

Утверждаю
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации,
Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации
Г.Г.ОНИЩЕНКО
30 января 2003 года

Дата введения -
1 мая 2003 года

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

ПРОФИЛАКТИКА И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА ЛЮДЕЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ МУ 3.1.7.1189-03

1. Методические указания разработаны: Министерством здравоохранения Российской Федерации (Федоров Ю.М., Жилина Н.Я., Хадарцев О.С.), ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Желудков М.М., Толмачева Т.А.), ГУ Противочумный центр Минздрава России (Горшенко В.В.).

2. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра Российской Федерации Г.Г. Онищенко 30 января 2003 г. Введены в действие 1 мая 2003 г.

3. Введены взамен "Методических указаний по профилактике и лабораторной диагностике бруцеллеза людей" (1980).

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Методические указания "Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей" разработаны в помощь специалистам санитарно-эпидемиологических, лечебно-профилактических и противочумных учреждений.

1.2. Настоящие Методические указания обязательны для выполнения на всей территории Российской Федерации санитарно-эпидемиологическими, лечебно-профилактическими и противочумными учреждениями.

2. ОБЩИЕ ДАННЫЕ

Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации остается неблагоприятной и определяется наличием бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных - мелкого и крупного рогатого скота, являющихся основными источниками возбудителя бруцеллеза для людей. На протяжении последнего десятилетия в стране ежегодно регистрируется от 400 до 700 больных с впервые диагностированным бруцеллезом. Больные регистрируются преимущественно на территориях с развитым овцеводством, что в значительной степени связано с более выраженным течением у людей

заболевания бруцеллезом козье-овечьего вида. В среднем 47% больных выявляются в Северо-Кавказском районе, до 15% - в Поволжском районе.

В течение последнего десятилетия почти в 3 раза увеличился удельный вес детей в возрасте до 14 лет в общей заболеваемости "впервые диагностированного" бруцеллеза - с 5 до 15%, что является показателем напряженной эпидситуации по этой инфекции. Периодически регистрируются групповые заболевания людей с числом заболевших 10 и более.

Относительное снижение заболеваемости людей бруцеллезом за последние 10 лет нельзя признать достоверным, поскольку оно обусловлено в основном неудовлетворительными выявлением и диагностикой бруцеллеза, проходящего под другими диагнозами. В целом по стране в учреждениях здравоохранения в 2 раза снизилось число диагностических лабораторных исследований на бруцеллез, в 4 раза сократились бактериологические исследования материала от больных людей. Лабораториями отделов особо опасных инфекций типирование выделенных культур не проводится, что, наряду с недостаточным числом бактериологических исследований, препятствует эффективному проведению противоэпидемических мероприятий, осуществлению мониторинга за циркуляцией возбудителя на территории страны. Недостатки в лабораторной диагностике бруцеллеза не позволяют проводить необходимое этиотропное лечение больных бруцеллезом людей, что приводит к хроническому течению заболевания и к последующей инвалидности.

Ослабление контроля за проведением противобруцеллезных мероприятий на животноводческих объектах, несоблюдение руководителями животноводческих хозяйств и владельцами частного скота ветеринарно-санитарного законодательства способствует появлению и распространению скрытых очагов инфекции, о чем свидетельствует выявление больных людей на территориях, где не зарегистрированы больные бруцеллезом сельскохозяйственные животные.

Бруцеллез по-прежнему занимает первое место среди профессиональных заболеваний инфекционной и паразитарной этиологии. Однако ежегодно сокращается лабораторное обследование на бруцеллез при плановых профосмотрах контингентов, профессионально связанных с риском заражения бруцеллезом. Практически не проводятся профосмотры с лабораторным обследованием на бруцеллез работников коммерческих хозяйств и предприятий.

Сложившееся положение является следствием ослабления внимания руководителей учреждений госсанэпиднадзора и здравоохранения к проблеме бруцеллеза; недостаточной координации деятельности учреждений санитарного и ветеринарного надзора в организации и проведении противобруцеллезных мероприятий; сокращения лабораторных, в т.ч. бактериологических, диагностических исследований материала от людей; неудовлетворительного выявления и регистрации профессиональных заболеваний, ослабления контроля за организацией и проведением профосмотров на бруцеллез контингентов, профессионально связанных с риском заражения бруцеллезом; отсутствия зарегистрированных иммунобиологических препаратов для лабораторной диагностики бруцеллеза у людей; недостаточного уровня подготовки специалистов лечебно-профилактических учреждений по вопросам профилактики, лабораторной диагностики, клиники и лечения бруцеллеза.

Настоящие Методические указания отражают современные подходы к эпидемиологическому надзору за бруцеллезной инфекцией, профилактике и лабораторной диагностике бруцеллеза.

3. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА БРУЦЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Бруцеллез - острое инфекционно-аллергическое, зоонозное заболевание с высокой потенциальной возможностью перехода в хроническую форму. Возбудитель бруцеллеза

относится ко II группе патогенности, пути и факторы передачи инфекции разнообразны, человек в любом возрасте высоковосприимчив к бруцеллезу, заболевание длительное, трудно поддающееся лечению, поражает практически все органы и системы организма и, как правило, сопровождается хронизацией инфекционного процесса с нередкой последующей инвалидностью больного.

3.1. Общие сведения о возбудителе заболевания

Возбудителем бруцеллеза являются микроорганизмы, относящиеся к роду *Brucella*. По международной классификации род *Brucella* состоит из шести самостоятельных видов, которые подразделяются на ряд биоваров. Так, *B.melitensis* состоит из 3 биоваров, носителями которых являются козы и овцы. *B.abortus* представлен 7 биоварами, основной хозяин возбудителя - крупный рогатый скот. *B.suis* состоит из 5 биоваров, основной хозяин - свиньи, однако носителем 2-го биовара являются также зайцы, 4-го биовара - олени, а 5-го - мышевидные грызуны. *B.neotomae* была обнаружена у пустынных кустарниковых крыс. *B.ovis* выделяется от овец, а *B.canis* - от собак. На территории России циркулируют *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.ovis*, а с 1994 г. регистрируются случаи выделения от собак бруцеллы вида *canis*.

Определение видов и биоваров бруцелл на конкретных территориях и в очагах инфекции имеет важное эпидемиологическое и эпизоотологическое значение с точки зрения классификации очагов, оценки степени напряженности эпидемического и эпизоотического процессов, установления фактов миграции бруцелл с одного вида животных на другой (особенно опасна миграция *B.melitensis* на крупный рогатый скот), выявления путей распространения возбудителя, выбора тактики лечения и др.

Бруцеллы относятся к патогенным микроорганизмам. Разные виды бруцелл и даже разные штаммы одного и того же вида отличаются неодинаковой вирулентностью. Наиболее патогенны для человека бруцеллы вида *melitensis*, которые нередко вызывают эпидемические вспышки заболевания. *B.abortus* и *B.suis* вызывают, как правило, спорадические, клинически выраженные случаи заболевания. Что касается *B.ovis*, *B.neotomae* и *B.canis*, то известны случаи заболевания людей, заразившихся от собак бруцеллами вида *canis*, однако эпидемиологическая значимость этих видов бруцелл до конца не изучена.

Бруцеллы всех шести видов практически неотличимы друг от друга по морфологическим признакам. Бруцеллы - микроорганизмы шаровидной, овоидной или палочковидной формы. Размеры бруцелл в среднем равны 0,3 - 0,6 мкм для кокковых форм и 0,6 - 2,5 мкм для палочковидных. Спор не образуют, жгутиков не имеют, неподвижны. Красятся анилиновыми красками. При определенных условиях (воздействие специфическим бактериофагом, выращивание на средах с добавлением 10% иммунной сыворотки и т.п.) образуют капсулу; грамотрицательны; характеризуются замедленным ростом на питательных средах; некоторые штаммы требуют для роста добавления 5 - 10% CO₂, особенно при первоначальном выделении. Оптимальная температура для роста бруцелл 37 °С, оптимальная рН - 6,8 - 7,2. Бруцеллы подвержены изменчивости и могут переходить из S-формы в R- и L-формы.

Бруцеллы обладают высокой инвазивностью и могут проникать через неповрежденные слизистые покровы, относятся к внутриклеточным паразитам, но могут также находиться вне клетки.

Бруцеллы малоустойчивы к высокой температуре. В жидкой среде при +60 °С они погибают через 30 мин., при +80 - 85 °С - через 5 мин., при кипячении моментально. Обладают большой устойчивостью к воздействиям низких температур, длительно сохраняются в пищевых продуктах, в т.ч. хранящихся в холодильниках и морозильных камерах. Под действием прямых солнечных лучей бруцеллы гибнут через 4 - 5 часов, в почве сохраняют жизнеспособность до 100 дней, в воде - до 114 дней.

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

3.2. Эпизоотология бруцеллеза

Бруцеллезом болеют в основном сельскохозяйственные животные - овцы, козы, крупный рогатый скот, свиньи, верблюды, северные олени и др. Причем каждый вид животных обычно поражается определенным видом возбудителя. Однако бруцеллы вида *melitensis* и *abortus* могут мигрировать на других животных. Это имеет большое эпидемиологическое значение, особенно в случае миграции наиболее опасного для человека вида *melitensis* на крупный рогатый скот.

Микроб проникает в организм животного через слизистые оболочки пищеварительного тракта, половых и дыхательных путей, конъюнктиву, а также через кожные покровы в случае нарушения их целостности.

Клиническое течение бруцеллеза у животных характеризуется полиморфизмом, основным признаком является аборт. Аборты имеют решающее значение в эпизоотологии и эпидемиологии бруцеллеза, т.к. сопровождаются массивным и длительным выделением бруцелл с абортированным плодом, плацентой, выделениями из матки и влагалища, при метритах и других поражениях половых и родовых органов. Больные животные могут выделять бруцеллы с молоком и мочой. Таким образом, выделение большого количества бруцелл при абортах и родах больных животных, а также с молоком является основным фактором распространения инфекции в хозяйстве, а нередко и заражения людей.

Помимо абортов бруцеллез у животных может сопровождаться поражением суставов (артриты), синовиальной системы (тендовагиниты, бурситы), половой сферы (эндометриты, вагинит, у самцов - орхит, эпидидимит), молочных желез (мастит).

Бруцеллез у животных может протекать в скрытой форме и обнаруживаться лишь при специальном исследовании. Распространять возбудителя инфекции могут и животные, не имеющие клинических проявлений бруцеллеза, но положительно реагирующие при обследовании на бруцеллез. Отдельные животные остаются носителями бруцелл и выделяют их в течение 5 лет и более.

3.3. Эпидемиологические особенности бруцеллеза

Естественным резервуаром бруцелл в природе являются животные. В связи с этим эпизоотология бруцеллеза целиком определяется его эпизоотологией, а заболевание с полным правом можно отнести к типичным зоонозам.

Основными источниками возбудителя инфекции для людей при бруцеллезе являются овцы, козы, крупный рогатый скот и свиньи. Отмечаются случаи заражения людей от северных оленей. Иногда источником заражения могут быть лошади, верблюды, яки, собаки и другие животные. Имеют место случаи заражения людей от собак как *B.melitensis*, *B.canis*, так и другими видами бруцелл. Описаны случаи заражения людей от кошек (*B.suis*).

