pH 7,2 10%-м раствором едкого натрия.

Затем проводят стерилизацию в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин, фильтруют, добавляют 10 г глюкозы и вновь стерилизуют при температуре 121 °С 20 мин. После автоклавирования к среде добавляют 10 % нормальной инактивированной стерильной лошадиной или овечьей сыворотки.

Среда «Д»

а) Бульон «Д»

К 100 мл холодной дистиллированной воды добавляют 2,5 г порошка стандартного бульона «Д», прогревают и тщательно размешивают до полного его растворения. Затем бульон фильтруют, разливают в необходимую посуду и стерилизуют при температуре 120 °С в течение 20 мин (pH среды 7,1—7,2).

б) Агар «Д»

К 100 мл холодной дистиллированной воды добавляют 5 г порошка стандартного агара «Д», прогревают при помешивании до полного растворения порошка, не допуская его подгорания, затем фильтруют, разливают в необходимую посуду и стерилизуют при температуре 120 °С в течение 20 мин (pH среды 7,2).

Среда – заменитель «Альбими»-агара

К 1 л дистиллированной воды добавляют 20 г сухого пептона, 20 мл дрожжевой воды, 5 г химически чистого хлористого натрия и 20 г агар-агара, устанавливают pH 7,3.

Затем все растворяют в автоклаве под текучим паром и фильтруют через ватно-марлевый фильтр (предварительно смоченный теплой водой и хорошо отжатый).

Затем добавляют 1 г глюкозы и 0,1 г бисульфита натрия, устанавливают pH 7,2—7,3. Разливают в необходимую посуду и стерилизуют 40 мин под текучим паром, а потом при температуре 110 °С в течение 20 мин.

Дрожжевая вода

К 1 л дистиллированной воды добавляют 1 кг хлебных дрожжей и кипятят до растворения. Затем фильтруют через полотняный фильтр. Хранить под хлороформом в темноте не более двух недель.

Среда для культивирования *B. ovis*

Основой среды является печеночный или мясопептонный агар, к которому добавляют 1 % декстрозы (глюкозы) и 2 % глицерина. Среду разливают в необходимую посуду и стерилизуют при температуре 116 °С в течение 15 мин. Перед посевом к расплавленной и остуженной

до 50 °С среде добавляют 20 % нормальной сыворотки крупного рогатого скота или 10 % аминопептида и 10 % сыворотки.

Среда для выделения и культивирования L-форм бруцелл

Основой среды является питательный агар, который готовится с использованием печеночного настоя.

Для приготовления агара (из расчета на 1 л среды) к 500 мл печеночного настоя добавляют 500 мл водопроводной воды и 10 г сухого пептона, 5 г химически чистого хлористого натрия, 30 г микробиологического агара. Устанавливают pH 7,8.

Смесь кипятят до полного расплавления агара, разливают в бутыли и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 20 мин, отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, смоченный теплой водой. После фильтрации добавляют 10 г глицерина и 10 г глюкозы, устанавливают pH 7,2 и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 20 мин.

Заготовленный агар перед посевом крови расплавляют в водяной бане, охлаждают до температуры 50 °С и добавляют 25 % нормальной лошадиной сыворотки (предварительно простерилизованной через фильтр Зейтца), 25 % печеночного агара, содержащего 50—100 ЕД пенициллина на 1 мл среды.

Посев крови в объеме не менее 5 мл, пунктатов костного мозга и лимфоузлов проводят на питательную среду сразу же после застывания агара.

Среда для выделения L-форм бруцелл на основе печеночного настоя (плотная)

Микробиологический агар – 12,0—12,5 г
Натрия хлорид – 5,0—5,5 г
Натрия гидроокись – 2,0—2,5 г
Магния сульфат – 20,0—20,5 г
Сахароза – 100,0—100,5 г
Глицерин – 10,0—10,5 г
Кристаллический фиолетовый – 0,025—0,03 г
Нормальная лошадиная сыворотка – 100,0—200,0 мл
Бициллин-3 – 3 000 ЕД/мл
Печеночный настой – 18,0—18,5 мл
Пептон ферментативный – 10,0—10,5 г
Вода дистиллированная – до 1 л

Навеску, содержащую компоненты среды в указанных выше количественных соотношениях, растворяют в 1 л дистиллированной воды, доводят до кипения при помешивании и кипятят в течение 2—3 мин. Затем среду охлаждают до температуры (40 ± 5) °С, добавляют 100—200 мл нормальной лошадиной сыворотки и бициллин-3 (3 000 ЕД/мл), тщательно перемешивают и разливают в стерильную посуду.

Приложение 3

Дифференциальные свойства видов и биоваров бактерий рода *Brucella*

Виды бруцелл	Биовар	Референтные штаммы	Потребность в CO_2	Продукция H_2S	Рост на средах, содержащих		Агглютинация моноспецифическими сыворотками			Лизис фагами в ДРТ				Основные хозяева
					T	Ф	A	M	R	Тб	Wb	Fi	Bk2	
B. melitensis	1	16-M	–	–	+	+	–	+	–	–	(–)	–	+	Овцы, козы
	2	63/9	–	–	+	+	+	–	–	–	(–)	–	+	
	3	*Ether*	–	–	+	+	+	+	–	–	(–)	–	+	
B. abortus	1	544	(+)	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	Крупный рогатый скот
	2	86/8/59	(+)	+	–	–	+	–	–	+	+	+	+	
	3	*Tulya*	(+)	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	
	4	292	(+)	+	–	(+)	–	+	–	+	+	+	+	
	5	B-3196	–	–	+	+	–	+	–	+	+	+	+	
	6	870	–	(+)	+	+	+	–	–	+	+	+	+	
	9	C-68	–	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	
B. suis	1	1330	–	+	+	(–)	+	–	–	–	+	+	±	Свиньи
	2	*Thomsen*	–	–	+	–	+	–	–	–	+	+	±	Свиньи, зайцы
	3	686	–	–	+	+	+	–	–	–	+	+	±	Свиньи
	4	40	–	–	+	(–)	+	+	–	–	+	+	±	Северные олени
	5	513	–	–	+	–	–	+	–	–	+	+	±	Мышевидные грызуны
B. neotomae		5K33	–	+	–	–	+	–	–	±	+	+	+	Кустарниковые крысы
B. ovis		63/290	+	–	+	(–)	–	–	+	–	–	–	–	Овцы
B. canis		RM 6/66	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	Собаки
B. pinnipedialis		не определен	+	–	+	+	+	±	–	(–)	(+)	+	+	Ластоногие
B. ceti		не определен	–	–	+	+	+	±	–	(–)	(+)	+	+	Китообразные
B. microti		не определен	–	–	+	+	–	+	–	–	+	X	X	Серая полевка
B. inopinata		не определен	–	+	+	+	–	+	–	P	X	X	X	Не установлен

+ – признак определяется у всех представителей,
– – признак отсутствует у всех представителей,
± – признак выявляется у некоторых штаммов,
(+) – большинство культур имеют данный признак,
(–) – большинство культур не имеют данный признак,
P– неполный лизис фагом Tb при 10^4 × RTD (Scholz*etal.*, 2010) или не чувствительны к фагу Тб (De*etal.*, 2008),
X – сведения отсутствуют.

gost.e-ecolog.ru