МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33675— 2015

Животные

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

Бактериологические методы

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 12 ноября 2015 г. № 82-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 ноября 2015 г. № 1949-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33675—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

Животные
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА
Бактериологические методы

Animals.
Laboratory Diagnostics of Brucellosis.
Bacteriological methods

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на все виды млекопитающих животных и устанавливает бактериологические методы лабораторной диагностики бруцеллеза.

Примечания
1 Данные методы применимы ко всем представителям рода *Brucella*.
2 Бактерии рода *Brucella* относятся ко II группе патогенности.

Настоящий стандарт также устанавливает общие требования к проведению молекулярно-генетических методов диагностики бруцеллеза (ПЦР).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 3—88 Перчатки хирургические резиновые. Технические условия

ГОСТ 12.0.004—90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.008—76 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.4.011—89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 975—88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 2222—95 Метанол технический. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4159—79 Йод кристаллический. Технические условия

ГОСТ 4232—74 Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4919.1—77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов

ГОСТ 5962—2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6259—75 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ISO 7864—2011 Иглы инъекционные однократного применения стерильные

ГОСТ ISO 7886-1—2011 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ 8074—82 Микроскопы инструментальные. Типы, основные параметры и размеры. Технические требования

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9656—75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13739—78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологичес-ких целей. Технические условия

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16280—2002 Агар пищевой. Технические условия

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18704—78 Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические условия

ГОСТ 22967—90 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22280—76 Натрия лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23519—93 Фенол синтетический технический. Технические условия

ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29230—91 (ИСО 835-4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ 32275—2013 Перчатки медицинские анатомические одноразовые. Технические требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **бруцеллез:** Инфекционное заболевание животных и человека, вызываемое бактериями рода *Brucella* семейства *Brucellaceae* порядка *Rhizobiales* класса α-*Proteocteria*.

3.1.2 **антиген бруцеллезный:** Поверхностные или цитоплазматические полисахаридно-белковые структуры бруцелл, на которые животными вырабатываются специфические антитела.

3.1.3 **реакция агглютинации:** Метод выявления специфических агглютинирующих антител в сыворотке крови животных.

3.1.4 **биовар:** Внутривидовая систематическая категория для обозначения штамма или совокупности штаммов бактерий со сходными ферментативными или антигенными свойствами, отличающимися от других вариантов этого вида.

3.1.5 **антитела бруцеллезные** (иммуноглобулины, ИГ, *Ig*): Особый класс гликопротеинов в сыворотке крови и тканевой жидкости животных в виде растворимых молекул, присутствующих на поверхности *B*-лимфоцитов в виде мембраносвязанных рецепторов и обладающих способностью избирательно связываться с антигенами конкретных бруцелл, обусловленной предварительным взаимодействием иммунной системы организма с возбудителем.

3.1.6 **полимеразная цепная реакция (ПЦР):** Молекулярно-генетический метод увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

3.1.7 **стандарт мутности:** Взвесь частиц стекла *Pyrex* в запаянной стеклянной пробирке, соответствующая 10 (5) международным единицам мутности.

Примечание — Стандарт мутности используют для визуального определения оптической концентрации бактериальных взвесей.

3.1.8 **сыворотки монорецепторные *A* и *M*:** Антивидовые бруцеллезные сыворотки крови кроликов к рецепторам культур *Brucella abortus* и *Brucella melitensis.*

Примечание — Монорецепторные сыворотки *A* и *M* используют для дифференциации культур бруцелл в пробирочной реакции агглютинации.

3.1.9 **сыворотка *S*-бруцеллезная:** Сыворотка крови кроликов, содержащая *S*-бруцеллезные антитела.

Примечание — *S*-бруцеллезную сыворотку используют для идентификации культур бруцелл в пластинчатой реакции агглютинации.

3.1.10 **сыворотка *R*-бруцеллезная:** Сыворотка крови кроликов, содержащая *R*-бруцеллезные антитела.

Примечание — *R*-бруцеллезную сыворотку используют для идентификации культур бруцелл в пластинчатой реакции агглютинации.

3.1.11 **бактериофаг:** Ультрамикроскопический внутриклеточный вирус бактерии, заражающий бактериальную клетку, размножающийся в ней и часто вызывающий ее лизис.

3.1.12 **корпускула бактериофага:** Частица бактериофага, имеющая форму сперматозоида, состоящая из белковой оболочки и внутриклеточного содержимого, представляющего собой фибриллы дезоксирибонуклеиновой кислоты.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

МППГГА — мясо-пептонный печеночный глюкозо-глицериновый агар;

МППГГБ — мясо-пептонный печеночный глюкозо-глицериновый бульон;

МППБ — мясо-пептонный печеночный бульон;

РА — реакция агглютинации;

ПЦР — полимеразная цепная реакция.

4 Условия выполнения исследований и требования безопасности

4.1 Условия выполнения исследований

4.1.1 Требования к лабораториям, проводящим работы по диагностике бруцеллеза, регламентируются нормативными и правовыми актами государства, принявшего стандарт.

4.1.2 Требования к персоналу — по ГОСТ ИСО/МЭК 17025.

4.1.3 К проведению исследований допускаются квалифицированные сотрудники, вакцинированные против бруцеллеза вакцинами, зарегистрированными на территории государства, принявшего стандарт, имеющие опыт работы с микроорганизмами II группы патогенности и владеющие методами бактериологических исследований.

4.2 Требования безопасности

4.2.1 Общие требования безопасности при проведении работ с биологическими объектами должны отвечать положениям ГОСТ 12.1.008.

4.2.2 Средства защиты работающих должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.4.011.

4.2.3 Обучение персонала безопасности труда в соответствии с ГОСТ 12.0.004.

4.2.4 Обеззараживание биологического материала, а также использованных индивидуальных средств защиты, инструментов и т.д. проводят путем кипячения в течение 30 мин или автоклавирования в течение 1 ч при давлении 0,20 МПа и температуре (132±2) °С.

5 Средства измерений, оборудование, питательные среды, реактивы, посуда, животные и материалы

5.1 Средства измерений и оборудование

Весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности не более ± 0,01 г.

Лупа бинокулярная.

pH-метр, обеспечивающий измерение с точностью до 0,05 ед. pH, с разрешением 0,01 ед. pH, оснащенный ручным или автоматическим определителем температуры.

Гомогенизатор перистальтического типа со скоростью вращения измельчающей насадки от 2000 до 27000 об./мин, объемом пробы для гомогенизации от 1 до 2500 $см^3$ и позволяющий получать частицы суспензии диаметром 10 — 50 мкм.

Микроскоп иммерсионный или стереоскопический по ГОСТ 8074.

Центрифуга лабораторная со скоростью вращения до 6000 об./мин.

CO_2-инкубатор или эксикатор стеклянный (микроанаэростат) с содержанием углекислого газа от 10 % до 15 %.

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 50 °С.

Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры от 0 °С до 10 °С по ГОСТ 16317.

Баня водяная с терморегулятором.