Особое значение в заболеваемости людей имеет неблагополучие по бруцеллезу овцеводческих хозяйств, в которых чаще возникают групповые заболевания. В очагах крупного рогатого скота и свиноводческих фермах обычно регистрируются единичные, спорадические случаи заболевания.

Роль человека в передаче бруцеллезной инфекции эпидемиологического значения не имеет.

Пути распространения бруцеллеза многообразны, т.к. бруцеллы выделяются больными животными через все выделительные системы. Передача возбудителя

бруцеллеза и заражение людей происходит контактным, алиментарным и реже - аэрогенным путем, возможны сочетанные пути передачи.

Наибольшую роль в очагах бруцеллеза имеет контактный механизм передачи инфекции.

Заболеваемость, в большей степени, отмечается среди лиц, имеющих тесный контакт с больными животными (чабаны, пастухи, работники ферм, в т.ч. звероводческих, зооветспециалисты, доярки). Особенно высока возможность инфицирования при оказании животным помощи во время родов и при абортах, когда проводят ручное отделение плаценты. Заражение может произойти при переработке мясного сырья, кожи, шерсти, шкур животных, больных бруцеллезом (работники мясоперерабатывающей промышленности, кожзаводов, шерстеобрабатывающих предприятий). В таких случаях проникновение бруцелл в организм человека происходит через кожные покровы. Малые размеры возбудителя инфекции и его высокая инвазивная способность позволяют бруцеллам проникать через неповрежденную кожу. Различные повреждения кожных покровов (царапины, ушибы, мацерация) в значительной степени увеличивают эти возможности.

При контактном пути заражения проникновение бруцелл происходит также через слизистые глаз, носа, ротовой полости. Такой механизм проникновения бруцелл представляет особую опасность при несоблюдении или невозможности соблюдения мер личной профилактики работниками животноводства и предприятий по переработке продуктов животноводства и др., которые по своей небрежности заносят инфицированный материал на слизистые рта, носа и глаз.

Алиментарный путь передачи бруцелл возможен при употреблении пищевых продуктов, полученных от зараженных животных. Наибольшую опасность представляют сырое молоко и молочные продукты (брынза, сливки, сметана, кумыс и др.). Коровье молоко является причиной инфицирования многих людей (особенно в городах), которые профессионально не связаны с животноводством. Бруцеллы сохраняются в молоке до 10 дней, а в брынзе - до 45 дней. Опасность инфицирования людей бруцеллезом при алиментарном заражении в значительной степени зависит от вида бруцелл, находящихся в молоке или молочных продуктах.

Наибольшую опасность представляет бруцелла вида *melitensis*, если для приготовления молочной продукции использовалось зараженное овечье (козье) молоко или коровье (в случаях миграции *B.melitensis* на крупный рогатый скот), что может вызвать массовые заболевания людей бруцеллезом с тяжелым течением инфекционного процесса.

Мясо представляет значительно меньшую эпидемиологическую опасность, т.к. оно, как правило, употребляется в термически обработанном виде. Однако в ряде случаев при недостаточной термической обработке в связи с национальными особенностями приготовления пищи (строганина, шашлык с кровью, сырой фарш и др.) мясо и мясные продукты могут являться причиной заражения бруцеллезом. Бруцеллы сохраняются во внутренних органах, костях, мышцах и лимфатических узлах инфицированных туш более одного месяца, а в замороженных продуктах в течение всего срока хранения.

При заражении алиментарным путем решающую роль играет возможность проникновения бруцелл через слизистые оболочки ротовой полости и верхних отделов пищеварительного тракта, т.к. бруцеллы быстро погибают в кислой среде желудочного сока, не успев проникнуть во внутренние органы и ткани организма.

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. В таких случаях нередко сочетанные пути передачи возбудителя - аэрогенный и контактный, аэрогенный и алиментарный (при сглатывании накопившейся слизи в носоглотке). В шерсти бруцеллы сохраняют

жизнеспособность при хранении при комнатной температуре в течение 3 месяцев. Аэрогенный путь передачи возможен и в бактериологических лабораториях, во время различных манипуляций при работе с чистыми культурами (пересевы, центрифугирование и др.), когда могут образовываться аэрозоли. Аэрогенный путь при передаче возбудителя бруцеллезной инфекции определяется возможностью проникновения частиц, диаметр которых менее 5 мкм, в нижние отделы дыхательных путей (бронхиолы и альвеолы).

Известны казуистические случаи заражения людей половым путем.

Сезонность в заболеваемости людей бруцеллезом обусловлена хозяйственной деятельностью человека и, в частности, процессом обслуживания сельскохозяйственных животных. Особого внимания заслуживает время отелов, окотов и абортот, уход за животными в послеродовой период, а также время купки и стрижки овец. Для заболевания людей бруцеллезом, вызванным козье-овечьим видом, характерна весенне-летняя сезонность. При заражении бруцеллезом от крупного рогатого скота сезонность выражена слабее, что объясняется длительным периодом лактации и заражением в основном через молоко и молочные продукты.

Различия в заболеваемости по полу зависят от занятости мужчин и женщин в животноводстве. В регионах, где основным источником заражения людей является мелкий рогатый скот, наибольший процент заболеваемости отмечается у мужчин. В очагах бруцеллеза крупного рогатого скота, где доля мужского труда имеет второстепенное значение, заболеваемость женщин несколько выше, чем мужчин.

В очагах бруцеллеза сельскохозяйственных животных часто отмечаются заболевания людей всех возрастных групп, от детей дошкольного возраста (в том числе грудных) до людей преклонного возраста. Однако большая часть людей, заболевших бруцеллезом, приходится на средний работоспособный возраст, так как именно эта группа людей больше других принимает участие в обслуживании животных и обработке сырья животного происхождения.

Заболеваемость людей бруцеллезом носит выраженный профессиональный характер. Заражаются люди преимущественно в результате непосредственного контакта с больными бруцеллезом животными или их сырьем. К группам профессионального риска относятся работники как государственных, так и других форм собственности животноводческих (звероводческих) хозяйств (ферм), мясо- и молококомбинатов и других предприятий по переработке продуктов и сырья животного происхождения, убойных пунктов, пунктов стрижки, купки овец, зооветработники, персонал лабораторий, работающих с вирулентными культурами, и персонал других предприятий, учреждений, работа которых связана с риском заражения бруцеллезом.

3.4. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом

Эпидемиологический надзор за бруцеллезом - это комплексное наблюдение за инфекцией, включающее анализ многолетней динамики заболеваемости в разных возрастных группах и разных контингентах населения, клинических форм заболевания, состояния иммунологической структуры населения, а также видов бруцелл, циркулирующих на данной территории, анализ эпизоотологической ситуации по бруцеллезу за последние годы.

Организационно-методическое руководство по осуществлению эпидемиологического надзора за бруцеллезной инфекцией обеспечивается профильными структурными подразделениями (курирующими вопросы особо опасных инфекций) центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора в субъектах Российской Федерации. Работа по вопросам бруцеллеза осуществляется во взаимодействии с лечебно-профилактическими учреждениями.

Эффективность профилактических и противоэпидемических противобруцеллезных мероприятий зависит от комплексности в работе государственной санитарно-

эпидемиологической службы и государственной ветеринарной службы и от детального изучения эпизоотологических и эпидемиологических особенностей инфекции на конкретной территории.

Задачами эпидемиологического надзора являются:

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

- активное выявление лечебно-профилактическими учреждениями 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 потенциального риска заражения базируется, в основном, на результатах эпизоотологического обследования сельскохозяйственных животных, результатах диспансерного наблюдения за группами риска (включая лабораторное обследование), а также данных о заболеваемости людей на данной территории. Заболевания людей бруцеллезом часто являются индикатором неблагополучия по бруцеллезу сельскохозяйственных животных, т.к. они нередко выявляются на территориях, считающихся благополучными по бруцеллезу животных.

Особое внимание следует обратить на возможность миграции бруцелл козье-овечьего вида на крупный рогатый скот, в связи с чем резко возрастает эпидемиологическое значение этого вида животных.

3.5. Эпидемиологическое расследование случаев заболевания людей

Эпидемиологическое обследование очага инфекции начинают в течение суток после получения экстренного извещения (учетная форма N 058/у) из лечебно-профилактического учреждения, а также сведений от ветеринарной службы, от специалистов или руководителей хозяйств независимо от форм их собственности, от индивидуальных владельцев сельскохозяйственных животных о случаях выявления в хозяйствах больных бруцеллезом животных.

В случае, если медицинский работник лечебно-профилактического учреждения при выявлении больного бруцеллезом (на амбулаторном приеме или при диспансерном профилактическом осмотре профессиональных групп) установит возможный профессиональный характер заболевания, он обязан независимо от подачи экстренного извещения об инфекционном заболевании (учетная форма N 058/у) направить в территориальный центр госсанэпиднадзора "Извещение об остром профессиональном отравлении или профессиональном заболевании" (учетная форма N 389/у).

Эпидемиологическое обследование случаев заболеваний людей бруцеллезом и выявление источника инфекции необходимо проводить с участием ветеринарных специалистов. При этом ветеринарным специалистом дается официальное письменное заключение на бланке ветеринарного учреждения о результатах проверки животных на бруцеллез.

Целью эпидобследования случаев заболевания людей бруцеллезом является выявление совместно со специалистами ветеринарной службы источника возбудителя инфекции, путей и факторов передачи, механизма заражения, выявление всех лиц, имевших контакт с источником возбудителя инфекции, и проведение комплексных мероприятий по предупреждению дальнейшего заражения людей бруцеллезом в данном очаге, а также возможно более раннее установление медицинского наблюдения за лицами, работающими в очаге бруцеллеза.

Эпидемиологическое обследование случаев обострений бруцеллеза у больных, уже состоящих на учете, целесообразно для выявления возможного повторного инфицирования и проведения соответствующих мероприятий.

Проводя обследование очага, врач-эпидемиолог должен определить характер контакта больного с животным (в результате профессиональной деятельности, при участии в сезонных работах с животными, контакт с животными личного хозяйства, случайный контакт с животными, с сырьем и продуктами животного происхождения).

В случае отсутствия контакта с животными собираются сведения об употреблении сырого молока, молочных и других продуктов животноводства, контакте с шерстью, шкурами, порядок их приобретения (на колхозных рынках, у частных или случайных лиц и т.д.), о работе больного в медицинских, ветеринарных или других лабораториях с возбудителем бруцеллеза или зараженным материалом.

Необходимые сведения о путях заражения, источнике инфекции может дать опрос самого больного, сотрудников, представителей администрации и др.

Важным в выявлении источника возбудителя инфекции является анализ эпизоотического состояния обследуемого района по бруцеллезу животных по данным ветеринарных органов и результатам эпизоотологического обследования хозяйства.

Для выявления путей заражения совместно со специалистами госветслужбы проводится комплексное обследование животноводческих хозяйств (овцеводческих, молокоотоварных ферм, отгонных пастбищ, пунктов стрижки и др.), звероводческих хозяйств (ферм), индивидуальных хозяйств, предприятий по переработке сырья и продуктов животноводства (мясокомбинаты, молококомбинаты, убойные пункты, сыроваренные заводы и др.). Устанавливаются пространственные и временные границы очага.