5.2 Питательные среды и реактивы

Агар микробиологический по ГОСТ 17206 или агар пищевой по ГОСТ 16280.
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.
Акрифлавин.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
Глицерин по ГОСТ 6259.
Глюкоза по ГОСТ 975.
Йод кристаллический по ГОСТ 4159.
Калий йодистый по ГОСТ 4232.
Калия гидроокись по ГОСТ 24363.
Кислота борная по ГОСТ 9656 или ГОСТ 18704.
Кислота соляная по ГОСТ 3118.
Кислота уксусная по ГОСТ 61.
Кристаллический фиолетовый (генцианвиолет) по ГОСТ 4919.1.
Малахитовый зеленый по ГОСТ 4919.1.
Метанол технический по ГОСТ 2222.
Метиленовый синий по ГОСТ 4919.1.
Натрий хлористый по ГОСТ 4233.
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.
Натрий лимоннокислый по ГОСТ 22280.
Раствор антисептический.
Раствор натрия хлорида 0,9 %-ный изотонический (физиологический раствор).
Физиологический раствор фенолизированный 0,5 %-ный.
Сафранин, 2 %-ный водный раствор по ГОСТ 4919.1.
Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.
Стандарт мутности оптический, эквивалентный 10 международным единицам.
Тиаминобромид.
Тионин.
Фенол по ГОСТ 23519.
Фуксин основной.

5.3 Посуда

Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 29230.
Пипетки Мора вместимостью 100 $см^3$.
Пробирки бактериологические по ГОСТ 25336.
Пробирки серологические Флоринского по ГОСТ 25336.
Пипетки пастеровские.
Стекла предметные по ГОСТ 9284.
Ступка фарфоровая по ГОСТ 9147.
Чашки бактериологические одноразового использования или стеклянные по ГОСТ 25336.

5.4 Животные и материалы

Бактериофаг бруцеллезный*.
Бумага фильтровальная марок ФБ-II или ФБ-III по ГОСТ 12026.
Добавки селективные, ингибирующие рост посторонней микрофлоры и не влияющие на рост бруцелл**.
Дозаторы одноканальные пипеточные переменного объема.
Иглы ветеринарные для взятия крови.
Иглы инъекционные по ГОСТ ISO 7864.
Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.
Наконечники для дозаторов вместимостью 0,2, 0,5 и 1,0 $см^3$.
Ножницы Купера (изогнутые).
Пакет для гомогенизации с фильтром.
Перчатки анатомические медицинские одноразовые по ГОСТ 32275.
Перчатки хирургические резиновые по ГОСТ 3.

---

* Примером может служить бактериофаг Тбилиси (*Tb*). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

** Примером селективной добавки служит добавка, содержащая во флаконе: полимиксин В – 2500 МЕ, бацитрацин – 12500 МЕ, циклогексимид – 50,0 МЕ, нистатин – 50000 МЕ, натамицин – 50,0 мг, налидиксовую кислоту – 2,5 мг, ванкомицин – 10,0 мг. Содержимое флакона может не содержать циклогексимид. Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Пинцеты медицинские по ГОСТ 21241.
Парафильм.
Свинки морские массой 300 —400 г.
Средство антикоагулянтное.
Сыворотка крови крупного рогатого скота или лошади (нормальная, стерильная).
Шпатели металлические.
Шприцы медицинские инъекционные многократного применения по ГОСТ 22967.
Шприцы медицинские инъекционные однократного применения по ГОСТ ISO 7886-1.
Штативы 100-гнездные для пробирок Флоринского.

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

5.6 Допускается применение готовых питательных сред, а также других сред, приготовленных по прописи производителя, предназначенных для культивирования бруцелл с проверенными ростовыми свойствами.

5.7 Допускается применение готовых растворов генциан фиолетового, Люголя, фуксина Циля, малахитового зеленого и 5%-ной спиртовой настойки йода.

5.8 Допускается использовать другие селективные добавки, обладающие аналогичным действием, указанным в 5.4.

5.9 Допускается использовать посуду одноразового применения.

6 Отбор проб

6.1 Общие требования

6.1.1 Материал для диагностики бруцеллеза отбирают от каждого животного в отдельности.

6.1.2 При взятии проб необходимо соблюдать меры, предупреждающие заражение людей и обсеменение объектов внешней среды в соответствии с требованиями, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

6.1.3 Пробы направляют в лабораторию и исследуют в день отбора или на следующий день.

6.2 Отбор проб патологического материала

6.2.1 Для бактериологического и молекулярно-генетического исследования на бруцеллез направляют абортированный плод с плодовыми оболочками (от многоплодных животных берут не менее трех плодов). От плодов крупных животных направляют селезенку, печень, желудок с содержимым, перевязанный со стороны пищевода и двенадцатиперстной кишки, и околоплодную жидкость.

6.2.2 Если в течение 24 —30 ч взятый материал доставить в лабораторию не представляется возможным, его консервируют стерильным 30 %-ным водным раствором химически чистого глицерина. Материал заливают консервирующей жидкостью в количестве, превышающем его объем в четыре —пять раз. Крупные плоды направляют в неконсервированном виде.

6.2.3 От абортировавшего животного одновременно с патологическим материалом направляют кровь (сыворотку крови) для молекулярно-генетического исследования на бруцеллез.

6.3 Отбор проб для прижизненной диагностики бруцеллеза

6.3.1 Общие требования

Для прижизненной диагностики бруцеллеза от животных берут:
- кровь;
- молоко;
- содержимое гигром, бурс и абсцессов.

При диагностическом убое дополнительно берут:
- селезенку;
- печень;
- лимфатические узлы: подчелюстные, заглоточные, предлопаточные, надколенные, подколенные, надвыменные, парааортальные, тазовые;
- семенники.

6.3.2 Отбор проб крови

6.3.2.1 Кровь морских свинок для получения сыворотки с последующим исследованием при постановке биопробы берут из краевой ушной вены или из сердца по 1—3 $см^3$ стерильными шприцами в стерильные пробирки подходящей вместимости.

6.3.2.2 Приготовление сыворотки

Сыворотку крови получают методом отстоя. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают в термостате при температуре 30 °С — 38 °С в течение 1 ч или при комнатной температуре в течение 8 — 10 ч, сгусток крови от стенок отделяют стальной спицей, а затем пробирки выдерживают в холодильнике при температуре 4 °С — 10 °С. Через 20 — 24 ч полученные сыворотки сливают в сухие стерильные пробирки и направляют для исследования в лабораторию.

6.3.2.3 Пробы крови от животных для бактериологического исследования берут стерильными шприцами в объеме 18 — 20 $см^3$, в которые предварительно набирают антикоагулянтное средство (глюгицир или аналогичное). Сразу после взятия крови иглы, не отсоединяя от шприцев, закрывают колпачками и перемешивают содержимое, переворачивая шприцы. Перед посевом использованные иглы заменяют стерильными.

6.3.3 Отбор проб молока

6.3.3.1 Перед взятием проб молока у коров (буйволиц) вымя обмывают теплой водой, соски обрабатывают 70 %-ным этиловым спиртом. Для исследования из каждой доли вымени берут последние порции молока в объеме 10 —15 $см^3$ в отдельные стерильные пробирки с резиновыми пробками.