Пространственная граница очага определяется территориями и восприимчивыми видами животных, в пределах которых возможна циркуляция возбудителя при данном механизме его передачи. Временные границы очага будут зависеть от многих факторов: количества заболевших животных, условий содержания и кормления животных, выполнения карантинных мероприятий и других требований.

Обследование проводит врач-эпидемиолог с привлечением санитарного врача, курирующего данный объект, при участии ветеринарного специалиста, а также в присутствии администрации.

При обследовании, в первую очередь, необходимо обратить внимание на соблюдение противобруцеллезного режима, изучить условия труда работников, для чего следует:

- оценить санитарно-гигиеническое состояние объекта, обратив особое внимание на благоустройство территории, водоснабжение, наличие дезинфицирующих и моющих средств, оборудование бытовых помещений для работников, их состояние и содержание, оборудование скотомогильников, ям Беккари или трупосжигательных печей, наличие уборочного инвентаря, в т.ч. для уборки абортированных и мертворожденных плодов и последов;

- выяснить наличие средств индивидуальной защиты персонала: спецодежда и обувь, перчатки, резиновые (клеенчатые) фартуки, перчатки и др., их количество, пригодность для использования, порядок хранения, смены, централизации стирки, наличие аптек, умывальников, дезинфицирующих средств, мыла и пр.;

- проверить организацию проведения профилактических диспансерных осмотров, профилактических прививок работников обследуемого объекта (время проведения прививок, правильность и полнота отбора контингентов, кем проводятся прививки, условия хранения вакцины и др.);

- в целях выявления алиментарного пути заражения проверить соблюдение режима пастеризации молока, условия хранения и обработки молочной посуды, фильтрующего материала, установить порядок реализации молока и молочных продуктов; организовать обследование животных, от которых получено молоко, а также других животных хозяйства; по возможности следует лабораторно исследовать подозреваемые молочные продукты;

- выявить порядок первичной обработки и транспортирования сырья и продуктов животноводства из обследуемого хозяйства.

Специалистами госсанэпидслужбы и госветслужбы составляется эпидемиологическое и эпизоотологическое заключение и совместно с руководителями хозяйств разрабатывается комплекс мероприятий по борьбе с бруцеллезом сельскохозяйственных животных, предупреждению заражения людей и ликвидации возникшего очага бруцеллеза.

В случае заболевания бруцеллезом работников ветеринарных, медицинских лабораторий, сотрудников научно-исследовательских учреждений, где ведутся работы с заразным материалом, с живыми культурами бруцелл, особое внимание необходимо уделить обследованию лабораторий в отношении соблюдения режима работы с заразным материалом.

При выявлении лиц, имевших возможность заразиться в данном очаге, - контактных не с больным человеком, а с предполагаемыми источниками или факторами передачи инфекции, необходимо организовать и проконтролировать проведение клинико-иммунологического обследования постоянного и временного персонала обследуемой фермы, пастбища, на перерабатывающем предприятии (цех, участок, пункт убоя скота и др.), а также членов семьи заболевшего, если заражение произошло от животных в индивидуальном хозяйстве. В случае, если лица проживают в другом населенном пункте, о них необходимо сообщить в центр госсанэпиднадзора по месту жительства для проведения их медицинского обследования.

Выявленные больные подлежат госпитализации и лечению.

Данные эпидемиологического обследования случая заболевания человека бруцеллезом заносятся в карту эпизоотолого-эпидемиологического обследования зоонозного заболевания (форма N 371-у). При этом указывают общие сведения о больном, дату заболевания, дату установления диагноза и госпитализации, сведения о клинической форме и характере течения заболевания, результаты лабораторного обследования больного, а также эпидемиологическое заключение о предполагаемом источнике, механизме и месте заражения. Проводят анализ причин заболеваемости, который служит дальнейшему совершенствованию профилактических мероприятий.

Если эпидемиологическое обследование проводится в связи с выявлением больных бруцеллезом животных, результаты проверки оформляются актом (совместно со специалистами ветеринарной службы), в котором следует отразить результаты выполнения противобруцеллезного режима, состояние профилактики заражения бруцеллезом работающих, организацию медицинского обследования лиц, контактных с источником инфекции, а также проверку противоэпидемических мероприятий. Составляются предложения (план-задание) по данному хозяйству (предприятию) с обязательной проверкой его выполнения в последующем.

В случае выявления грубых нарушений противобруцеллезного режима в животноводческих хозяйствах и на перерабатывающих продукты животноводства предприятиях, повлекших за собой заболевания людей бруцеллезом (в т.ч. детей и подростков), на виновных оформляются материалы для привлечения их к административной или уголовной ответственности.

Установление связи бруцеллеза с профессиональной деятельностью проводится в установленном порядке с обязательным участием врача-эпидемиолога и врача-инфекциониста. Основным документом, подтверждающим профессиональный характер заражения бруцеллезом, служит карта эпидобследования с заполненным вкладным листом и заверенная главным врачом центра госсанэпиднадзора.

4. ПРОФИЛАКТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

Профилактика бруцеллеза включает комплекс ветеринарно-санитарных, хозяйственных и медико-санитарных мероприятий, конечной целью которых является ликвидация инфекции среди животных и прекращение заболеваний среди населения. Учитывая то, что бруцеллез - зоонозная инфекция, основой эпидемического благополучия являются меры по профилактике инфекции среди животных и ликвидации очагов эпизоотии в случае их возникновения. Перечень общих профилактических мероприятий, обязательных для учреждений, должностных лиц и граждан Российской Федерации определен санитарными правилами СП 3.1.085-96 и Ветеринарными правилами ВП 13.3.1302-96 "Бруцеллез".

Медико-санитарные мероприятия по профилактике бруцеллеза включают: 1) защиту людей от инфицирования; 2) вакцинопрофилактику; 3) профилактические осмотры профессиональных контингентов и 4) санитарно-просветительную работу.

4.1. Мероприятия по защите людей от инфицирования

Мероприятия по предупреждению заболеваний бруцеллезом людей следует проводить согласно региональным и местным программам по борьбе и профилактике бруцеллеза в республике, области (крае), районе и в каждом отдельном хозяйстве, предприятии. Программы составляются с участием всех заинтересованных ведомств и организаций и финансируются из средств местного бюджета.

Защита людей от инфицирования осуществляется как проведением широких общесанитарных мер, так и использованием средств индивидуальной защиты:

- обеспечение должного санитарно-гигиенического состояния хозяйств и предприятий, соблюдение дезинфекционного режима;

- соблюдение правил убоя животных из хозяйств, неблагополучных по бруцеллезу, с последующей дезинфекцией оборудования, помещений и обеззараживание отходов, дезинфекцией транспорта, которым перевозились больные животные;

- соблюдение установленных правил обработки и использования продуктов убоя и молока от животных из хозяйств, неблагополучных по бруцеллезу;

- соблюдение правил работы с животными в хозяйствах: обеспечение персонала, в т.ч. лиц, временно привлекаемых к работам, связанным с риском заражения бруцеллезом, средствами личной гигиены и индивидуальной защиты (халаты, резиновые перчатки, рукавники, клеенчатые фартуки, специальная обувь и др.), своевременная их замена и стирка;

- наличие и правильная эксплуатация бытовых помещений, комнат для отдыха, мест приема пищи, душевых и др.;

- обеспечение горячей водой, моющими средствами, дезинфицирующими средствами;

- организация в хозяйствах и на предприятиях централизованной дезинфекции, стирки и чистки спецодежды;

- обязательный инструктаж работников по правилам гигиены, использованию средств индивидуальной защиты, соблюдению противобруцеллезного режима; аналогичный инструктаж должны проходить индивидуальные владельцы сельскохозяйственных животных;

- допуск к работам, связанным с риском заражения бруцеллезом, только после прохождения инструктажа и проведения в установленном порядке профилактических противобруцеллезных прививок.

Контроль в порядке государственного санитарно-эпидемиологического надзора за организацией и проведением противобруцеллезных мероприятий и соблюдением противобруцеллезного режима в животноводческих и индивидуальных хозяйствах, на предприятиях, перерабатывающих продукты и сырье животного происхождения, в лабораториях, работающих с вирулентными культурами, в части предупреждения заболеваний людей осуществляется центрами госсанэпиднадзора.

Плановые обследования по соблюдению противобруцеллезного режима в животноводческих хозяйствах, на отгонных пастбищах, убойных пунктах, пунктах стрижки овец, мясо- и молококомбинатах и других предприятиях, где имеется риск заражения бруцеллезом, следует проводить эпидемиологам совместно с санитарными врачами, курирующими данные объекты, а также с ветеринарными специалистами. Частота плановых обследований зависит от эпизоотической ситуации. Результаты обследования объекта следует доводить до администрации для принятия соответствующих мер.

4.2. Профилактическая вакцинация людей против бруцеллеза

Показанием к вакцинации людей является угроза заражения *B.melitensis* в связи с распространением бруцеллеза среди овец и коз, а также при установленной миграции бруцелл этого вида на крупный рогатый скот или другой вид животных.

В районах, свободных от бруцеллеза козье-овечьего вида, иммунизация персонала хозяйств, неблагополучных по бруцеллезу, вызванному *B.abortus, suis, ovis, canis*, не проводится.

Прививки постоянным и временным работникам животноводства проводятся до полной ликвидации в хозяйствах бруцеллеза козье-овечьего вида, а персоналу предприятий по переработке сырья и продуктов животноводства - до полной ликвидации бруцеллеза в хозяйствах, откуда поступает скот, сырье и продукты животноводства. Прививкам подвергаются также работники бактериологических лабораторий, работающие с живыми культурами бруцелл и с зараженными животными.

Для иммунизации людей против бруцеллеза используется сухая живая вакцина, приготовленная из вакцинного штамма коровьего вида (*B.abortus 19-BA*).

Эпидемиологическая эффективность прививок зависит от правильного определения показаний к их проведению, полноты отбора подлежащих иммунизации профессиональных групп, в т.ч. временного персонала, соблюдения сроков вакцинации, методики проведения прививок, иммунологических свойств вакцины и соблюдения необходимых условий ее хранения.

Контроль за планированием и проведением прививок возлагается на центры госсанэпиднадзора.

Перед прививками проводится медицинский осмотр всех лиц, подлежащих вакцинации с обязательным серологическим (р. Хеддлсона или ИФА) и аллергическим (проба Бюрне с бруцеллезным аллергеном или реакция лизиса лейкоцитов) обследованием. Вакцинации подлежат лица с четкими отрицательными серологическими и аллергическими реакциями на бруцеллез.

Прививки не проводятся лицам моложе 18 лет, женщинам в период беременности и грудного вскармливания, т.к. эти контингенты не должны привлекаться к работам, связанным с риском заражения бруцеллезом, а также лицам, имевшим положительные серологические или аллергические реакции на бруцеллез на протяжении последних 2 лет.

К работе с инфицированными животными или сырьем от них люди могут допускаться не ранее чем через 1 месяц после прививок. Иммунитет сохраняет наивысшую напряженность в течение 5 - 6 месяцев. В связи с этим при определении сроков прививок в животноводческих хозяйствах необходимо строго руководствоваться данными о времени окота (ранний окот, плановый, внеплановый).