6.3.3.2 У овец и коз пробы молока берут путем пункции цистерны вымени. Для этого животное фиксируют в боковом положении, вымя у основания соска протирают 70 %-ным этиловым спиртом и смазывают 5 %-ным раствором йода. Стерильным шприцем с иглой делают пункцию у основания соска и после попадания иглы в цистерну (о чем судят по свободному движению конца иглы) набирают в шприц молоко в объеме 10 $см^3$ и переносят его в стерильную пробирку с резиновой пробкой.

6.3.4 Отбор проб содержимого гигром, бурс и абсцессов

При взятии содержимого гигром, бурс и абсцессов в области поражения выстригают шерсть, кожный покров дезинфицируют 70 %-ным этиловым спиртом и смазывают 5%-ным раствором йода. Затем стерильным шприцем с ветеринарной иглой для взятия крови делают пункцию, отбирают содержимое гигромы, бурсы или абсцесса и переносят его в стерильную бактериологическую пробирку вместимостью 16 —18 $см^3$ с резиновой пробкой.

6.3.5 Упаковка и маркировка проб

6.3.5.1 Отобранные в стерильные пробирки пробы крови и молока помещают во влагонепроницаемую тару (полиэтиленовые пакеты или полистироловые контейнеры с крышками).

Пробы патологического материала упаковывают в пергаментную бумагу, маркируют и помещают во влагонепроницаемую тару (полиэтиленовые пакеты или полистироловые контейнеры с крышками).

6.3.5.2 Пробы маркируют с указанием:

- наименования хозяйства;
- вида, пола и возраста животного;
- инвентарного номера животного;
- наименования пробы;
- цели и вида исследования.

7 Бактериоскопический метод

7.1 Сущность метода

Сущность бактериоскопического метода заключается в окрашивании мазков и мазков-отпечатков из патологического материала и последующем микроскопическом выявлении клеток бруцелл.

7.2 Подготовка к исследованию

7.2.1 Подготовка растворов для окраски

7.2.1.1 Приготовление кристаллического фиолетового и генцианового фиолетового

Берут 1 г кристаллического фиолетового или генцианового фиолетового и растирают в ступке с 2 г фенола, добавляя небольшими порциями 96 %-ный этиловый спирт в объеме 10 $см^3$. После полного растворения краски в ступку при постоянном помешивании добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 200 $см^3$.

Срок хранения растворов при температуре от 2 °С до 10 °С — не более 6 мес.

7.2.1.2 Приготовление раствора Люголя

Для приготовления раствора Люголя в 10 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 2 г йодистого калия. Затем прибавляют 1 г кристаллического йода. Раствор выдерживают в течение 5 — 6 ч до полного растворения йода и добавляют 290 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 10 °С в склянке из темного стекла — не более 30 сут.

7.2.1.3 Приготовление карболового фуксина Циля

Для приготовления карболового фуксина Циля 1 г основного кристаллического фуксина растирают в ступке с 5 г кристаллического фенола и 0,5 $см^3$ глицерина, добавляя небольшими порциями 96 %-ный этиловый спирт в объеме 10 $см^3$, а затем при постоянном помешивании в ступку добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 200 $см^3$.

Срок хранения раствора при температуре 18 °С — 22 °С во флаконах из темного стекла с притертой пробкой —не более 6 мес.

Непосредственно перед работой к одной части полученного раствора карболового фуксина Циля добавляют девять частей дистиллированной воды.

7.2.1.4 Приготовление 0,75 %-ного и 1,0 %-ного водных растворов малахитового зеленого

Берут 0,75 или 1,00 г малахитового зеленого и растворяют в 100 $см^3$ кипящей дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2 ° С до 8 ° С — не более 1 мес.

7.2.1.5 Приготовление 0,5 %-ного раствора уксусной кислоты

Берут 0,5 $см^3$ уксусной кислоты и добавляют 99,5 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

7.2.1.6 Приготовление 1 %-ного водного раствора метиленового синего

Берут 1 г метиленового синего и растворяют в 100 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

7.2.1.7 Приготовление 2 %-ного водного раствора сафранина

Берут 2 г сафранина и растворяют в 100 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

7.2.1.8 Приготовление 5 %-ного спиртового раствора йода

Берут 5 г кристаллического йода и переносят в мерную колбу вместимостью 250 $см^3$, добавляют 10 г калия иодида и равные объемы дистиллированной воды и 96 %-ного этилового спирта, доводя раствор до объема 100 $см^3$.

Срок хранения раствора при температуре не выше от 2 °С до 25 °С в склянке из темного стекла — не более пяти лет.

7.2.1.9 Приготовление 3 %-ного спиртового раствора гидроокиси калия

Берут 3 г гидроокиси калия, растворяют в 5 $см^3$ дистиллированной воды и в мерной колбе вместимостью 200 $см^3$ доводят объем раствора 96 %-ным этиловым спиртом до 100 $см^3$. Декантируют прозрачный раствор.

Срок хранения раствора при температуре не выше 25 °С не более одного года.

7.2.2 Приготовление мазков

7.2.2.1 Из проб патологического материала по 6.2 делают по два мазка. При исследовании абортированных плодов готовят мазки-отпечатки из паренхиматозных органов (печени, селезенки), котиледонов плодовых оболочек и другого плотного материала, а жидкий материал (содержимое желудка, жидкости брюшной и грудной полостей, околоплодную жидкость) наносят на предметные стекла пастеровской пипеткой.

7.2.2.2 Для приготовления мазков-отпечатков используют чистые обезжиренные предметные стекла. Абортированный плод вскрывают, поверхность паренхиматозных органов, котиледонов плодовых оболочек и другого плодного материала стерилизуют, прикладывая раскаленный шпатель или обжигая факелом, смоченным 95 %-ным этиловым спиртом. Стерильными ножницами вырезают кусочки размером 1,5 × 1,0 × 1,5 см и прикладывают поверхности срезов к предметному стеклу (по три отпечатка на два предметных стекла). Мазки-отпечатки высушивают на воздухе в течение 5 мин и фиксируют над пламенем горелки. Мазки-отпечатки на одном предметном стекле окрашивают по Козловскому или Стампу, на другом — по Граму.

7.3 Проведение исследования

7.3.1 Окрашивание по Граму

Для окраски мазков по Граму на фиксированный мазок по 7.2.2 кладут кусочек фильтровальной бумаги, наносят кристаллический фиолетовый или генциан фиолетовый и выдерживают в течение 2 мин, после чего снимают бумагу, сливают краску, промывают дистиллированной водой и наносят на мазок раствор Люголя (мазок чернеет). Через 1 — 2 мин раствор сливают и наносят 96 %-ный этиловый спирт на 0,5 —1,0 мин. Затем мазок промывают дистиллированной водой и дополнительно окрашивают разведенным в соотношении 1:10 фуксином Циля в течение 1–2 мин. Краску сливают, промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

Если после нанесения раствора Люголя мазок не чернеет, то необходимо приготовить новый раствор.