Ревакцинация проводится через 10 - 12 месяцев после вакцинации лицам с отрицательными серологическими и аллергическими реакциями на бруцеллез.

Прививки против бруцеллеза могут быть достаточно эффективными лишь при одновременном проведении всего комплекса санитарных и ветеринарных мероприятий.

4.3. Диспансерные профилактические осмотры профессиональных контингентов

С целью своевременного выявления заболевших бруцеллезом людей обязательным диспансерным профилактическим осмотрам при поступлении на работу и не реже 1 раза в год подлежат контингенты, подвергающиеся риску заражения бруцеллезом:

- постоянные и временные работники животноводческих, звероводческих хозяйств (ферм), как благополучных, так и неблагополучных по бруцеллезу любого вида скота, лица, занятые обслуживанием, стрижкой, убоем животных, первичной обработкой и транспортированием сырья и продуктов животноводства из этих хозяйств;

- постоянные и временные работники предприятий по переработке сырья и продуктов животноводства, поступающих из районов и хозяйств, неблагополучных по бруцеллезу любого вида;

- медицинский, ветеринарный, зоотехнический и другой персонал, работающий с живыми культурами бруцелл или зараженным материалом, с больными и подозрительными в заражении бруцеллезом животными.

Диспансерным профилактическим осмотрам подлежат работники всех хозяйств и предприятий независимо от форм их собственности.

Руководство и организация диспансеризации осуществляется органами управления здравоохранением. Центры госсанэпиднадзора контролируют охват контингентов, подлежащих периодическим медицинским осмотрам на бруцеллез, составляют перечень объектов с числом работающих в них, оценивают значение неблагоприятных производственных факторов. Перечень объектов корректируется не реже одного раза в 2 года.

Администрация отобранных объектов представляет поименные утвержденные списки работающих, подлежащих периодическим медицинским осмотрам на бруцеллез.

Основным специалистом, проводящим периодические медицинские осмотры, является терапевт (территориальный или цеховой). При этом проводится серологическое обследование на бруцеллез в реакции Хеддлсона или ИФА. На территориях с длительным благополучием по бруцеллезу сельскохозяйственных животных (не менее 5 лет) серологическое обследование проводят один раз в два года.

Лица, положительно реагирующие на бруцеллез, больные с клиническими проявлениями, характерными для бруцеллезной инфекции (поражение опорно-двигательного аппарата, нервной системы, нарушение слуха, зрения, воспалительные заболевания мочеполовой системы и др.), подлежат углубленному медицинскому осмотру с привлечением специалистов по профилю клинических проявлений (инфекционист, невропатолог, гинеколог, уролог, хирург и др.).

Лица с положительными и сомнительными серологическими реакциями без клинических проявлений (группа положительно реагирующих на бруцеллез) подлежат тщательному обследованию в динамике врачом-инфекционистом два раза в год с обязательным лабораторным исследованием сыворотки крови на бруцеллез и при необходимости специалистами по профилю выявленной патологии.

Уточнение или подтверждение диагноза проводится в инфекционных стационарах (отделении, больнице) врачом-инфекционистом.

Профилактические медицинские осмотры животноводов следует проводить через 1 - 2 месяца после окончания массового окота и отела животных (обычно II квартал), работников предприятий по переработке сырья и продуктов животноводства - через 1 - 2 месяца после массового убоя скота (не позднее III квартала).

Лица, временно привлекаемые к уходу за животными и к переработке сырья и продуктов животноводства, обследуются через 1 - 2 месяца после сезонных работ. Контроль за полнотой охвата этих контингентов осуществляет санитарно-эпидемиологическая служба.

Во время проведения периодических медицинских осмотров и лабораторного обследования широко проводится санитарно-просветительная работа среди обследуемых контингентов.

4.4. Гигиеническое воспитание населения

Целью гигиенического воспитания является доведение до широких слоев населения необходимых санитарно-гигиенических знаний.

Основными задачами гигиенического воспитания по вопросам профилактики бруцеллеза являются:

Формирование у населения четкого представления о том, что бруцеллез - зоонозная инфекция, при которой источником заболевания являются больные сельскохозяйственные животные. Доведение информации о распространении болезни среди животных, путях заражения бруцеллезом и степени опасности для человека, обратив внимание на профессиональный характер заболевания.

Ознакомление населения с основными мерами профилактики бруцеллеза, особо подчеркнув важность своевременного выявления заболевших животных, необходимость их изоляции и проведения санитарных, специальных ветеринарных, дезинфекционных и других мероприятий; значение мероприятий по охране благополучных хозяйств от заноса инфекции; необходимость соблюдения мер личной гигиены; недопущение детей и подростков к уходу за больными животными как в общественных, так и личных хозяйствах; необходимость термической обработки пищевых продуктов животного происхождения; значение прививок против бруцеллеза.

Населению необходимо постоянно объяснять, что профилактика бруцеллеза включает комплекс хозяйственных, санитарных, ветеринарных и медицинских мероприятий.

В зависимости от особенностей групп населения, среди которых проводится эта работа, следует акцентировать внимание на вопросах предупреждения заражения среди профессиональных групп. Для работников животноводства следует показать наносимый бруцеллезом экономический ущерб, подчеркнуть, что от них зависит выявление первых случаев абортов у животных, проведение срочных дезинфекционных мер, что способствует оздоровлению стада и всего хозяйства.

Работников животноводческих (звероводческих) хозяйств (ферм), предприятий, перерабатывающих сырье и продукты животного происхождения, наиболее подробно следует ознакомить с мерами личной профилактики, их правами и правилами по обеспечению их спецодеждой, а также всем необходимым для выполнения мер личной профилактики.

Для лиц, имеющих в личных хозяйствах коз, овец и других сельскохозяйственных животных, важно подчеркнуть значение своевременности проведения санитарных и ветеринарных мер при первых признаках заболевания животных бруцеллезом, отметить, что нарушение и несоблюдение их приводит к дальнейшему распространению инфекции и заражению людей, к большому экономическому убытку.

Необходимо подчеркнуть опасность заражения бруцеллезом детей и подростков, если они принимают участие в уходе за больными животными.

Не следует детально останавливаться на клинике бруцеллеза у людей, достаточно отметить лишь основные симптомы, подчеркнуть, что диагностировать это заболевание может только врач.

Пропаганда гигиенических знаний среди населения будет эффективна, если использовать конкретные случаи из практики, привести примеры успешной борьбы с бруцеллезом на конкретных территориях.

5. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

Для лабораторной диагностики бруцеллеза у людей применяются три группы методов: первая - тесты, позволяющие выявить возбудитель заболевания и его растворимые антигены; вторая - методы определения специфических антител; третья - тесты, выявляющие сенсибилизацию организма к бруцеллезным антигенам.

5.1. Методы выделения возбудителя заболевания и его растворимых антигенов

5.1.1. Бактериологический метод

Вся работа по выделению и дифференциации бруцелл из любого исследуемого материала должна проводиться в условиях, предупреждающих возможность инфицирования персонала и обсеменения возбудителем объектов внешней среды, в строгом соответствии с санитарными правилами "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности. СП 1.2.011-94".

Характерной особенностью 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 засева. При этом первые генерации культур *B.abortus* и *B.ovis* способны расти только при наличии в атмосфере повышенного содержания углекислоты (5 - 10%). Биовары *B.abortus* 5, 6 и 7 могут расти в обычных аэробных условиях.

Для выделения культур бруцелл рекомендуются следующие среды: сывороточно-декстрозный агар, агар из картофельного настоя + сыворотка и кровяной агар (5% овечьей крови в среде), Albimi - агар, среда "Д", печеночные и мясопептонные агары и бульоны (рН сред - 6,8 - 7,2). Рецепты приготовления сред приведены в конце указаний. В настоящее время в практике широко используется коммерческая среда для выделения бруцелл - эритрит агар (г. Махачкала). Следует отметить, что 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.

Для проверки агара из 2-суточной культуры *B.melitensis* или *B.abortus* готовят суспензию бруцелл в концентрации 200 мк в 1 мл (по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Посев проводят на 4 чашки по 0,1 мл - 20 мкл суспензии. Агар признается пригодным, если через 5 суток пребывания в термостате при 37 °С в среднем вырастает не менее 18 колоний на чашку.

Исследование крови и другого биологического материала.

Посевы крови рекомендуется делать во время лихорадочного состояния больного, т.к. в этот период наблюдается наибольший процент выделения культур. Однако не исключена возможность получения гемокультуры и при нормальной температуре. Кровь для посева следует брать до лечения антибиотиками. Посевы крови рекомендуется проводить во флаконы (желательно прямоугольные) емкостью 100 - 200 мл, в которые наливают по 30 - 50 мл 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 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 углекислоты (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. 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 субфебрилитете) перед началом лечения рекомендуется проводить посевы крови, пунктатов костного мозга и лимфатических узлов на специальную питательную среду для выделения L-культур бруцелл (состав питательной среды см. в конце указаний).

Способ посева бактериологического материала для выделения L-культур идентичен с методом 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 и т.д. Посевы проводят на твердые и жидкие питательные среды. В случаях исследования загрязненного материала для задержки роста посторонней микрофлоры к среде следует добавлять генцианвиолет из расчета 1:200000. С этой целью также добавляют различные антибиотики, в частности полимиксин - 3 мкг/мл и амфоглюкамин - 3 мкг/мл.

5.1.2. Биологический метод

Для выделения бруцелл из материалов, загрязненных посторонней микрофлорой и при малой концентрации бруцелл в исследуемом материале, используются морские свинки (весом 300 - 350 г) или белые мыши (весом 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 производится через 20 - 25 дней, а 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. Для посевов у морских свинок берут целиком 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 засева берут пипеткой из рассеченной бедренной кости. Посевы крови из сердца, а также мочи и костного мозга производят 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 (по возможности больше) берут "уколом" стерильной деревянной палочки (палочка должна быть длиной 25 - 30 см, диаметром 4 - 5 мм, хорошо отструганная, с 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 час в дезраствор (5% раствор фенола), затем автоклавируют, после чего тщательно промывают и стерилизуют для последующего употребления. Посевы выдерживают при 37 °С в термостате 20 - 25 дней. Просмотр посевов на пробирках с агаром и бульоном производят каждые 3 - 4 дня, из помутневших бульонов делают высевы на пробирки со скошенным агаром.

Результат исследования оценивается положительно при выделении хотя бы одной колонии бруцелл из организма животного или при наличии положительной реакции Райта у животных в титре не менее 1:20.

5.1.3. Методы идентификации бруцелл

Для определения принадлежности выделенных культур к роду *Brucella* можно использовать следующие методы: изучение морфологии колоний, микроскопия окрашенных препаратов по Граму или Козловскому, люминесцентная микроскопия и проба со специфической сывороткой в реакции агглютинации на стекле.

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.

Величина колоний может быть различной. Наряду с крупными, достигающими в диаметре 3 - 4 мм и больше, могут быть очень мелкие - точечные колонии 0,1 - 0,05 мм. Различные факторы (рН 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 МБС-1 или обычный микроскоп с объективом наименьшего увеличения.

Микроскопия окрашенных препаратов.