7.3.2 Окрашивание по Козловскому

Для окраски по Козловскому фиксированный мазок по 7.2.2 окрашивают 2 %-ным водным раствором сафранина с подогреванием на водяной бане до появления пузырьков. Мазок промывают дистиллированной водой и дополнительно окрашивают 0,75 %-ным или 1 %-ным водным раствором малахитового зеленого в течение 0,5 —1,0 мин. Краску сливают, промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

7.3.3 Окрашивание по Стампу

Для окраски по Стампу фиксированный мазок по 7.2.2 окрашивают в течение 10 мин карболовым фуксином Циля, разведенным по 7.2.1.3 в соотношении 1:10. Мазок промывают дистиллированной водой, а затем 0,5 %-ным раствором уксусной кислоты в течение 30 с. Вновь тщательно промывают дистиллированной водой и докрашивают 1 %-ным раствором метиленового синего в течение 20 — 30 с. Краску сливают, промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

7.3.4 Полученные по 7.3.1 — 7.3.3 мазки микроскопируют под иммерсионным маслом.

7.4 Обработка результатов

При микроскопии окрашенных мазков, содержащих бруцеллы, должны наблюдаться мелкие, грамотрицательные, расположенные отдельно, попарно или кучно коккобактерии, окрашенные в красный цвет.

8 Культуральный метод

8.1 Сущность метода

Сущность культурального метода заключается в посеве патологического материала на питательные среды с последующим культивированием, идентификацией и дифференциацией выделенной культуры.

8.2 Подготовка к исследованию

8.2.1 Приготовление мясной воды

Для приготовления мясной воды свежее мясо крупного рогатого скота освобождают от костей, жира и сухожилий и пропускают через мясорубку. 500 г фарша заливают 1 $дм^3$ водопроводной воды и выдерживают в течение 15 — 18 ч в прохладном месте. Затем сливают полученный настой в колбу вместимостью 2 $дм^3$ или кастрюлю из нержавеющей стали вместимостью 3 $дм^3$ и кипятят в течение 30 — 40 мин на электрической или газовой плите, доливают дистиллированную воду до объема 1 $дм^3$ и фильтруют через ватно-марлевый или тканевый фильтр. Полученную мясную воду стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин.

Срок хранения мясной воды в стеклянных бутылях вместимостью 5 — 15 $дм^3$ при температуре от 2 °С до 25 °С — не более одного года.

8.2.2 Приготовление печеночной воды

Для приготовления печеночной воды свежую печень крупного рогатого скота освобождают от жира, канальцев, пленок и пропускают через мясорубку. В емкость из нержавеющей стали с крышкой вместимостью 3 $дм^3$ вносят 500 г фарша, заливают 1 $дм^3$ водопроводной воды, настаивают в течение 1 ч и кипятят на электрической или газовой плите при периодическом помешивании в течение 30 мин. После отстаивания фарш удаляют, а полученную жидкость доводят до 1 $дм^3$ дистиллированной водой и фильтруют через ватно-марлевый фильтр или тканевый фильтр. Полученную печеночную воду разливают по колбам и стерилизуют при температуре 115 °С и давлении 0,07 МПа в течение 30 мин.

Срок хранения печеночной воды в стеклянных бутылях вместимостью 5 — 15 $дм^3$ при температуре от 2 °С до 25 °С — не более одного года.

8.2.3 Приготовление МППГГБ

В емкость из нержавеющей стали с крышкой вместимостью 3 $дм^3$ наливают 610 $см^3$ мясной воды по 8.2.1 и 305 $см^3$ печеночной воды по 8.2.2, 10 г пептона, 5 г хлорида натрия и 20 — 30 г пищевого или микробиологического агара, предварительно промытого и хорошо отжатого. Смесь кипятят на электрической или газовой плите в течение 30 мин, устанавливают pH 7,2 — 7,4 10 %-ным раствором натрия гидроокиси, добавляют 10 г глюкозы и 20 $см^3$ глицерина и фильтруют через ватно-марлевый или тканевый фильтр. Полученную среду разливают в пробирки по 7–8 $см^3$ или во флаконы по

250 —300 $см^3$ соответствующей вместимости и стерилизуют при температуре 115 °С и давлении 0,07 МПа в течение 30 мин. pH среды после стерилизации составляет 6,8 —7,0.

Срок хранения МППГГБ в пробирках и флаконах при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 3 мес.

8.2.4 Приготовление МППГГА

В емкость из нержавеющей стали с крышкой вместимостью 3 $дм^3$ наливают 610 $см^3$ мясной воды по 8.2.1 и 305 $см^3$ печеночной воды по 8.2.2, 10 г пептона, 5 г хлорида натрия и 20 —30 г микробиологического агара, предварительно промытого и хорошо отжатого. Смесь кипятят на электрической или газовой плите в течение 1 ч, устанавливают pH 7,2 —7,4 10 %-ным раствором гидроокиси натрия и добавляют 10 г глюкозы и 20 $см^3$ глицерина и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Полученную среду разливают в пробирки или флаконы вместимостью 500 $см^3$ и стерилизуют при температуре 115 °С и давлении 0,07 МПа в течение 30 мин. pH среды после стерилизации составляет 6,8 —7,0.

Срок хранения МППГГА в пробирках и флаконах при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 3 мес.

8.2.5 Приготовление МППБ

МППБ готовят аналогично МППГГА по 8.2.3 без добавления агара, глюкозы и глицерина.

Срок хранения МППБ при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 3 мес.

8.2.6 Приготовление сывороточно-декстрозного агара

В емкость из нержавеющей стали с крышкой вместимостью 3$дм^3$ наливают 835 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 20 г пищевого или микробиологического агара, 10 г пептона, 5 г хлорида натрия и 165 $см^3$ мясной воды по 8.2.1. Полученную смесь кипятят на электрической или газовой плите при периодическом помешивании в течение 30 мин до расплавления агара, pH до стерилизации — 7,8. Затем стерилизуют в автоклаве текучим паром в течение 1 ч. После автоклавирования среду отстаивают в течение 1 ч, затем фильтруют через ватный или бумажный фильтр, доводят pH среды до 7,2–7,4 10 %-ным раствором гидроокиси натрия, разливают в колбы (пробирки, флаконы) и стерилизуют при температуре 115 °С и давлении 0,07 МПа в течение 30 мин. После стерилизации pH среды составляет 6,8 —7,0.

Срок хранения сывороточно-декстрозного агара при температуре от 2 °С до 8 °С —не более 3 мес.

Перед применением среду в колбах (пробирках, флаконах) расплавляют в кипящей водяной бане, охлаждают до температуры 50 °С —60 °С и добавляют 40 %-ный стерильный раствор глюкозы в количестве 1 % к объему питательной среды во флаконе (например, 2,5 $см^3$ 40 %-ного стерильного раствора глюкозы добавляют к 97,5 $см^3$ питательной среды).

8.2.7 Приготовление селективной добавки для внесения в питательные среды

Содержимое флакона по 5.4 растворяют в 5 $см^3$ 50 %-ного метилового спирта и перемешивают до образования гомогенной суспензии.

Раствор используют свежеприготовленным.

Полученное количество селективной добавки стерильно добавляют к 500 $см^3$ расплавленной питательной среды.