При окраске по Граму бруцеллы грамотрицательны (окрашиваются в красный цвет). Окрашивание препаратов по способу Козловского: препараты, фиксированные на пламени горелки или спиртовки, окрашивают 0,5% водным раствором сафранина при подогревании до появления пузырьков, промывают дистиллированной водой и докрашивают 0,5%-ным водным раствором малахитовой или бриллиантовой зелени в течение 40 - 50 секунд. Бруцеллы сохраняют красную окраску сафранина, а остальные бактерии окрашиваются в зеленый цвет.

Проба со специфической сывороткой.

Для предварительной, быстрой идентификации ставят реакцию агглютинации на стекле. На предметное стекло наносят каплю специфической сыворотки, разведенной 1:25 0,5% карбололизированным физиологическим раствором, в которой эмульгируется одна петля исследуемой культуры. В положительных случаях быстро (в течение 1 минуты) наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев, в отрицательных - суспензия остается гомогенной. Для контроля исследуемую культуру эмульгируют в капле нормальной сыворотки или физиологическом растворе.

Люминесцентная микроскопия (см. раздел 4 "Идентификация бруцелл в воде и пищевых продуктах").

5.1.4. Методы идентификации L-форм бруцелл

Для определения принадлежности выделенных L-культур к роду *Brucella* можно использовать следующие методы: изучение характера роста и морфологии колоний, микроскопия нативных препаратов, проба со специфической сывороткой в реакции агглютинации на стекле, а также способность к росту на специфической питательной среде с пенициллином.

Характер роста и морфологии L-форм бруцелл.

L-колонии бруцелл могут быть изолированными или в виде нежного сплошного налета. Колонии от 2 до 3 мм имеют золотистый цвет, слизистую консистенцию, часто вырастают в агар. При просмотре через бинокулярную лупу МБС-1 L-колонии имеют вид "яичницы" - плотный центр и ажурные светлые края.

Микроскопия нативных препаратов.

Для изучения морфологии L-клеток отбирают характерные колонии и из них готовят нативные препараты: на предметное стекло наносят каплю физиологического раствора, в которой эмульгируют одну каплю 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 как внутри крупных клеток, так и лежать свободными зернистыми массами. В препарате могут находиться клетки от 0,2 до 0,5 мкм гетероморфные или близкие по морфологии к нормальным клеткам 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 антисывороткой в разведении 1:25. Необходимо учитывать, что L-культуры бруцелл очень плохо эмульгируются, что затрудняет учет реакции. Поэтому рекомендуется сначала петлю культуры тщательно растереть стеклянной палочкой в небольшом количестве физиологического раствора и после этого каплю эмульсии перенести в каплю специфической сыворотки на предметном стекле и параллельно в каплю нормальной сыворотки или физиологического раствора в качестве контроля.

Скорость специфической реакции агглютинации может быть только замедленной. Характер агглютината при положительной реакции обычен.

5.1.5. Методы дифференциации бруцелл

После идентификации культуры бруцелл проверяют на диссоциацию. С этой целью применяют следующие тесты: проба с трипафлавином и реакция термоагглютинации (проба с нагреванием).

Проба с раствором трипафлавина (на стекле).

На предметное стекло наносят каплю солевого (0,85%) раствора трипафлавина 1:500, в котором эмульгируется капля испытуемой культуры. У диссоциированных культур быстро через 1 - 2 минуты наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев. Взвесь из S-форм культур остается гомогенной.

Реакция термоагглютинации.

2 - 3 мл 1 x 10⁹ мкл/мл двухсуточной культуры бруцелл в физиологическом растворе подогревают в пробирке на водяной бане при 90° в течение 30 минут. Результаты учитывают через 30 минут, 1 час и окончательно через 24 часа пребывания при комнатной температуре. В эти сроки наступает, при наличии диссоциации, ясно выраженная агглютинация клеток бруцелл, тогда как суспензия

недиссоциированных (S) штаммов остается гомогенной. Дифференциации подлежат культуры бруцелл, находящиеся только в S-форме.

Тестами дифференциации бруцелл являются: их отношение к росту в присутствии CO₂, образование H₂S, устойчивость к фуксину и тионину, способность агглютинироваться монорецепторными сыворотками, отношение к фагу "Гб".

Дифференциация по образованию сероводорода.

В качестве реактива применяют водный раствор уксусно-кислого свинца, в котором смачивают полоски фильтровальной бумаги размером 1 x 8 см. Полоски затем просушивают. Заготовленные впрок сухие полоски фильтровальной бумаги хранят в банке из темного стекла с притертой пробкой не более 1 - 2 месяцев.

9

Взвесь испытуемой культуры в физиологическом растворе (2 x 10 мкл в 1 мл) засевают стандартной петлей (2 мм) на скошенную поверхность печеночного агара (рН - 6,8 - 7,2). Затем берут полоску фильтровальной бумаги и 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 из пробирки углекислоты. Пробирки с посевами ставят в термостат при 37 °С.

Показателем интенсивности образования сероводорода является почернение нижнего, свисающего над посевом конца бумажки. Почернение бумажки измеряется в мм.

Результаты учитываются через 2 дня в течение 6 дней. При каждом учете темневшую бумажку заменяют новой. Для окончательной оценки способности культуры к образованию сероводорода все три показателя складывают.

Для *V.suis* (биовар 1) суммарный показатель образования сероводорода равен примерно 12 - 20 мм, для *V.abortus* (биовар 1) - около 5 - 7, *V.melitensis* (биовар 1), как правило, совсем не образует сероводорода или вызывает только легкое побурение свинцовой бумажки. У штаммов *V.neotomae* показатель образования сероводорода в среднем равен 5 - 8 мм. Культуры *V.ovis* и *V.canis* сероводорода не образуют.

Дифференциация по редуцирующей активности в отношении красок.

Для этого метода дифференциации рекомендуется применять твердые питательные среды - агар Albimi и мясо-пептонный агар. Применяют основной фуксин и тионин, предварительно оттитрованные по отношению к трем основным видам референтных штаммов бруцелл, в концентрации: фуксин - 1:50000, тионин - 1:50000.

При отсутствии стандартных оттитрованных красок рабочие их дозы можно оттитровать с использованием эталонных штаммов бруцелл. Для этого испытуемые краски добавляют к среде в различных концентрациях. Концентрация красок в среде, с которой получается четкая дифференциация эталонных штаммов бруцелл (*V.melitensis* 16М, *V.abortus* 544, *V.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° 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 45 - 50 °С агара стерильно добавляют 2 мл основного раствора краски для получения концентрации 1:50000.

Питательную среду с краской разливают пипеткой по 20 - 25 мл в каждую чашку Петри. Затем среду подсушивают, не открывая чашки. Среда с красками должны храниться в холодильнике (+4 °С) и пригодны для работы в течение 10 - 15 дней. Обесцвеченные среды применять нельзя.

Взвесь бруцелл готовят из двухсуточной агаровой культуры. Посевы контрольных (эталонных штаммов всех трех видов бруцелл) и испытуемых штаммов производят петлей диаметром 2 мм из взвеси, содержащей в 1 мл 2 млрд. микробных клеток (по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Одну петлю такой взвеси засевают штрихом на поверхность агара. На чашку можно одновременно засеять 4 - 6 культур, предварительно

разделив чашку Петри на 4 - 6 секторов. Посевы помещают в термостат при 37 °С. Учет результатов проводят через трое суток инкубации.

Схема учета:

- интенсивный рост по всему штриху 4+;
- интенсивный рост вначале 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 +.

Реакция агглютинации с монорецепторными и R-сыворотками.

Монорецепторную 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 смыв в физиологическом растворе 2-суточной агаровой культуры бруцелл изучаемого штамма, разведенного до 2 млрд. микробных клеток в 1 мл (по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Для разведения сыворотки и антигена применяют физиологический раствор, рН 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 эталонным штаммом вида *B.melitensis*; б) контроль с эталонным штаммом *B.abortus*. Пробирки со смесью сыворотки и антигена выдерживают в термостате при температуре 37 °С 18 - 20 часов, а затем в течение 2 часов при комнатной температуре. После этого проводят учет реакции. Реакция считается положительной, начиная с разведения сыворотки 1:20, но не менее чем на 2+.

Для культур бруцелл вида *ovis* и *canis*, а также для культур других видов и биоваров бруцелл, находящихся в R-форме, для реакции агглютинации используют анти-R-сыворотку. Техника постановки реакции аналогична. Используется физиологический раствор на фосфатном буфере, рН 8,2 - 8,4.

Определение чувствительности культур бруцелл к фагу.

Бруцеллезный фаг "Тб" избирательно лизирует бруцеллы вида *abortus*, находящиеся в S-фазе. При определении чувствительности бруцелл к фагу используют следующий метод:

Питательная среда - 1,5% мартеновский агар (можно 1,5% агар Альбими) разливают в чашки Петри по 25 - 30 мл. Среду подсушивают при комнатной температуре в течение 18 - 20 часов. Чашки можно открыть и прикрыть их стерильными кружками фильтровальной бумаги, но в этом случае желательно чашки держать под лучами бактерицидной лампы.

Для посева используют 48-часовую агаровую культуру бруцелл, из которой готовят взвесь в физиологическом растворе из расчета

1×10^9 мкл в 1 мл, 0,4 - 0,5 мл из этой взвеси наливают на поверхность агара. Затем чашки тщательно раскачивают для получения равномерного газона, лишнюю посевную жидкость удаляют пастеровской пипеткой.

Засеянные чашки подсушивают в течение 1 часа при температуре 37 °С. На газон наносят пастеровской пипеткой по одной капле фага

в концентрации по 10×10^2 корпускул фага в 1 мл. Чашки быстро наклоняют и капли фага стекают по дорожке. Места нанесения капель и путь стекания капли можно заранее расчертить карандашом на внешней стороне дна чашки.

Учет результатов.

Полный лизис культуры на месте нанесения фага (или по дорожке) "4+", лизис с небольшим количеством отдельных колоний бруцелл или слившиеся бляшки в виде сот "3+". Резко ослабленный рост и небольшое количество бляшек "2+", очень слабый лизис "+" и отсутствие лизиса "-" - результат отрицательный.

Оценка результатов.

За положительный результат следует принимать лизис культуры минимум на два креста на месте нанесения капли фага. В качестве контроля рекомендуется включать референтные штаммы *B.melitensis* 16М, *B.abortus* 544 и *B.suis* 1330.

Дифференциальные свойства видов и сероваров рода *Brucella*: см. таблицу.

5.1.6. Иммунологические и молекулярно-биологические тесты выявления бруцелл и их растворимые антигены

Учитывая, что бруцеллы относятся к медленно растущим микроорганизмам и окончательный ответ бактериологического и биологического методов исследования можно ожидать только через 3 - 5 недель, были разработаны тесты, основанные на иммунологическом взаимодействии специфического антигена и антител (реакция иммунофлюоресценции (РИФ) - прямой метод, реакция нейтрализации антител (РНАт), иммуноферментный анализ (ИФА), а также молекулярно-биологический метод - полимеразная цепная реакция (ПЦР)). Технику постановки этих методов см. в разделе 4.