8.3 Проведение исследования

8.3.1 Перед посевом материала кожу абортированного плода по белой линии живота протирают тампоном, смоченным 5 %-ным раствором фенола, приготовленного путем растворения 5 г кристаллического фенола в 100 $см^3$ дистиллированной воды. Стерильными ножницами вскрывают брюшную стенку и грудную клетку плода, содержимое грудной и брюшной полостей пастеровскими пипетками высевают в одну бактериологическую пробирку с МППГГБ и после пипетирования полученную взвесь переносят в объеме по 1,0–1,5 $см^3$ на скошенную плотную питательную среду по 8.2.4 и 8.2.6 в двух пробирках. Содержимое желудка в объеме по 1 —2 $см^3$ высевают в две пробирки с МППГББ и в пять пробирок на скошенную плотную питательную среду по 8.2.4 и 8.2.6.

8.3.2 Лимфатические узлы, очищенные от жира и мышечных волокон, кусочки печени и селезенки размером 2,0 × 1,5 × 2,5 см погружают в 96 %-ный этиловый спирт на 1 с и обжигают, проведя над пламенем спиртовки. После обработки от лимфоузлов стерильными ножницами отрезают кусочки размером 1 —2 см. Подготовленный материал помещают в пакет для гомогенезации с фильтром, добавляют 4 —5 $см^3$ физиологического раствора и гомогенезируют с использованием гомогенизатора по 5.1.

Допускается приготовление суспензии путем растирания материала в стерильной фарфоровой ступке с добавлением физиологического раствора до получения однородной гомогенной суспензии.

Полученный гомогенат высевают пастеровской пипеткой по 0,1 —0,2 $см^3$ на поверхность предварительно подсушенных после скашивания плотных питательных сред по 8.2.4 и 8.2.6 в пробирках и на чашки Петри.

Допускается высев материала пастеровской пипеткой непосредственно из лимфатических узлов и органов. Для этого место прокола пастеровской пипеткой предварительно прижигают шпателем,

нагретым над пламенем спиртовки. Из каждого объекта проводят посев в одну бактериологическую пробирку с МППГГБ и после пипетирования полученную взвесь в объеме по 1,0 —1,5 $см^3$ переносят на скошенную плотную питательную среду по 8.2.4 и 8.2.6 в две пробирки.

8.3.3 Если в лабораторию доставлен только желудок плода, высев проводят не менее чем в десять пробирок на среды по 8.2.4-8.2.6.

8.3.4 При поступлении нескольких плодов от одного животного посевы делают из органов и тканей каждого плода отдельно.

8.3.5 Из плодовых оболочек вырезают кусочки тканей с утолщенными ворсинками и стенками, наличием на поверхности фибрина или гнойного экссудата (выбирают менее загрязненные участки без некротических изменений).

Для уничтожения посторонней микрофлоры кусочки плаценты помещают в чашку Петри и заливают 3 %-ным раствором гидроокиси калия на 30 мин. Затем их промывают стерильным физиологическим раствором, готовят из этого материала суспензию в гомогенизаторе или в ступке со стерильным песком и делают посев пастеровской пипеткой в пробирки со средами по 8.2.3, 8.2.4 или 8.2.6, содержащими бактериостатические красители: генцианвиолет в разведении 1:200000 (0,1 $см^3$ 0,5 %-ного спиртоводного раствора генцианвиолета на 100 $см^3$ среды) или кристаллвиолет в разведении 1:100000, генцианвиолет и малахитовую зелень в разведении каждой краски 1:200000, уксуснокислый натрий из расчета 12,5 мг на 100 $см^3$ среды, или селективную добавку, ингибирующую рост посторонней микрофлоры и грибов.

8.3.6 Содержимое бурс, гигром и абсцессов высевают на три–четыре чашки Петри с плотной питательной средой по 8.2.4 и 8.2.6, содержащей бактериостатические красители Во всех случаях вместо бактериостатических красителей допускается применение селективных добавок.

8.3.7 Пробы молока центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об./мин. Верхний слой (сливки) и осадок набирают в пастеровскую пипетку и по 0,1 —0,2 $см^3$ вносят в три–четыре чашки Петри со средами по 8.2.4 и 8.2.6, содержащими бактериостатические красители или селективные добавки.

8.3.8 Для выделения культуры бруцелл, в том числе и *Brucella canis,* кровь от животных с антикоагулянтом вносят по 10 —18 $см^3$ во флаконы, содержащие по 100 $см^3$ МППГГБ, и по 0,3 —0,5 $см^3$ в чашки Петри с плотной питательной средой по 8.2.4 и 8.2.6. Посевной материал равномерно распределяют по поверхности питательной среды. Через 25 —30 мин чашки Петри помещают в термостат при температуре 37 °С — 38 °С агаром вверх. Туда же помещают и флаконы с посевами.

Через семь суток инкубирования из посевов во флаконах делают пересев на три пробирки с плотной питательной средой по 8.2.4 и 8.2.6 и инкубируют при тех же условиях.

8.3.9 При исследовании материала от крупного рогатого скота половину пробирок и чашек Петри культивируют в термостате при температуре 37 °С — 38 °С, другую — в CO_2-инкубаторе с содержанием 5 % — 10 % углекислого газа или эксикаторе (микроанаэростате).

Примечание — Допускается культивирование в пробирках, которые плотно укупоривают резиновыми пробками и заливают парафином или обертывают ватно-марлевые пробки парафильмом.

8.3.10 Необходимое содержание углекислого газа в эксикаторе можно получить путем:

- внесения бикарбоната натрия и серной или соляной кислоты (0,48 г бикарбоната натрия и 5 $см^3$ 25 %-ного раствора кислоты или 0,4 г бикарбоната натрия и 0,35 $см^3$ концентрированной соляной кислоты на 1 $дм^3$ объема);
- сжигания ваты, смоченной спиртом. При этом пробирки и чашки с посевами должны занимать не более половины объема эксикатора.

8.3.11 Посевы, полученные по 8.3.1 —8.3.9, выдерживают в термостате при температуре 37 °С — 38 °С в течение 30 сут. Первичный осмотр посевов проводят через 48 — 72 ч. При отсутствии роста часть поверхности агара орошают посевным материалом.

В последующем посевы просматривают каждые 4 сут визуально, при необходимости через лупу или малом увеличении микроскопа.

При значительном росте посторонней микрофлоры (80 % и более засеянных пробирок) бактериологическое исследование прекращают.

8.4 Учет результатов

8.4.1 При просмотре посевов обращают внимание на характер роста бактерий.

8.4.2 На поверхности твердых питательных сред по 8.2.4 и 8.2.6 бруцеллы образуют мелкие, блестящие, выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью бесцветные колонии, имеющие в отраженном свете голубоватый оттенок, в падающем свете —сероватый. При длительном культивировании колонии мутнеют и приобретают более темную окраску, что связано с появлением пигмента.

8.4.3 В жидких питательных средах по 8.2.1, 8.2.3 и 8.2.5 бруцеллы образуют равномерное помутнение и пристеночное кольцо, возвышающееся над поверхностью бульона, а в дальнейшем небольшой осадок на дне пробирки. В отраженном свете пристеночное кольцо имеет голубоватый оттенок.

8.4.4 При обнаружении роста на жидких питательных средах и отсутствии характерного роста на твердых питательных средах из каждой пробирки готовят мазки, которые окрашивают одним из методов по 7.3.1—7.3.2, и делают пересев на чашки Петри с твердой питательной средой для выделения чистой культуры. Пересевы на чашках Петри культивируют так же, как и высевы из патологического материала. При отсутствии роста культуры бруцелл наблюдение за посевами прекращают по истечении 30 сут.

9 Идентификация выделенных культур

9.1 Пластинчатая реакция агглютинация

9.1.1 Подготовка к исследованию

9.1.1.1 Подготовка двухсуточных культур бруцелл

Для идентификации используют двухсуточные агаровые культуры (изоляты) бруцелл, выделенные из патологического материала. С этой целью выделенные культуры пересевают бактериологической петлей штрихом на поверхность плотной питательной среды по 8.2.4, 8.2.6, скошенной в пробирках. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37 °С —38 °С в течение двух суток. Выращенные культуры исследуют непосредственно после извлечения из термостата.

Примечание — Допустимый срок хранения культур при температуре от 2 °С до 8 °С —не более 14 сут.

9.1.1.2 Подготовка *R*- и *S*-бруцеллезных агглютинирующих сывороток

R- и *S*- бруцеллезные агглютинирующие сыворотки разводят 0,5 %-ным фенолизированным физиологическим раствором до рабочего разведения. Разведенные сыворотки хранят при температуре от 2 °С до 8 °С и используют в течение 30 сут.

9.1.2 Проведение исследования

На предметное стекло раздельно наносят по одной капле *R*- и *S*-бруцеллезных сывороток по 9.1.1 и физиологического раствора. Испытуемую культуру бактериологической петлей отдельно перемешивают в капле *S*-, *R*-бруцеллезной сыворотки и физиологического раствора. Параллельно ставят контроли: со стандартными *S*- и *R*-бруцеллезными сыворотками и гомологичными антигенами.

9.1.3 Учет и оценка результатов реакции агглютинации

При положительной РА в капле сыворотки образуется четко выраженный агглютинат в виде хлопьев или комочков, а жидкость просветляется, что особенно заметно при покачивании стекла. В физиологическом растворе наблюдается гомогенная взвесь без признаков просветления жидкости.

Реакцию учитывают визуально в течение 1–3 мин и оценивают в крестах:

- «++++» (четыре креста) — полное просветление жидкости с образованием четко выраженного агглютината —положительная реакция;
- «+++» (три креста) — неполное просветление жидкости с выраженным агглютинатом — положительная реакция;
- «++» (два креста) — неполное просветление жидкости со слабо выраженным агглютинатом — положительная реакция;
- «+» (один крест) — жидкость без просветления с едва заметным агглютинатом —сомнительная реакция;
- «-» (минус) — просветление жидкости не наступило, смесь гомогенная —отрицательная реакция.

Результаты реакции с испытуемой культурой считают достоверными, если в контролях *R*- и *S*-бруцеллезных сывороток с гомологичными антигенами агглютинация четко выражена не менее чем на два креста, а с физиологическим раствором — отсутствует.

9.1.4 Обработка результатов

Культуры, обладающие типичными для бруцелл морфологическими, культуральными (см. раздел 8) и тинкториальными свойствами (см. раздел 7), а также дающие положительную реакцию агглютинации с *S*- или *R*-бруцеллезной сывороткой или с обеими сыворотками одновременно при отсутствии самоагглютинации в физиологическом растворе, считают бруцеллами.

9.2 Методы определения диссоциации культур бруцелл

9.2.1 Проба на стекле с раствором акрифлавина

На предметное стекло наносят каплю раствора акрифлавина в разведении 1:1000 в дистиллированной воде, в которой суспензируют с помощью бактериологической петли испытуемую культуру. У диссоциированных культур (*R*- форма) в течение 1 — 2 мин наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев. Взвесь культур бруцелл в *S*-форме остается гомогенной.

9.2.2 Реакция термоагглютинации

Взвесь двухсуточной агаровой культуры бруцелл в физиологическом растворе по 9.1.1 с содержанием по оптическому стандарту мутности 1 млрд/см^3 микробных клеток в объеме 4–5 см^3 прогревают в пробирке вместимостью 20 см^3 на водяной бане при температуре 90 °С в течение 30 мин.

Результаты учитывают через 30 мин, 1 ч и через 24 ч при комнатной температуре.

При наличии диссоциации наступает выраженная агглютинация клеток бруцелл с формированием осадка, тогда как суспензия недиссоциированной культуры бруцелл в *S*-форме остается гомогенной.

9.2.3 Окраска колоний по Уайт-Вилсону

Двухсуточную агаровую культуру бруцелл по 9.1.1 разводят физиологическим раствором с таким расчетом, чтобы она по мутности соответствовала 10 ЕД оптического стандарта мутности. Полученную суспензию в объеме 3 см^3 смешивают с 2 см^3 физиологического раствора и делают десятикратные разведения до 10^{-6}, используя для каждого разведения отдельную пипетку, и высевают по 0,1см^3 на четыре–шесть чашек Петри с МППГГА. Поверхность агара в чашках равномерно орошают посевным материалом, выдерживают на горизонтальной поверхности стола в течение 20–30 мин и инкубируют при температуре 37 °С — 38 °С агаром вверх в течение 4–5 сут.

Окраску колоний проводят рабочим раствором кристаллического фиолетового, приготовленного по 7.2.1.1 в разведении 1:2000. В чашку Петри с изолированными колониями бруцелл пастеровской пипеткой с грушей вносят осторожно без напора рабочий раствор кристалвиолета. Через 30 с раствор краски удаляют с помощью пипетки с грушей, сливая в дезинфицирующую жидкость (3 %-ный раствор фенола или 5 %-ный раствор хлорамина). Колонии просматривают под бинокулярной лупой.

Колонии бруцелл в *R*-форме (диссоциированные) имеют равномерно окрашенный широкий периферический ободок синего или фиолетового цвета и менее интенсивно окрашенную поверхность такого же цвета, иногда с исчерченностью.

Колонии бруцелл в *S*-форме имеют тонкий периферический ободок, окрашенный в синий или фиолетовый цвет. Центральная часть колоний светло-желтого цвета (не окрашивается).

9.3 Методы дифференциации бруцелл

Для дифференциации бруцелл используют следующие тесты:

- рост в присутствии CO_2;
- образование H_2S;
- устойчивость к фуксину и тионину;
- способность агглютинироваться монорецепторными *A, M и R* бруцеллезными сыворотками;
- лизирование фагом.

9.3.1 Образование сероводорода (H_2S)

9.3.1.1 Подготовка к исследованию

В качестве реактива применяют насыщенный водный раствор уксуснокислого свинца (30 г свинца растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды), которым пропитывают полоски фильтровальной бумаги размером 1 × 8 см. Пропитанные полоски фильтровальной бумаги высушивают при температуре 18° С — 20 °С в течение 20 мин.

Срок хранения пропитанных полосок фильтровальной бумаги в банке из темного стекла с притертой пробкой — не более 2 мес.

9.3.1.2 Проведение исследования

Двухсуточную взвесь культуры бруцелл по 9.1.1 в физиологическом растворе концентрацией 2×10^9/см^3 микробных клеток по оптическому стандарту мутности на 10 ЕД засевают в пробирку бактериологической петлей на скошенную поверхность печеночного агара по 8.2.4. Полоску фильтровальной бумаги зажимают между пробиркой и ватной пробкой так, чтобы нижний ее конец свободно свисал над верхним краем посева и не касался поверхности питательной среды.