5.2. Методы выявления специфических антител

При бруцеллезе рекомендуется несколько методов, которые используются в зависимости от целей исследования.

При проведении эпидобследования населения в очагах рекомендуется: реакция агглютинации - пластинчатая (Хеддлсона), РПГА, ИФА, кожно-аллергическая проба Бюрне.

При обследовании населения перед профилактической вакцинацией: пластинчатая реакция агглютинации (Хеддлсона) или ИФА и кожно-аллергическая проба Бюрне или реакция лизиса эритроцитов.

Для диагностики острого и подострого бруцеллеза проводят бактериологические исследования, ставят реакцию агглютинации и РПГА. В случаях отрицательного результата используют реакцию Кумбса. Может быть использована ИФА.

Для диагностики хронического бруцеллеза и при проведении диспансерного наблюдения за переболевшими бруцеллезом рекомендуется реакция Кумбса, ИФА и аллергические тесты.

Серологические реакции и аллергическая кожная проба по своему диагностическому значению в различные периоды заболевания не равноценны, вследствие чего не могут заменять друг друга. Это обуславливает необходимость применения комплексного серо-аллергического метода, являющегося наиболее надежным способом диагностики бруцеллеза.

В ранние сроки от начала заболевания (в 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 (реакция агглютинации, РПГА) начинает падать. В поздние периоды заболевания большую диагностическую ценность имеет реакция Кумбса, ИФА и внутрикожная аллергическая проба.

При проведении обследования нужно учитывать, что если высокие титры антител почти всегда указывают на наличие инфекции, то 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 (*E.coli*, *V.cholerae*, *Fr.tularensis*, *Y.enterocolitica* 0 - 9, *S.typhimurium*).

5.2.1. Пластинчатая реакция агглютинации (реакция Хеддлсона)

Преимущество этого метода заключается в простоте постановки реакции, быстром получении результатов и чувствительности реакции. В качестве антигена для постановки реакции Хеддлсона и Райта применяют единый бруцеллезный диагностикум. Реакцию ставят на обычном оконном, тщательно вымытом, обезжиренном стекле, расчерченном на квадраты величиной 4 x 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 1 мл градуированной пипеткой) 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 физиологического раствора. Сыворотку осторожно смешивают с антигеном палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. Контроль антигена ставят, добавляя 0,03 мл физиологического раствора к 0,03 мл антигена. Затем стекло слегка подогревают над пламенем спиртовки так, чтобы происходило равномерное нагревание всей поверхности стекла.

В случае положительной реакции в первые же минуты в каплях сыворотки с антигеном появляются хлопья (агглютинат). Максимальный срок наблюдения 8 минут:

а) контроль сыворотки ставят с каждой испытуемой сывороткой для исключения спонтанной агглютинации;

б) контроль антигена ставят один (при любом числе испытуемых сывороток) для исключения спонтанной агглютинации применяемого антигена.

Учет реакции проводят невооруженным глазом 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, где необходимо определение титра агглютининов и их динамики, следует применять реакции Райта и Кумбса, РПГА и ИФА.

5.2.2. Реакция агглютинации в пробирках (реакция Райта)

Реакция агглютинации является одним из основных методов диагностики бруцеллеза у людей. Наибольшую диагностическую ценность реакция агглютинации представляет при острой и подострой форме бруцеллеза.

Техника постановки реакции.

В пробирки разливают физиологический раствор: в первую - 2,4 мл, в остальные по 0,5 мл. В первую 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 выливают, в результате получают в каждой пробирке по 0,5 мл следующих разведений 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 и т.д. Из первой пробирки 0,5 мл переносят в чистую пробирку и добавляют туда 0,5 мл физиологического раствора (контроль сыворотки в разведении 1:50), а 1,0 мл выливают.

Диагностикум разводят физиологическим раствором согласно прилагаемому к нему наставлению 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 часов. После инкубации пробирки выдерживают 1 - 2 часа при комнатной температуре и проводят учет реакции.

Учет реакции проводят 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 физиологическим раствором производят по схеме 1.

Схема 1

РАЗВЕДЕНИЕ АНТИГЕНА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ РАСТВОРОМ

	Степень агглютинации				
	++++	+++	++	+	-
Антиген, разведенный 1:2	0	0,25	0,5	0,75	1,0
Физ. раствор	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.

5.2.3. Антиглобулиновая проба (реакция Кумбса)

В диагностике бруцеллеза у людей и животных, особенно при хроническом течении инфекции, когда реакция агглютинации может быть отрицательной или положительной в низких титрах, важное место следует отвести выявлению неполных антител. При постановке реакции Кумбса используют предварительно оттитрованную

антиглобулиновую сыворотку против глобулинов человека (например - антиглобулиновая сыворотка для иммуноэлектрофореза против глобулинов человека) (см. схему титрации).

Техника постановки реакции Кумбса (РК).

В начале ставят реакцию агглютинации (Райта). После учета реакции агглютинации (через 20 часов) берут не менее трех пробирок первых разведений при отрицательном результате реакции агглютинации или не менее трех пробирок, начиная со слабopоложительного результата (+, ++). Эти пробирки центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 20 минут для осаждения антигена. Надосадочную жидкость осторожно отсасывают с помощью пастеровской пипетки и отбрасывают, затем в каждую пробирку наливают по 1 мл физиологического раствора, тщательно встряхивают и снова центрифугируют, таким образом осадок промывают три раза. После последнего центрифугирования к осадку отмытого антигена добавляют 0,5 мл антиглобулиновой сыворотки в рабочем титре, пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат на 18 - 20 часов. 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 взять в опыт сыворотку, содержащую неполные антитела с известным титром.

Контроль антигена. Взвесь антигена в физиологическом растворе 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 производят следующим образом. Вначале титруют положительную бруцеллезную сыворотку в реакции агглютинации (Райта). При этом делают несколько рядов разведений сыворотки, приблизительно - 8 рядов (схема 2).

Схема 2

РЕЗУЛЬТАТЫ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

N 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 схеме 1 - начиная с 1:400) и в каждой из них отмывают антиген согласно методике постановки реакции Кумбса. Затем (схема 3) делают несколько разведений титруемой антиглобулиновой сыворотки (в нашем 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. Объем жидкости в каждой пробирке должен быть доведен до 0,5 мл. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37 °С.

Результаты учитывают так же, как реакцию агглютинации. За титр антиглобулиновой сыворотки принимают ее наибольшее разведение (в нашем примере 1:80 - 4 ряд), которое выявляет неполные антитела в максимальном титре (1:3200). Для реакции Кумбса антиглобулиновая сыворотка применяется в удвоенном титре (1:40).

Схема 3

РЕЗУЛЬТАТЫ РЕАКЦИИ КУМБСА

N рядов	Разведение антиглобулиновой сыворотки	Разведения сыворотки, содержащей неполные антитела				
		1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
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	-	-	-	-	-

5.2.4. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)

РПГА является специфичным и высоко чувствительным методом выявления бруцеллезных антител в сыворотке крови человека. Для постановки РПГА необходимо иметь: а) бруцеллезный эритроцитарный антигенный диагностикум; б) контрольные (несенсибилизированные) эритроциты; в) нормальную сыворотку кролика; г) бруцеллезную сыворотку.

Для титрования испытуемых сывороток применяется нормальная сыворотка кролика, инактивированная при 56 °С в течение 30 минут и разведенная физиологическим раствором 1:100.

Испытуемую сыворотку разводят физиологическим раствором 1:25 (0,1 мл сыворотки +2,4 мл физиологического раствора) и инактивируют в течение 30 минут при 56 °С. Перед исследованием сыворотку адсорбируют 50% взвесью контрольных эритроцитов. К 1,2 мл инактивированной сыворотки добавляют 0,2 мл 50% эритроцитов, встряхивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре. Затем смесь центрифугируют при 1000 об./мин. в течение 2 минут.

Можно оставить сыворотки с эритроцитами на ночь в холодильнике (+4 °С), в этом случае исключается центрифугирование.

Эритроцитарный диагностикум перед применением разводят физиологическим раствором (рН 7,0 - 7,2) согласно указанию на этикетке и получают 2,5%-ную взвесь, которая применяется в РПГА. Контрольные (несенсибилизированные эритроциты также разводят согласно указанию на этикетке и применяют полученную 2,5%-ную взвесь для контроля сывороток).

Техника постановки РПГА.

Реакцию ставят в прозрачных полистироловых пластинках с лунками. Каждую сыворотку исследуют не менее чем в 6 - 8 разведениях, начиная с 1:50. Сначала нормальную 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 выливают. 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 выливают. 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 часа.

При постановке РПГА предусматриваются следующие контроли:

а) 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% взвеси диагностикума, во вторую - 0,05 мл контрольных эритроцитов;

б) качество диагностикума проверяют путем титрования специфической бруцеллезной сыворотки, начиная с разведения 1:50 до 1:100000. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 мл 2,5% взвеси диагностикума.

Реакция считается специфической, если в контролях исследуемых и контрольной сыворотки отсутствует гемагглютинация, а титр специфической сыворотки в реакции будет соответствовать титру, указанному на этикетке флаконов эритроцитарного диагностикума.

Оценка реакции проводится по следующей схеме:

4+ - эритроциты покрывают все дно лунки равномерным слоем, иногда наблюдается зонтик.

3+ - эритроциты выстилают 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 РПГА у людей: титр 1:50 - реакция сомнительная, титр 1:100 и выше - реакция положительная. При записи результатов РПГА следует указывать титр сыворотки.

Техника постановки РПГА микрометодом.

РПГА может быть выполнена в микрообъемах с помощью микротитратора типа Такачи (или круглодонных микропланшетах с микропипетками), который позволяет проводить титрование в объемах 25 и 50 мкл. Техника постановки реакции, последовательность всех операций такая же, как и при использовании макрометода. Следует учитывать то, что чувствительность микрометода обычно на одно разведение ниже, чем макрометода.

Для постановки реакции в микротитраторе с помощью пипетки-капельницы в каждую лунку вносят разводящую жидкость в объеме 50 мкл. Затем с помощью титраторов с головкой объемом 50 мкл забираем исследуемую сыворотку, погружая в нее головку. Титратор с сывороткой переносят в первую лунку и делают несколько вращательных движений в обе стороны. Затем титратор переносят в следующую лунку и повторяют манипуляцию. Титрование можно проводить одновременно в нескольких рядах. После титрования всего ряда титратор промывают дистиллированной водой путем вращательных движений, удаляют воду из головки с помощью тампона и обжигают ее на пламени горелки.

В лунки после титрования добавляют 25 мкл эритроцитарного диагностикума, разведенного 1:10, пластины слегка встряхивают до получения гомогенной взвеси. Учет проводят через 2 - 3 часа по аналогичной схеме, как и при использовании макрометода.

5.2.5. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод используют для диагностики всех форм заболевания, а также при эпидемиологическом обследовании населения и при 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, сенсibilизированный этим антигеном), антитела против иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой (конъюгат), контрольные (положительную и отрицательную) сыворотки человека, набор солей, необходимых для приготовления буферных растворов, субстрат - ортофенилдиндиамин (ОФД). Твин-20, бычий сывороточный альбумин (БСА), планшеты для ИФА однократного применения.

Техника постановки ИФА.