Ватная пробка должна быть рыхлой, не задерживать выхода из пробирки углекислоты.

Пробирки с посевами помещают в термостат при температуре 37 °С — 38 °С на 6 сут.

9.3.1.3 Учет результатов

Показателем интенсивности образования сероводорода является почернение нижнего конца полоски, которое измеряют в миллиметрах.

Результаты учитывают через каждые 2 сут в течение 6 сут. При каждом учете тест-полоску заменяют новой. Для окончательной оценки способности культуры к образованию сероводорода полученные три значения суммируют.

Суммарное значение почернения тест-полосок, свидетельствующее о продуцировании сероводорода, составляет для культур:

- *B. suis* (биовар 1) — 12–20 мм;
- *B. abortus* (биовар 1) — 5–7 мм;

- *B. neotomae* —5–8 мм.

Культура *B. melitensis* (биовар 1), как правило, не образует сероводорода или вызывает только слабо выраженное почернение тест-полоски. Культуры *B. ovis* и *B .canis* сероводород не продуцируют.

9.3.2 Определение редуцирующей активности в отношении красок

9.3.2.1 Подготовка к исследованию

Для приготовления исходных растворов фуксина и тионина в разведении 1:1000 во флаконах вместимостью 200 $см^3$ смешивают 0,1 г краски, 20 $см^3$ 96 %-ного этилового спирта и 80 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения исходных растворов фуксина и тионина в темном месте — не более 6 — 10 мес.

Для приготовления питательной среды МППГГА с красками к 100 $см^3$ охлажденного до температуры 50 °С — 60 °С агара с соблюдением правил асептики добавляют 2 $см^3$ исходного раствора краски для получения разведения 1:50000.

Питательную среду с краской разливают пипеткой по 20 — 25 $см^3$ в чашки Петри и подсушивают при комнатной температуре, не открывая чашки.

Срок хранения среды с красками в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 10 — 15 сут.

Обесцвеченные среды для тестирования не используют.

9.3.2.2 Проведение исследования

Взвесь бруцелл готовят из двухсуточной агаровой культуры. Посевы испытуемых культур проводят бактериологической петлей из взвеси, содержащей 2 млрд/$см^3$ микробных клеток, на среду МППГГА с фуксином и тионином по 9.4.2.1 и на среду МППГГА без добавления красок (контроль). Одну петлю взвеси засевают путем нанесения пяти отдельных штрихов на поверхность агара. На одну чашку Петри можно одновременно засевать четыре—шесть культур, предварительно разделив чашку Петри на четыре—шесть секторов.

Чашки с посевами переворачивают агаром вверх и выдерживают в термостате при температуре 37 °С — 38 °С в течение 3 сут.

9.3.2.3 Учет результатов

Учет результатов проводят через трое суток инкубации по следующей схеме:

- выраженный рост культуры во всех штрихах «++++»;
- выраженный рост в первых двух и более слабый в последующих штрихах «+++»;
- умеренно выраженный рост в первых двух штрихах и слабый или отсутствие роста в остальных штрихах «++»;
- слабый сплошной рост или отдельные колонии в первых двух штрихах «+».

9.3.3 Реакция агглютинации с монорецепторными *A* и *M* бруцеллезными сыворотками

9.3.3.1 Проведение испытания

Для проведения РА монорецепторные *A* и *M* бруцеллезные сыворотки разводят последовательно двукратно, получая соотношения 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80 в объеме 0,5 $см^3$. В качестве антигена используют взвесь двухсуточной агаровой культуры бруцелл в физиологическом растворе в концентрации 2 млрд/$см^3$ микробных клеток по оптическому стандарту мутности.

Антиген добавляют по 0,5 $см^3$ во все пробирки таким образом, разведение сыворотки удваивается (1:10, 1:20 и т. д.).

Пробирки со смесью сыворотки и антигена выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 16 —18 ч, а затем в течение 1 ч при комнатной температуре.

9.3.3.2 Учет результатов

Положительная РА в разведении сыворотки 1:20 с оценкой не менее чем на два креста позволяет отнести культуру бруцеллы к виду *B.abortus* или *B. melitensis.*

9.3.4 Определение чувствительности культур бруцелл к фагу *Tb*

Бруцеллезный фаг *Tb* избирательно лизирует бруцеллы вида *B. abortus*, находящиеся в *S*-форме.

9.3.4.1 Подготовка к исследованию

Для определения чувствительности бруцелл к лизису бактериофагом используют два его разведения: 1×10^5 корпускул/$см^3$ и 1×10^9 корпускул/$см^3$. Разведения бактериофага готовят путем десятикратных разведений исходной культуры в физиологическом растворе.

9.3.4.2 Проведение исследования

Для исследования используют МППГГА в чашках Петри с концентрацией агара 1,5 % —1,8 %. Среду и взвесь двухсуточной агаровой культуры бруцелл в физиологическом растворе по 9.1.1 с концентрацией 1 млрд/$см^3$ микробных клеток по ОСО мутности на 10Е подсушивают при комнатной температуре в течение 18 — 20 ч.

Взвесь культуры бруцелл подсушивают при комнатной температуре в течение 18 — 20 ч. в объеме 0,4 - 0,5 $см^3$ наносят на поверхность МППГГА в чашках Петри и тщательно распределяют по его поверхности. Избыток посевного материала удаляют пастеровской пипеткой.

Засеянные чашки Петри подсушивают в течение 1 ч при температуре 37 °С — 38 °С до полного впитывания в агар посевного материала. После чего на поверхность питательной среды в два разных места наносят пастеровской пипеткой по одной капле 0,05 $см^3$ бактериофага каждого разведения. Чашки наклоняют, чтобы капли бактериофага стекли по поверхности питательной среды двумя дорожками. Контролем являются посевы культуры бруцелл на среде без внесения бактериофага. Посевы помещают в термостат агаром вверх и инкубируют в течение четырех —пяти суток при температуре 37 °С — 38 °С.

9.3.4.3 Учет результатов

Результаты исследования учитывают в крестах:

- полный лизис культуры на месте нанесения фага (или линии стекания) «++++»;
- лизис с небольшим количеством отдельных колоний бруцелл или слившиеся бляшки (участок лизиса) в виде сот «+++»;
- резко ослабленный рост культуры бруцелл и небольшое количество бляшек «++»;
- очень слабый лизис культуры бруцелл «+»;
- отсутствие лизиса культуры бруцелл «–».

За положительный результат чувствительности к лизису фагом принимают лизис культуры бруцелл не менее чем на два креста.

Дифференциальные свойства видов и биоваров рода *Brucella* приведены в приложении А.

10 Биологический метод

10.1 Подготовка к исследованию

Для постановки биологической пробы используют морских свинок (не менее двух животных), не реагирующих на бруцеллез при серологическом исследовании в пробирочной РА. Пробы сыворотки крови от животных в разведении 1:5 не должны агглютинировать *S*-бруцеллезный антиген.

10.2 Проведение исследования

Из органов и содержимого желудка абортированного плода готовят суспензию на стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:10 и вводят морской свинке подкожно с внутренней стороны бедра в объеме 1 $см^3$.