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

2. Внесение исследуемого материала. Испытуемые сыворотки, разведенные 1:200, вносят по 100 мкл в первую лунку ряда и далее последовательно путем двукратных разведений на ФСБ + твин, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), раститровывают. Параллельно на каждом планшете ставят отрицательный и положительный контроль. Планшеты встряхивают и выдерживают при 37 °С в течение 1 часа. После чего жидкость удаляют и отмывают планшеты, как указано в п. 1.

3. Внесение конъюгата. В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении (конъюгат разводят на ФСБ + твин 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% H₂O₂ в 0,1М цитратно-фосфатном буфере, рН 5,5. Инкубацию проводят при комнатной температуре 15 - 30 мин. и останавливают реакцию внесением 50 мкл 0,5 моль/л серной кислоты.

5. Учет и оценка результатов ИФА. Результат реакции можно учитывать визуально с помощью сравнения окраски в опытных и контрольных лунках, а также с помощью спектрофотометра типа Multiskan при длине волны 492 нм. Появление желто-оранжевого окрашивания в опытных лунках при его отсутствии в лунках с отрицательными контролями свидетельствует о положительной реакции. При фотометрическом учете результатов проба считается положительной, если оптическая плотность (ОП) в 2 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, с помощью микропипетки, в объеме 10 мкл вносится в микропробирку с физиологическим раствором в объеме 1 мл. Пробирку встряхивают и затем либо центрифугируют при 1000

об./мин. 5 мин., либо дают отстояться в холодильнике при 4 °С в течение 18 часов. Таким образом получают разведение сыворотки 1:200. Для постановки ИФА используют надсадочную жидкость. ИФА как скрининг-тест можно ставить в 2 лунках микропланшета, при получении сомнительного или положительного результата ИФА повторяют в количественном варианте с последующей раститровкой надсадочной жидкости. При получении положительного результата необходимо исследовать сыворотку крови.

5.2.6. Непрямой иммунофлюоресцентный метод

При использовании непрямого ИФМ для обнаружения антител к бруцеллам заранее готовят мазки из 1 - 2 суточной агаровой культуры возбудителя (1×10^9 мкл/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 большего разведения. Влажную камеру с препаратом помещают в термостат при 37 °С на 30 мин. Мазок отмывают от несвязавшихся антител и после подсыхания его вновь помещают во влажную камеру, докрашивая антивидовой люминесцирующей сывороткой в рабочем разведении. Дальнейшая обработка препарата ведется, как при прямом иммунофлюоресцентном методе (см. раздел 4). После просмотра препарата под люминесцентным микроскопом устанавливают титр антител в исследуемой сыворотке.

В качестве контролей служат 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.

5.3. Тесты, выявляющие повышенную сенсibilизацию организма к бруцеллезному антигену

5.3.1. Кожно-аллергическая проба Бюрне

Внутрикожная аллергическая проба основана на способности организма, сенсibilизированного бруцеллезным антигеном, специфически отвечать местной реакцией (отек, болезненность) на внутрикожное введение бруцеллезного аллергена. 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 шприцом с тонкой иглой (техника, тождественная реакции Манту, Шика и Дика). Учет реакции производится через 24 - 48 часов после введения аллергена путем осмотра и ощупывания кожи. В некоторых случаях аллергическая реакция становится положительной к 72 часам.

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 нормальной кожи. При слабо выраженной реакции отек распознается только при ощупывании (сравнить с аналогичным участком кожи на другой руке). Гиперемию кожи при отсутствии отека принимают за

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

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 исчезающая ранее шести часов после введения аллергена, считается неспецифической.

У людей, высокосенсибилизированных к бруцеллезному антигену, 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.

5.3.2. Реакция лизиса лейкоцитов

Введение специфического антигена в сенсибилизированный организм безразлично для обследуемого. В этой связи заслуживает внимания эффективный метод выявления гиперчувствительности замедленного типа методом *in vitro* с помощью реакции лизиса лейкоцитов (РЛЛ). РЛЛ 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 часа после взятия крови.

Техника постановки РЛЛ.

РЛЛ проводится в пробирках из химически чистого стекла. В качестве антигена используется взвесь убитых нагреванием бруцелл (может быть использован вакцинный штамм *B.abortus* 19ВА) в концентрации 1×10^7 мкл/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 физраствора 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 часа при 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 производится не менее 2 - 3 раз для каждой пробирки, а затем выводится среднее их количество. Наличие лейкоцитов после инкубации в опытной и контрольной пробирках подсчитывается по формуле: количество лейкоцитов после инкубации $\times 100\%$ количество лейкоцитов до инкубации.

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

5.4. Индикация бруцелл в объектах внешней среды, пищевых продуктах и патологическом материале

Наиболее достоверным методом обнаружения возбудителя бруцеллеза в пищевых продуктах, воде, патологическом материале являются бактериологический и биологический методы, описанные выше. Для быстрого обнаружения возбудителя бруцеллеза в первичных посевах, пищевых продуктах, воде и патологическом материале рекомендуются следующие методы: микроскопия препаратов, прямой иммунофлюоресцентный метод, реакция нейтрализации антител (РНАт), ИФА и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

5.4.1. Микроскопия

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

5.4.2. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ), прямой метод

При исследовании патологического материала от больных людей и животных, а также из объектов внешней среды может быть эффективен прямой иммунофлюоресцентный 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 воды готовят мазки (не менее 3 - 4) из осадка после центрифугирования и с мембранных фильтров. Мазки фиксируют в метиловом спирте 10 - 15 минут.

Мазки, приготовленные из проб цельного молока, сливок и осадка, после центрифугирования обезжиривают эфиром в течение 20 минут и дополнительно фиксируют 96° спиртом в течение 20 минут.

Мазки, приготовленные из мясного экстракта или осадка, фиксируют 96° спиртом в течение 20 минут.

Из селезенки белых мышей, которым был введен исследуемый материал, готовят препараты-отпечатки, которые фиксируют 96° спиртом в течение 15 - 20 минут при 37 °С или метиловым спиртом 15 минут при комнатной температуре.

При исследовании материала от абортированных плодов, различных экссудатов и органов инфицированных животных и людей готовят препараты-отпечатки, прикладывая предметное стекло к поверхности свежего среза. Затем препараты подсушивают на воздухе и фиксируют этиловым спиртом в течение 15 - 20 минут при 37 °С или метиловым спиртом при комнатной температуре 15 минут.

Б) Обработка препаратов флуоресцирующими антителами.

На фиксированные мазки наносят каплю бруцеллезной сыворотки. Для гашения неспецифического свечения фона применяют бычий альбумин, меченый 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 на этикетке (например, если рабочее разведение равно 1:20, то разводят 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 минут, затем промывают проточной водопроводной водой в течение 10 минут и высушивают на воздухе. На препарат наносят каплю забуференного глицерина (9 частей

глицерина и 1 часть забуференного физиологического раствора), покрывают покровным стеклом и исследуют под люминесцентным микроскопом.

В) Микроскопия препаратов.

Для микроскопии используется люминесцентный микроскоп МЛ-2 при силе тока 4,5, объективы 90 и 100 и окуляры 5x или 7x (в зависимости от освещенности препарата). Светофильтры следует располагать следующим образом: (от источника света) СЭС-14-14, БС-8-2, ФЗ-1-2. Окулярный фильтр Т-2Н или Ж-18, вспомогательная линза - 1,6. При микроскопии препаратов следует пользоваться нефлюоресцирующим маслом.

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.

Для оценки интенсивности специфического свечения используют четырехкрестовую систему.

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

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

5.4.3. Реакция нейтрализации антител (РНАт)

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

РНАт применяется для обнаружения бруцеллезного антигена в патологическом материале, пищевых продуктах и объектах внешней среды.

Подготовка исследуемого материала.

Материал, подозрительный на зараженность бруцеллами, перед постановкой реакции следует обезвредить путем прогревания при 100 °С (в кипящей водяной бане) в течение 10 минут. Жидкости (вода, молоко) прогревают в нативном виде. После прогревания воду и молоко центрифугируют при 3000 об./мин. 2 часа и берут для исследования осадок. Кусочки органов, брынзу и другой материал предварительно измельчают и растирают в ступке с добавлением 9 объемов физиологического раствора, 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 РПГА, и, кроме того, взвесь убитых бруцелл

8

в концентрации 5×10 мкл/мл и бруцеллезная сыворотка с высоким титром гемагглютинирующих антител.

Бруцеллезную сыворотку предварительно титруют в РПГА, 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 1:25600, то 4 единицы - 1:6400. Поскольку в РНАт бруцеллезная сыворотка берется в объеме 0,25 мл, ее следует разводить в удвоенном титре (титр 1:3200). Реакцию ставят в 4-х 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 1-й 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 1-е 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 1-го (опытного) и 3-го (контроль 2) рядов добавляют по 0,25 мл положительной бруцеллезной сыворотки 4 сывороточных гемагглютинирующих единиц (например, 1:3200).

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-м сывороточным единицам (например, 1:6400). Пластины встряхивают и ставят в термостат при 37 °С на 2 часа. Затем во все лунки четырех рядов добавляют по 0,05 мл (1 капля) 2,5% взвеси бруцеллезного эритроцитарного диагностикума. Пластины встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 - 3 часа.

Учет реакции.

При наличии бруцеллезного антигена в исследуемом материале эритроциты выпадают в осадок в виде "пуговки" или маленького колечка - реакция нейтрализации положительная. Если в исследуемом материале антиген отсутствует, то специфические антитела, добавленные в реакцию, 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 вливают по 0,025 мл (1 капля) 1% нормальной сыворотки кролика. Затем титратором с головкой, вмещающей 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 РПГА). После этого в лунки добавляют по 0,025 мл раствора бруцеллезной сыворотки в такой концентрации, чтобы в этом объеме содержалось четыре гемагглютинирующие единицы сыворотки. Пластины оставляют на 1 час 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.

Примечания. 1. Перед работой головки используемых титраторов следует предварительно обжечь.

2. При заборе материала для исследования и титрации нельзя прикасаться головкой титратора к стенкам пробирок или лунок титровальных пластинок, что может привести к удалению части жидкости.

3. Для заполнения титраторов достаточно погрузить их головки в исследуемую жидкость и убедиться в заполнении головок жидкостью.

5.4.4. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод используется для выявления бруцеллезного антигена в объектах внешней среды, пищевых продуктах и биологических объектах, а также для идентификации выделенных культур бруцелл. Метод характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, возможностью количественной и автоматизированной оценки результатов, воспроизводимостью и стандартностью основных ингредиентов анализа. С помощью ИФА можно выявить бруцеллы в концентрации $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ мкл/мл или $1 - 5$ нг/мл бруцеллезного растворимого антигена.

Для постановки ИФА используют иммуноферментную тест-систему для определения бруцеллезного антигена, в которую входят: иммуноглобулины бруцеллезные, бруцеллезный конъюгат, бруцеллезный антиген (ЛПС), набор солей, необходимых для приготовления буферных растворов, субстрат - ортофенилиндиамин (ОФД). Твин-20, бычий сывороточный альбумин (БСА), 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. Сенсibilизация 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, рН 7,2. Планшеты помещают в термостат на 2 часа при 37 °С или в холодильник на 18 часов при 4 °С. После окончания адсорбции иммуноглобулины удаляют из лунок планшета встряхиванием и трехкратно отмывают раствором ФСБ, содержащим 0,1% твина-20.

2. Внесение исследуемого материала. Исследуемый материал в разведениях (двух- или десятикратных) на ФСБ + твин, содержащий 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 1000 нг/мл и каждое разведение антигена вносят в количестве 100 мкл в лунки планшета. Планшеты выдерживают в термостате при 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 конъюгата в рабочем разведении (конъюгат разводят на ФСБ + твин, содержащий 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% H₂O₂ в 0,1М цитратно-фосфатном буфере, рН 5,5. Планшеты помещают в темное место при комнатной температуре 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 (от светло-коричневой до оранжево-коричневой) визуально или 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. При фотометрическом учете результатов анализа проба считается положительной, если ее оптическая плотность (ОП) в 2 и более раз превосходит наивысшее значение ОП отрицательных контролей, которое не должно превышать 0,2.

5.4.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

В последние годы для определения ДНК бруцелл в различных объектах используется ПЦР. В основе метода ПЦР лежит многократное копирование (амплификация) специфического фрагмента ДНК-мишени, который является маркерным для данного вида. ПЦР обладает высокой чувствительностью, позволяет выявить 100 - 1000 бактериальных клеток в пробе. Важным преимуществом перед иммунологическими тестами выявления бруцеллезного антигена является высокая специфичность ПЦР (отсутствуют перекрестные реакции с ДНК *E.coli*, *V.cholerae*, *F.tularensis*, *Y.enterocolitica* 0 - 9, *Y.pestis* EV, *S.typhimurium*). Подготовку проб для исследования (выделение ДНК) и проведение ПЦР осуществляют с помощью специального набора, в который включены все необходимые ингредиенты. При диагностике бруцеллеза у людей ДНК определяют в сыворотке крови, спинномозговой и синовиальной жидкости и др. Оценку результатов ПЦР следует проводить с учетом того, что специфический праймер для проведения этой реакции является родовым и выявляет ДНК всех видов бруцелл, в т.ч. и вакцинные штаммы. Это необходимо учитывать в эндемичных по бруцеллезу регионах, где для вакцинации животных используются живые бруцеллезные вакцины, которыми может быть инфицирован обслуживающий их персонал.

6. РЕЦЕПТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

6.1. Печеночные среды

а) Печеночный настой.

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 часов или при температуре 4 - 10 °С в течение 6 - 10 часов. Затем эту смесь перемешивают и варят в автоклаве текучим паром в течение 20 минут. Можно варить и в котле, постоянно помешивая. В процессе варки снимают накипь, вновь все перемешивают и доваривают еще около двух часов. После варки настой фильтруют через тонкий ватно-марлевый фильтр.

Приготовленный таким образом печеночный настой разливают по бутылкам и стерилизуют в течение 20 минут при 115 - 120 °С.

б) 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 рН 7,4, фильтруют через фильтровальную бумагу и стерилизуют 20 минут при 115 - 120 °С, рН бульона после стерилизации должен быть 7,1 - 7,2.

в) 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, рН 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 115 °С в течение 20 минут, отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, предварительно смоченный теплой водой и вновь устанавливают рН 7,1 - 7,2.

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

6.2. Мясопептонные среды

а) 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 часов в прохладном месте.

В дальнейшем настой варят 30 - 40 минут, фильтруют через ватно-марлевый фильтр или через полотно.

Полученную мясную воду, в случае заготовления впрок, стерилизуют при 120 °С в течение 20 минут.

б) Мясопептонный бульон.

На 2 л мясной воды добавляют 10 г сухого пептона и 5 г химически чистого хлористого натрия. Смесь подщелачивают до рН 7,4 и кипятят в течение 20 минут. После этого фильтруют через бумажный фильтр, разливают в необходимую посуду и стерилизуют при 115 - 120 °С в течение 20 минут. рН среды после стерилизации должен быть 7,2.

в) 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 рН 7,8, варят до полного расплавления агара. Затем разливают в бутылки и стерилизуют при 110 °С в течение 15 - 20 минут. После стерилизации среду отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, предварительно смоченный теплой водой, затем разливают в необходимую посуду и вновь стерилизуют 15 - 20 минут при 110 °С, после стерилизации вновь устанавливают рН среды до 7,2.

6.3. Сыворотно-декстрозный агар

Основой этой среды является питательный агар, который готовят следующим образом: к 835 мл дистиллированной воды добавляют 15 г агар-агара, 10 г пептона, 5 г химически чистого хлористого натрия и 165 мл мясной воды.

Все ингредиенты вводят в сосуд и подвергают обработке текучим паром в течение 1 часа. Устанавливают рН 7,8. Затем сосуд ставят в автоклав и подвергают одномоментному давлению 2 атмосферы при 121 °С для выпадения в осадок фосфатов. Среду фильтруют через бумажные фильтры, устанавливают рН 7,4, а затем разливают в мерную посуду и стерилизуют при температуре 116 °С в течение 15 минут. 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 56 °С 30 минут) лошадиную или бычью сыворотку и раствор декстрозы, предварительно простерилизованный путем фильтрации через фильтр Зейтца, так, чтобы окончательная концентрация сыворотки была 5% и декстрозы - 1%.

6.4. Кровяной агар

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

Для приготовления кровяного агара к основной среде добавляют 5% дефибрированной овечьей крови.

6.5. 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, измеряют 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 промытый агар-агар - 30 г.

Все помещают в кастрюлю и варят до полного расплавления агара: рН 7,2 устанавливают 10%-ным раствором едкого натрия.

После этого стерилизуют в автоклаве при 110 °С в течение 30 минут, фильтруют, добавляют 10 г глюкозы и вновь стерилизуют при 116 °С 30 минут. После автоклавирования к среде добавляют 10% нормальной инактивированной стерильной лошадиной или овечьей сыворотки.

6.6. 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 120 °С в течение 20 минут (рН 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 120 °С в течение 20 минут (рН среды 7,2).

6.7. 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 агара-агара, устанавливают рН 7,3.

Затем все растворяют в автоклаве под текущим 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 рН 7,2 - 7,3. Разливают в необходимую посуду и стерилизуют 40 минут под текущим паром, а потом при 110 °С в течение 20 минут.

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

6.8. Среда для культивирования *Bt. ovis*

Основой этой среды является печеночный или мясопептонный агар, к которому добавляют 1% декстрозы (глюкозы) и 2% глицерина. Среду разливают в необходимую посуду и стерилизуют при 116 °С в течение 15 минут. Перед посевом к расплавленной и остуженной до 50 °С среде добавляют 20% нормальной сыворотки крупного рогатого скота или 10% аминокептида и 10% сыворотки.

6.9. Среда для выделения и культивирования

L-культур бруцелл

Основой этой среды является питательный агар, который готовится с использованием: а) печеночного настоя или б) мясной воды.

Приготовление агара из расчета на 1 л среды:

а) 500 мл печеночного настоя;

500 мл водопроводной воды;

10 г сухого пептона;

б) 280 мл мясной воды;

280 мл водопроводной воды;

440 мл мартеновского пептона.

Добавляют 5 г химически чистого хлористого натрия, 30 г агар-агара, промытого водопроводной водой, рН устанавливают 7,8.

Смесь кипятят до полного расплавления агара. Затем разливают в бутылки и стерилизуют при 115 °С в течение 15 - 20 минут, отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, смоченный теплой водой. После фильтрации добавляют 10 г глицерина и 10 г глюкозы, устанавливают рН 7,2 и вновь стерилизуют при 110 °С в течение 20 минут.

Заготовленный таким образом агар по мере надобности (перед посевом крови) расплавляют в водяной бане, охлаждают до 50 °С и к нему добавляют 25% нормальной лошадиной сыворотки (предварительно простерилизованной через фильтр Зейтца), 25% печеночного или мясопептонного бульона (в соответствии с основой агара), содержащего 50 - 100 ед. пенициллина на 1 мл среды.

Посев крови, в объеме не менее 5 мл, пунктатов костного мозга и лимфоузлов производят на питательную среду сразу же после застывания агара и добавления бульона (метод предложен лабораторией бруцеллеза НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

1. Федеральный закон "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" от 30 марта 1999 г. N 52-ФЗ.

2. Постановление Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. N 554 "Об утверждении Положения о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации и Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании".

3. Санитарные правила по безопасности работ с микроорганизмами. Ч. I "Порядок выдачи разрешения на работу с микроорганизмами I - IV групп патогенности и рекомбинантными молекулами ДНК (СП 1.2.006-93)".

4. Санитарные правила "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности. СП 1.2.011-94".

5. Санитарные правила "Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I - IV групп патогенности. СП 1.2.036-95".

6. Санитарные правила "Условия транспортировки и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. СП 3.3.2.028-95".

7. "Бруцеллез. СП 3.1.085-96, ВП 13.3.1302-96", сборник санитарных и ветеринарных правил "Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных".

8. "Бруцеллез. Методические рекомендации по диагностике, лечению и реабилитации больных", 1987.

Приложение

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВИДОВ И БИОВАРОВ РОДА BRUCELLA

Вид	Био-вар	Потребность в CO2	Продукция H2S	Рост на средах с красками		Агглютинация с моноспецифическими сыворотками			Лизис фагом "ТБ" RTD	Основной хозяин
				тионин	основн. фуксин	А	М	R		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B.abortus	1	(+)	+	-	+	+	-	-	Л	крупный рогатый скот
	2	(+)	+	-	-	+	-	-	Л	
	3 <*>	(+)	+	+	+	+	-	-	Л	
	4	(+)	+	-	(+) <***>	-	+	-	Л	
	5	-	-	+	+	-	+	-	Л	
	6 <*>	-	(+)	+	+	+	-	-	Л	
	9	-	+	+	+	-	+	-	Л	
B.melitensis	1	-	-	+	+	-	+	-	ОЛ	овцы, козы
	2	-	-	+	+	+	-	-	ОЛ	
	3	-	-	+	+	+	+	-	ОЛ	
B.suis	1	-	+	+	(-) <***>	+	-	-	ОЛ	свиньи
	2	-	-	+	-	+	-	-	ОЛ	свиньи, зайцы
	3	-	-	+	+	+	-	-	ОЛ	свиньи
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	ОЛ	олени
	5	-	-	+	-	-	+	-	ОЛ	мышевидные грызуны
B.neotomae		-	+	-	-	+	-	-	ОЛ или ЧЛ	пустынные кустарниковые крысы
B.ovis		+	-	+	(-)	-	-	+	ОЛ	овцы
B.canis		-	-	+	-	-	-	+	ОЛ	собаки

Л - полный лизис, ЧЛ - частичный лизис, ОЛ - отсутствие лизиса.
Концентрация - 1:50000, + (+) большинство штаммов положительные, (-) большинство штаммов отрицательные.

<*> Для более точной дифференциации B.abortus биовар 3 и 6 используется тионин 1:25000 (биовар 3+, биовар 6-).

<***> Некоторые штаммы этого биовара (биовар 4) ингибируются основным фуксином.

<***> Некоторые штаммы могут быть резистентны к основному фуксину, пиронину и сафронину О.