Из плаценты и плодовых оболочек, предварительно обработанных тампонами, смоченными дезинфицирующим раствором, и подсушенных сухими стерильными тампонами, вырезают кусочки размером 0,5 × 0,5 см, фламбируют на пламени горелки, растирают в фарфоровой ступке со стерильным песком или гомогенизируют и заливают физиологическим раствором в соотношении 1:10. Полученную суспензию вводят морской свинке подкожно в объеме 1 $см^3$.

Содержимое гигром, бурс вводят морским свинкам подкожно в объеме 0,2 — 0,3 $см^3$. При этом необходимо учитывать возможность гибели животного от сопутствующей микрофлоры, особенно стрептококков.

Пробы молока центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об./мин. Морской свинке вводят подкожно 2 — 3 $см^3$ материала из верхнего слоя (сливки) и осадка молока после центрифугирования.

Через 15, 25 и 40 сут после заражения у морских свинок берут кровь в объеме 1 — 2 $см^3$ из ушной вены путем надреза или из сердца путем пункции и готовят сыворотку, которую исследуют в РА в пробирках в разведениях от 1:10 до 1:80.

При положительной реакции агглютинации в разведении 1:10 и выше морских свинок убивают. В случае необходимости получения культуры возбудителя материал от них исследуют бактериологически (раздел 8). Высевы делают пастеровскими пипетками в одну пробирку с бульоном и две пробирки с агаром из паховых, подчелюстных, заглоточных, парааортальных лимфатических узлов (правых и левых), селезенки (два высева), печени и костного мозга. Посевы культивируют по 8.3.8.

10.3 Учет результатов

При отрицательной РА у морских свинок биопробу считают отрицательной, подопытных животных убивают, бактериологическое исследование не проводят.

При выделении культуры бруцелл на питательных средах биологическое исследование прекращают, а ранее зараженных морских свинок убивают.

Результат исследования на бруцеллез считают положительным при получении у морской свинки положительной РА в разведении сыворотки крови 1:10 и выше, даже если из исходного материала культура бруцелл не выделена.

11 Молекулярно-генетический метод исследований

11.1 Молекулярно-генетическое исследование на бруцеллез проводят в полимеразной цепной реакции (ПЦР), руководствуясь инструкциями по применению конкретных тест-систем.

11.2 Молекулярно-генетическое исследование методом ПЦР проводят в случае аборта и (или) при появлении у животных других клинических признаков, вызывающих подозрение на бруцеллез, а также при получении положительных и (или) сомнительных результатов серологического исследования на бруцеллез животных, не иммунизированных противобруцеллезными вакцинами из хозяйств, благополучных по данному заболеванию и для идентификации культур бруцелл (изолятов), выделенных при исследовании патологического материала.

11.3 Для исследования в ПЦР используют тот же патологический материал, что и для бактериологической диагностики.

Приложение А
(справочное)

Дифференциальные свойства видов и биоваров рода *Brucella*

А.1 Дифференциальные свойства видов и биоваров рода *Brucella* приведены в таблице А.1.

Таблица А.1

Вид	Биовар	Морфология колоний[б]	Потребность в сыворотке	Потребность в CO_2	Продукция H_2S	Рост на средах[в]		Агглютинация сыворотками				Лизис бактериофагом Tb[а],		Основной хозяин
						тионин	фуксин	*A*	*M*	*S*	*R*	концентрация $1 \cdot 10^5$	концентрация $1 \cdot 10^9$	
B. abortus	1	*S*	-[о]	+[г]	+	-	+	+	-	+	-	+	+	Крупный рогатый скот и другие представители семейства полорогих
	2			+[г]	+	-	-	+	-					
	3[б]			+[г]	+	+	+	+	-					
	4			+[г]	+	-	+[д]	-	+					
	5			-	-	+	+	-	+					
	6[б]			-	-	+	+	+	-					
	9			+ или -	+	+	+	-	+					
B. melitensis	1	*S*	-	-	-	+[е]	+	-	+	+	-	-	-	Овцы и козы
	2		-	-	-	+	+	+	-					
	3		-	-	-	+	+	+	+					
B. suis	1	*S*	-	-	+	+	-[ж]	+	-	+	-	-	+	Биовар 1: свиньи
	2		-	-	-	+	-	+	-					Биовар 2: свиньи, зайцы
	3		-	-	-	+	+	+	-					Биовар 3: свиньи
	4		-	-	-	+	-[и]	+	+					Биовар 4: северные олени
	5		-	-	-	-	-	-	+					Биовар 5: дикие грызуны
B. neotomae	-	*S*	-	-	+	-[к]	-	+	-	+	-	-[л]	+	Пустынная крыса[п]
B. ovis	-	*R*	+	+	-	+	-[и]	-	-	-	+	-	-	Бараны
B. canis	-	*R*	-	-	-	+	-[и]	-	-	-	+	-	-	Собаки
B. ceti	-	*S*	-	-	-	+[е]	+	+	-[и]	+	-	+[м]	-	Китообразные
B. pinipedialis	-	*S*	-	-	-	+	+	+	-[и]	+	-	+[м]	-	Ластоногие
B. microti	-	*S*	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	Овцы и козы
B. inopinata	-	*S*	-	-	+	+	+	-	+	+	-	н	-	*

Окончание таблицы А.1

Вид	Биовар	Морфология колоний[б]	Потребность в сыворотке	Потребность в CO_2	Продукция H_2S	Рост на средах [в]		Агглютинация сыворотками				Лизис бактериофагом Tb[а]		Основной хозяин
						тионин	фуксин	*A*	*M*	*S*	*R*	концентрация $1 \cdot 10^5$	концентрация $1 \cdot 10^9$	

[а] Фаг Тбилиси (*Tb*).
[б] Форма колоний: *S* - гладкая, *R* - шероховатая.
[в] Концентрация красителя в сывороточно декстрозной среде 20 мг/см^3.
[г] Обычно позитивные при первичном выделении культур.
[д] Некоторые изоляты чувствительные к основному фуксину.
[е] Некоторые штаммы ингибируются красителями.
[ж] Некоторые штаммы резистентны к основному фуксину.
[и] Негативные для большинства штаммов.
[к] Растут при концентрации тионина 10 мг/см^3.
[л] Ингибируют рост, культура растет в виде мельчайших колоний.
[м] Некоторые штаммы лизируются фагом.
[н] Неполный лизис или резистентны к фагу в дозе $1 \cdot 10^9$.
[о] *Brucella abortus biovar* 2, при первичном выделении культуры требует внесения сыворотки в питательную среду.
[п] *Neotomae lepida*.
[*] Выделен один изолят от человека.
Примечание: Знак «+» — положительный результат теста, «-» —отрицательный результат теста, «—» – данные отсутствуют.

УДК 619:616.98:579.841.93:616.076:006.354 МКС 11.220

Ключевые слова: бруцеллез, диагностика, бактериоскопия, бактериология, биопроба, пластинчатая реакция агглютинации, дифференциация, диссоциация

Редактор *А.Э. Попова*

Корректор *Е.Д. Дульнева*

Компьютерная верстка *Д.М. Кульчицкого*

Подписано в печать 18.02.2016. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 2,33. Тираж 32 экз. Зак. 134.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru