

**ФКУЗ Ставропольский противочумный институт  
Роспотребнадзора**

# **Лабораторная диагностика бруцеллеза**

**К.м.н. Русанова Д.В.**

**Ставрополь, 2017**

## Бруцеллез (*Brucellosis*) –

острая или хроническая бактериальная инфекционно-аллергическая болезнь, общая для человека и животных, которая характеризуется

- интоксикацией,
- преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата,
- нервной,
- сердечно-сосудистой,
- мочеполовой систем и
- других органов;
- затяжным течением, приводящим, как правило, к инвалидизации.

# История открытия возбудителя

- Начало изучения бруцеллезной инфекции было связано со сложной эпидемиологической обстановкой, сложившейся среди солдат английских колониальных войск в бассейне Средиземного моря в середине 19 века.
- Во второй половине 19 века на острове Мальта военный гарнизон численностью 3-4 тыс. солдат в течение года почти полностью переболел тяжелым инфекционным заболеванием, о природе которого тогда не было известно.
- Английское правительство, обеспокоенное сложившимся обстоятельством, для изучения природы инфекции организовало в средиземноморский регион научные экспедиции, состоящие из высококвалифицированных по тем временам кадров микробиологов, иммунологов, эпидемиологов и других специалистов.



# История открытия возбудителя

Именно тогда в 1861 г. впервые бруцеллезная инфекция, как самостоятельная нозологическая единица, была описана хирургом ВМФ Британии **Д.А. Мерстоном** [Marston J.A., 1861] под названием «средиземноморская ремитирующая или гастрическая ремитирующая лихорадка» (мальтийская лихорадка), хотя до этого характерные для этой инфекции клинические симптомы были описаны еще в трудах Гиппократа и рядом других более поздних вплоть до 18 века авторов.

Описывая неизвестную болезнь Джеффри Аллен Мерстон указывал:

- лихорадка неправильного типа, волнообразная, рецидивирующая, изнуряющая, средняя продолжительность, гипертермии 6-7 дней;
- лихорадка сопровождается прогрессирующей анемией, склонностью к запорам, отеки в области суставов, обильное потоотделение;
- явления пояснично-крестцового радикулита, другие нервные явления;
- при вскрытии трупов: резкое увеличение и размягчение селезенки, большинство органов интенсивно наполнены кровью;
- болезнь регистрировалась преимущественно в жаркие сухие месяцы с мая по октябрь, максимальная заболеваемость в июле, августе, сентябре.

Болели преимущественно мужчины, причиной болезни считал антисанитарию, высказывал предположение, что возбудитель болезни «прибыл» воздушно-капельным путем с берегов острова Мальта.



ABOVE: Jeffery Allen Marston (1831-1911) contracted Malta fever and described his own case in great detail.  
*Private collection*

В 1896 г. английским ученым **Брюсом** [Bruce D., 1896] в мазках селезенки умершего от мальтийской лихорадки британского солдата, был обнаружен возбудитель.

В 1897 г. Брюс выделил возбудителя в чистом виде и назвал его ***Micrococcus melitensis***.

- Он определил, что выделенный микроорганизм рос лучше при более высоких температурах, объяснив этим увеличение частоты случаев болезни в жаркие летние месяцы.
- Позже установил, что козы являются основным резервуаром для инфекции, выделив возбудителя из их крови, мочи и молока.

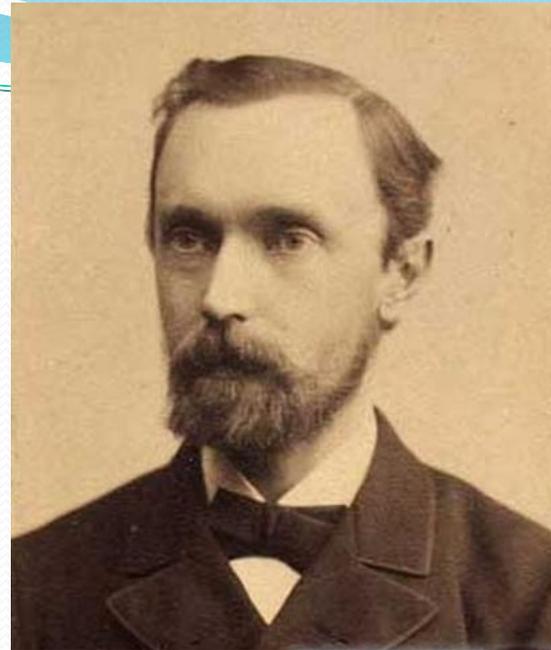


Генерал-майор сэр Дэвид Брюс

В ветеринарной практике было давно известно заболевание коров, приводящее к выкидышам недоношенного плода. Заболевание носило название инфекционного аборта крупного рогатого скота.

В 1897 году датский ученый, врач и ветеринар **Бернхардт Банг** (1848–1932) [Bang V., 1897] впервые установил, что возбудителем инфекционного аборта является микроб, обнаруженный в экссудате между маткой и плодовыми оболочками у абортировавшей коровы. Выделенный в чистой культуре микроорганизм получил название ***Bacillus abortus bovis***.

Открытие Банга в дальнейшем было подтверждено рядом других исследователей, и возбудитель получил общее признание.



В 1897 г. английские исследователи **Райт и Семпл** [A. Wright and D. Semple, 1897] установили, что сыворотка крови больных мальтийской лихорадкой обладает способностью специфически агглютинировать культуры ***Micrococcus melitensis***.

Этот принцип, в последующем получивший название **реакции Райта**, лег в основу серологической диагностики бруцеллеза и до настоящего времени остается одним из основных методов при диагностике бруцеллезной инфекции среди людей и животных.



A. Wright



Mr. DUGALD SEMPLE.

К концу XIX века были определены основные характеристики бруцеллезной инфекции с точки зрения этиологии, клиники и диагностики.

Резервуар возбудителя мальтийской лихорадки был выяснен окончательно в 1904-1907 гг. случайно в ходе исследований специальной английской комиссии, работавшей на о. Мальта.

Один из членов комиссии **Т. Заммит** [T. Zammit, 1904] в 1904 г., предварительно обследуя приобретенных для опытов коз, неожиданно установил наличие у части из них (у 5 из 6) резко выраженной реакции агглютинации с ***Micr. melitensis***.

Эти данные были подтверждены другими исследователями.



- В результате было установлено, что на острове Мальта резервуаром *Micr. melitensis* являются козы.
- Заражение людей происходит при употреблении сырого козьего молока, заменяющего на этом острове коровье молоко.
- Эти данные послужили основой для разработки профилактических мероприятий среди английских воинских частей, расположенных на острове Мальта.
- С июня 1906 г. в гарнизоне было запрещено употребление сырого козьего молока. Это простое мероприятие дало положительные результаты.
- В 1905 году больных мальтийской лихорадкой в гарнизоне было 643, а после запрещения к употреблению козьего молока в 1907 г. число больных сократилось до 7, и в дальнейшем заболевания практически не регистрировались.
- Опыт снижения заболеваемости среди английских солдат определил один из основных подходов к профилактике бруцеллезной инфекции.

S. Traum [1914] от абортировавших свиней выделил третий тип – ***Bac. abortus suis***, вызывающий инфекционные аборты у свиней.

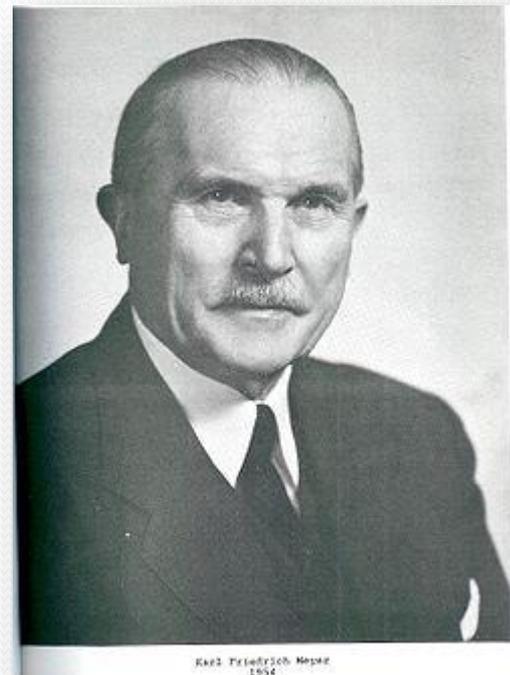
Американская исследовательница А. Evans в 1918 г. установила морфологическое и культуральное сходство *Micr. melitensis* и *Bac. abortus bovis* и показала, что с помощью РА невозможно отдифференцировать эти два вида возбудителя.



Алиса С. Эванс

В 1920 г. Мейер и Фезье [K. Meyer et Feusier] подтвердили наблюдения А. Эванс и на этом основании объединили возбудителей мальтийской лихорадки и инфекционного аборта в одну группу под названием ***Brucella***, в честь открывшего их первого исследователя Д. Брюса.

В дальнейшем в эту группу был включен и ***Bac. abortus suis***.



- В 1953 г. в Австралии выделен четвертый вид бруцелл, названный в 1956 г. ***Brucella ovis***.
- Н. Stoenner, D. Lackman [1957] от пустынных кустарниковых крыс (*Neotomae lepida Thomas*) выделили еще один вид возбудителя, утвержденный в 1966 г. как ***Brucella neotomae***.
- В 1966 г. от гончих собак в питомниках США выделена культура бруцелл, получившая название ***Brucella canis*** [Leland E Carmichael, 1966].



В целях упорядочения классификации бруцелл при международном комитете по систематической бактериологии ВОЗ был организован подкомитет по таксономии ***Brucella***.

До 1986 г. род *Brucella* был представлен 6 самостоятельными видами, в который выделялись биовары:

*B. melitensis* – 3 биовара,

*B. abortus* – 7 биоваров,

*B. suis* – 5 биоваров,

*B. neotomae*,

*B. ovis*,

*B. canis*.

На основании анализа ДНК представителей рода представители были отнесены к одному единственному виду *B. melitensis* [1986]



World Health  
Organization

Подкомитет по таксономии бруцелл [2008] выделил еще два самостоятельных вида бруцелл, изолированных от морских млекопитающих:

***B. ceti*** – китообразные [2001, 2007],  
***B. pinnipedialis*** – ластоногие [2007].



В 2008 г. Scholz H.C. et al., описали факт выделения от серой полевки в Чешской Республике коккобактерий, которые после детального изучения фенотипических и генотипических признаков были отнесены к роду *Brucella*. Позже обнаружен у лис и в почве.

Специфичность этих признаков позволило отнести культуры к новому виду – ***B. microti*** [2008].

У 71-летней больной с клиническими признаками бруцеллеза, из участков воспаления на месте импланта молочной железы был выделен ***B. inopinata*** [H.C. Scholz et al., 2009].

## Род *Brucella*

Вид	Биовары	Основной хозяин
<i>Brucella melitensis</i> [1886,1920]	1, 2, 3	Овцы, козы
<i>Brucella abortus</i> [1897, 1920]	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9	Крупный рогатый скот
<i>Brucella suis</i> [1914]	1	Свиньи
	2	Свиньи, кабаны, зайцы
	3	Свиньи, кабаны
	4	Северные олени
	5	Мышевидные грызуны
<i>Brucella ovis</i> [1953]		Бараны
<i>Brucella neotomae</i> [1957]		Пустынные кустарниковые крысы
<i>Brucella canis</i> [1968]		Собаки
<i>Brucella ceti</i> [2001, 2007]		Китообразные (морские свиньи, дельфины)
<i>Brucella pinnipedialis</i> [2007]		Ластоногие (тюлени)
<i>Brucella microti</i> [2008]		Полевка серая
<i>Brucella inopinata</i> [2009]		Имплант молочной железы

*Brucella rapionis* – 2 штамма выделены из клинических образцов, полученных от бабуинов (*Papio SPP.*), у которых выявлены случаи мертворожденного потомства.

# Микробиология возбудителя бруцеллеза

## Научная классификация

Домен:	Бактерии
Тип:	Протеобактерии
Класс:	<i>Alphaproteobacteria</i>
Порядок:	<i>Rhizobiales</i>
Семейство:	<i>Brucellaceae</i>
Род:	<i>Brucella</i>

Являясь внутриклеточно паразитирующими м/о, бруцеллы демонстрируют близкую родственность с почвенными организмами (*Ochrobactrum*), растительными симбионтами (*Rhizobium spp.*) и фитопатогенами (*Agrobacterium spp.*).

Бруцеллы всех видов мало отличаются друг от друга по морфологическим признакам.

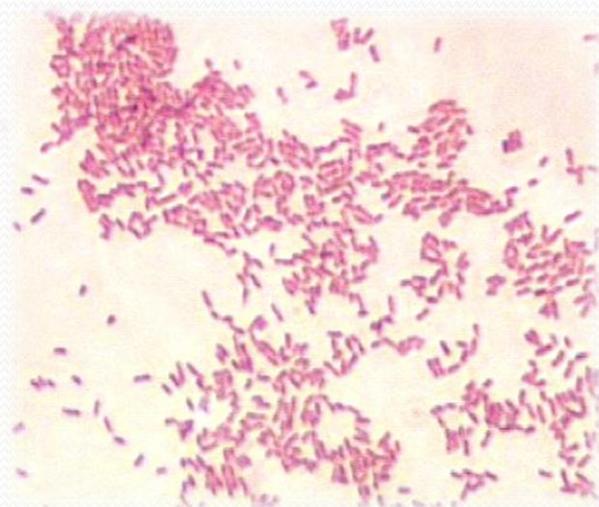
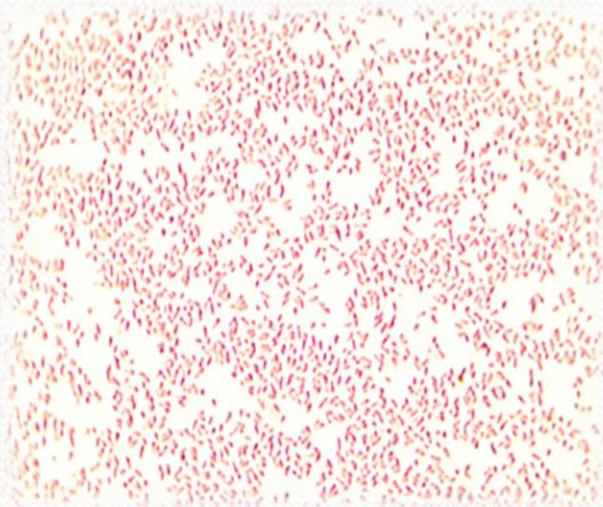
Это микроорганизмы шаровидной, овоидной или палочковидной формы, расположены одиночно, парами, короткими цепочками, небольшими скоплениями.

Размеры микробной клетки в среднем составляют 0,3 – 0,6 мкм для кокковых форм и 0,5 – 0,7 × 0,6 – 1,5 мкм – для палочковидных (0,6 – 2,5 мкм для палочковидных).

Спор, капсул не образуют, жгутиков не имеют, неподвижны.

Окрашиваются всеми анилиновыми красителями, грамотрицательны.

При определенных условиях (воздействие специфическим бактериофагом, выращивание на средах с добавлением 10% иммунной сыворотки и т.п.) образуют «капсулу» (слизеподобное вещество) – М-формы.



Для бруцелл характерно явление диссоциации (изменение исходных свойств культуры), которое проявляется в различной степени выраженности (SR-, R-, RS-, M-колонии).

Патогенными для человека являются бруцеллы, находящиеся в **S-форме**.

Восстановление исходного состояния культуры достигается путем её пассажа на плотных питательных средах или через биопробных животных.

Бруцеллы видов *B. ovis* и *B. canis* циркулируют в организме чувствительных животных в **R-форме**.

# L-формы *Brucella*

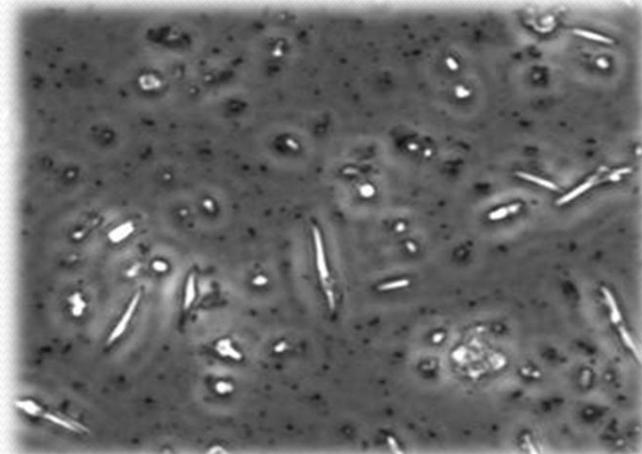
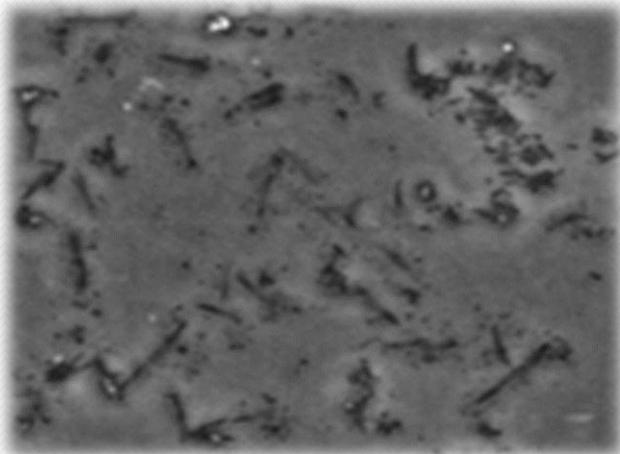
У бруцелл описаны и L-формы, которые в ряде случаев выделяются из крови больных.

L-колонии бруцелл могут быть изолированы в виде нежного сплошного налета, они имеют золотистый цвет, часто врастают в агар.

## L-формы бруцелл:

- 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 также могут находиться клетки от 0,2 до 0,5 мкм, гетероморфные или близкие по морфологии к нормальным клеткам бруцелл.



## Бруцеллы:

- 1) хемоорганотрофы (прокариоты, использующие в качестве источника энергии химические соединения, а в качестве источника углерода – органические вещества);
- 2) каталаза- и оксидазаположительные (кроме *B. ovis* и *B. neotomae*).
- 3) факультативные анаэробы – культивирование культур вида *B. ovis* и первых генераций вида *B. abortus* возможно только в анаэробных условиях (5-10 % углекислого газа). Культуры других видов растут в обычных условиях.

## Бруцеллы:

- 4) требовательны к составу питательных сред;
- 5) размножаются достаточно медленно, особенно в первых генерациях;
- 6) максимальный рост наблюдается при pH – 6,8-7,4 (оптимум 7,2);
- 7) наилучшей температурой культивирования бруцелл является температурный диапазон от 34 до 37 °С (оптимум 37 °С).

Особенностью питательных потребностей обладают культуры вида *B. ovis*. Для культивирования штаммов данного вида необходимы среды, в состав которых дополнительно вносится 20 % нормальная сыворотка КРС (или 10 % нормальная кроличья сыворотка и аминокислоты).

# Питательные среды для выделения и культивирования *Brucella spp.*:

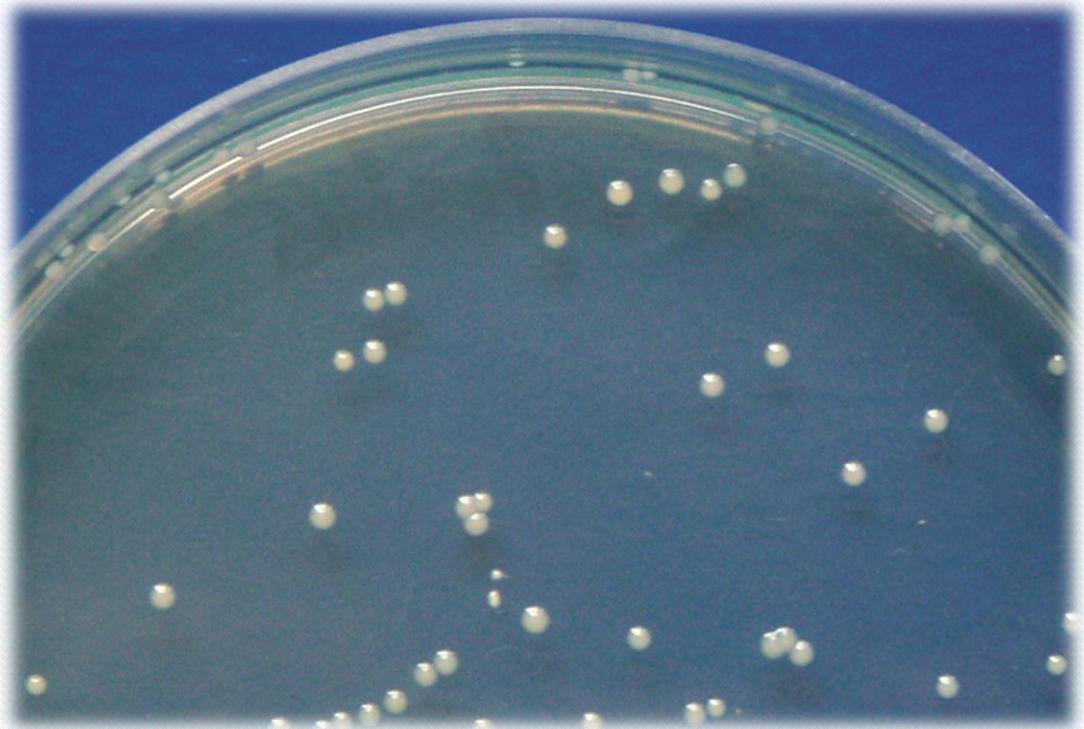
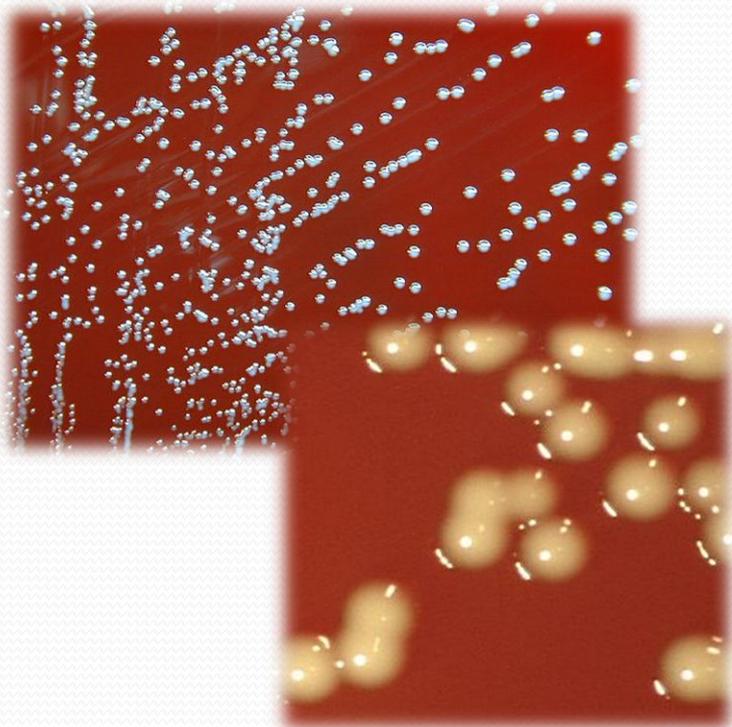
## **Плотные ПС:**

- 1) мясо-пептонный агар,
- 2) печеночный агар,
- 3) глюкозо-глицериновый агар,
- 4) сывороточно-декстрозный агар,
- 5) эритрит-агар,
- 6) агары Мартена и Альбими,
- 7) среда «Д»,
- 8) среда для культивирования *B. ovis* (основой является печеночный или мясопептонный агар),
- 9) среда для выделения и культивирования L-культур бруцелл (основой является питательный агар, который готовится с использованием печеночного настоя или мясной воды).

## **Жидкие ПС (бульоны):**

- 1) мясопептонный,
- 2) печеночный,
- 3) глюкозо-глицериновый,
- 4) эритрит-бульон,
- 5) бульоны Мартена и Альбими,
- 6) питательная среда жидкая для транспортировки биоматериала и накопления бруцелл.

На плотных питательных средах культура в S-форме формирует бесцветные, выпуклые колонии с гладкой поверхностью, которые прозрачны в проходящем свете, в отраженном – имеют янтарный оттенок. Величина колоний различна: от относительно крупных (3-4 мм в диаметре) до точечных (0,05-0,1 мм). С возрастом колонии постепенно мутнеют.



# Антигенная структура

Первые сведения об антигенной структуре относятся к 1932 г., когда *Wilson, Miles* описали наличие у бруцелл двух антигенов А и М, которые проявляли видоспецифичность.

У бруцелл вида *B. melitensis* преобладал антиген М, у бруцелл видов *B. abortus* и *B. suis* – антиген А.

**В настоящее время у бруцелл описаны также:**

- два полисахара (чистый гаптен и В полисахарид),
- минимум 20 белковых или гликопротеиновых антигенов.

Как и другие грамотрицательные микроорганизмы бруцеллы содержат липополисахарид (ЛПС), как основной компонент их наружной мембраны и важный фактор вирулентности.

**Морфология колоний (S-, R-) зависит от структуры ЛПС:**

Гладкий фенотип (S-форма) формируется благодаря присутствию полного ЛПС, который состоит из липида А, корового олигосахарида и О-боковых цепей полисахарида.

ЛПС шероховатых штаммов (R-форма) не содержит боковые О-цепи.

ЛПС антигены являются поверхностными антигенами, в то время как большинство белковых антигенов обнаруживается в соме микробной клетки.

Наличие перекрестных реакций с антигенами *E. coli*, *V. cholerae*, *F. tularensis*, *Y. enterocolitica* O9, *Y. pestis* EV, *S. typhimurium*.

# Факторы патогенности

- гиалуронидаза;
- S-ЛПС;
- продукция аденина и гуанина монофосфатов, которые ингибируют функцию фагоцитов;
- Cu-Zn-пергидроль дисмутаза, которая считается ответственной за кислородопосредованный фагоцитоз;
- стресс-индуцированные протеины, которые активизируют выживание микробных клеток бруцелл внутри макрофагов.

# Устойчивость во внешней среде

Бруцеллы относительно стабильны в окружающей среде и способны длительное время сохраняться в различных субстратах.

- во влажной среде при  $t$  55 °С погибает через 60 мин, при 60 °С – через 30 мин, при 70 °С – через 10 мин, при кипячении - моментально.
- сухой жар (90-95 °С) убивает бруцеллы в течение часа.
- при низких температурах бруцеллы сохраняют жизнеспособность при температуре минус 5-8 °С в течение 35 дней, а при минус 20 °С - в течение 20 дней.
- под действием солнечного света бруцеллы погибают в сроки от нескольких минут до 7-8 дней в зависимости от интенсивности инсоляции и атмосферных условий.
- в сыром молоке, хранящемся в холодильнике, возбудитель бруцеллеза сохраняется до 10 дней, в сливочном масле – более 4 недель, в домашнем сыре – 3 недели, брынзе – 45 дней; в простокваше, сметане – 8-15 дней, в кумысе, шубате – до 3 суток; в мясе – до 12 дней;
- во внутренних органах, костях, мышцах и лимфатических узлах инфицированных туш – в течение 1 мес. и более;
- в овечьей шерсти, смушках – от 1,5 до 4 мес.;
- В замороженных инфицированных мясных и молочных продуктах бруцеллы остаются жизнеспособными в течение всего срока хранения.

К патогенным для человека бруцеллам, способным вызывать заболевание, относятся возбудители бруцеллеза вида:

- *B. melitensis*;
- *B. abortus*;
- *B. suis*,

циркулирующие в очагах бруцеллеза крупного и мелкого скота, а также свиней.

*B. abortus* и *B. suis* вызывают спорадическую заболеваемость.

*B. melitensis* способен вызывать групповые заболевания.

Что касается *B. canis*, то известны случаи заболевания людей, заразившихся от собак бруцеллами вида *canis*, однако эпидемиологическая значимость этих видов бруцелл до конца не изучена.

## **Группы методов, используемые для лабораторной диагностики бруцеллеза у людей:**

- 1) тесты, позволяющие выявить возбудителя заболевания и его растворимые антигены;
- 2) методы определения специфических антител;
- 3) тесты, выявляющие сенсибилизацию организма к бруцеллезным антигенам.

### **Для реализации этих задач применяются следующие методы:**

- 1) бактериологический метод;
- 2) биологический метод;
- 3) серологический метод;
- 4) аллергологический метод;
- 5) молекулярно-генетические методы.

### **Материал для исследования:**

- **От людей** – кровь, костный мозг, грудное молоко, ликвор, моча, желчь, мокрота, суставная жидкость, гной из абсцессов, секционный материал.
- **От животных** – кровь, abortированные плоды, околоплодные воды, желудки abortированных плодов с их содержимым, внутренние органы (лимфатические узлы, печень, селезенка, костный мозг) abortированных плодов и «забитых» животных, влагалищные выделения, молоко.
- **Пищевые продукты** – молоко, сливки, творог, сыр, мясо.
- **Внешняя среда** – вода, почва, навоз, смывы.

# ИНДИКАЦИЯ (выделение)

- **Бактериологический метод**

- медленный рост на питательных средах, особенно в первых генерациях;
- кровь, костный мозг, моча – культуры бруцелл обнаруживаются через 5 – 10 дней (иногда через 20 – 30 дней после засева);
- 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 9 могут расти в обычных аэробных условиях.

# Исследование крови и другого биологического материала



## **Правила забора крови для бактериологического исследования:**

- Посевы крови делают во время лихорадочного состояния больного.
- Кровь для посева следует брать до начала лечения антибактериальными препаратами (АБП).
- Посев на питательную среду (ПС) желательно произвести у постели больного.
- Отрицательные результаты бактериологического исследования не могут служить основанием для отрицания диагноза «бруцеллез».

## Посев по **методу Кастанеда** [M.R. Castaneda, 1947]:

- кровь сеют во флаконы на бифазную среду (плотная основа и жидкая фаза) (можно так же сеять чистый материал – ликвор, костный мозг).
- венозную кровь берут в количестве не менее 10 мл и засевают по 5 мл в два флакона: один из флаконов инкубируют при повышенном содержании углекислоты (5 – 10%), а другой – в обычных условиях при температуре 37° С.
- Посевы просматривают начиная с 4-го дня после посева, затем на 7-10-15 и т.д. дни. Если в течение месяца бруцеллы не обнаруживаются, то в этом случае делают контрольный высеv из бульона на твердую питательную среду.
- Если на плотной ПС не выделили *Brucella*, то можно говорить, что культура не выделена.
- В «+» случае на плотной ПС (бифазной) есть рост, и, следовательно, делают посев на скошенный агар в пробирке. Инкубируют при T-37° С в течение 48 часов.

## Выделение L-форм бруцелл

L-формы бруцелл могут выделяться из крови больных в следующих случаях:

- 1) у больных, прошедших курс лечения антибиотиками (через 1 месяц и спустя 4–6 месяцев после окончания курса антибиотикотерапии);
- 2) у больных хронической формой бруцеллеза в период обострения (особенно при субфебрилитете) перед началом лечения.

- Посевы рекомендуется проводить на специальную **питательную среду для выделения L-культур бруцелл.**
- **Способ посева** бактериологического материала для выделения L-культур идентичен с методом выделения бактериальных гемокультур.
- Посевы выдерживаются в термостате не менее 35 – 40 дней.
- **Материалом для исследования** являются: кровь, пунктаты костного мозга и лимфатических узлов, моча, спинномозговая жидкость, экссудат из бурситов, грудное молоко, желчь, мокрота, трупный материал.
- Посевы проводят на твердые и жидкие питательные среды.

# Исследование культуры, загрязненной посторонней микрофлорой

**I. Посев на питательные среды с добавками для задержки роста посторонней микрофлоры (бактериологический метод):**

1) генцианвиолет из расчета 1:200 000;

2) антибиотики: полимиксин – 3 мкг/мл и амфоглюкамин – 3 мкг/мл;

3) пропись для подавления роста посторонней микрофлоры: полимиксин В – 6 мг/л, бацитрацин – 25 мг/л, амфотерицин В – 1 мг/л, циклогексимид – 100 мг/л, Д-циклосерин – 100 мг/л, налидиксовая кислота – 5 мг/л, ванкомицин – 20 мг/л (Комитет экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу).

## Исследование культуры, загрязненной посторонней микрофлорой (продолжение)

### **II. Заражение лабораторных животных (биологический метод):**

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 производят на момент генерализации инфекции:

белые мыши – через 20 – 25 дней,

морские свинки – через 30 – 35 дней после введения исследуемого материала.

- **Посевы на питательные среды органов животных:**

– белые мыши (5 органов): паховые л/узлы, аксиллярные л/узлы, подчелюстные л/узлы, селезенка, парааортальные л/узлы.

– морские свинки (7 органов): паховые л/у, аксиллярные л/у, шейные л/у, подчелюстные л/у, печень, селезенка, парааортальные л/у + кровь из сердца (для исследования сыворотки в реакции агглютинации).

- Посев производят на скошенный агар в пробирках и в пробирку с бульоном.
- Инкубируют при  $T-37^{\circ}C$  в течение 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.

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ

(определение родовой принадлежности)

- Критерии:

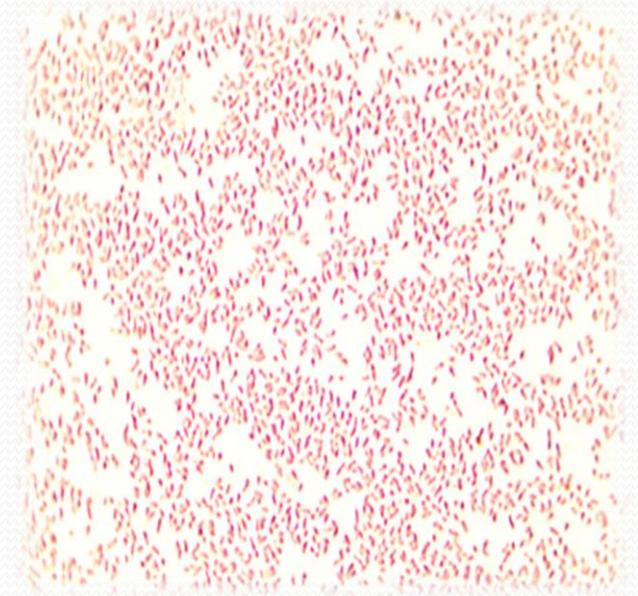
- 1) Морфология микробных клеток в мазках и тинкториальные свойства (бактериоскопия).
- 2) Характер роста культур на жидкой и плотной ПС.
- 3) Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).
- 4) Реакция агглютинации (РА) с поливалентной бруцеллезной сывороткой (ПБС).
- 5) ПЦР.

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ

## **1. Бактериоскопический метод**

(микроскопия окрашенных препаратов):

- При **окраске по Граму** бруцеллы грамотрицательны (окрашиваются в красный цвет), 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 и капсул не образуют, жгутиков не имеют, неподвижны.
- Окрашивание препаратов **по способу Козловского** (0,5% водный раствор сафранина и 0,5% водным раствором малахитовой или бриллиантовой зелени). Бруцеллы сохраняют красную окраску сафранина, а остальные бактерии окрашиваются в зеленый цвет.



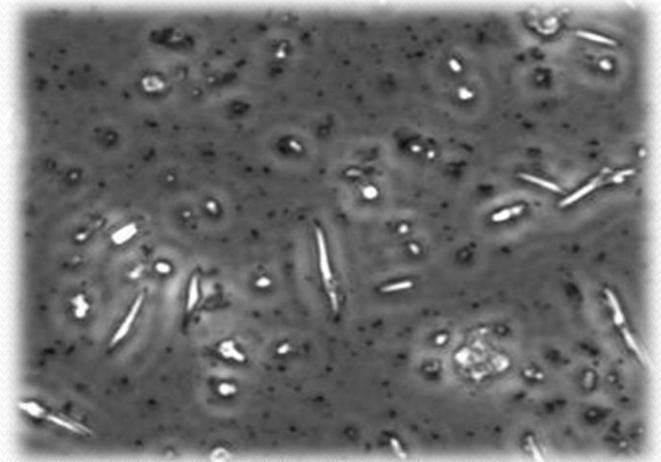
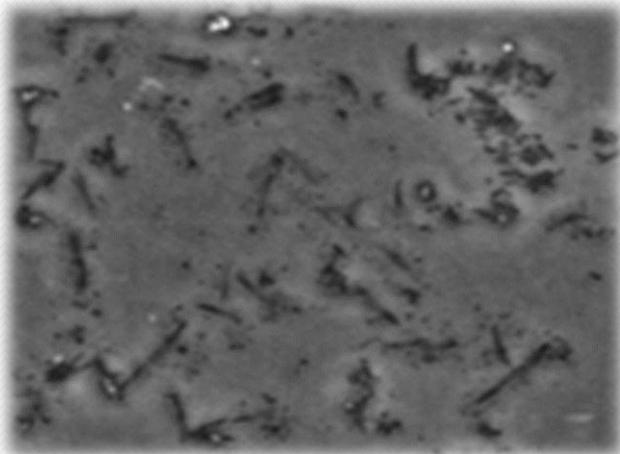
*Brucella spp.*  
(окраска по Граму)

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ

(продолжение)

## **1. Бактериоскопия L-форм бруцелл :**

- отбирают характерные колонии и из них готовят нативные препараты;
- просматривают в световом микроскопе в фазовом контрасте с иммерсией;
- L-формы бруцелл – полиморфные клетки в виде шаровидных, грушевидных и неправильной формы тел от 1 до 6 мкм с цитоплазмой разной оптической плотности с вакуолями и зернистостью.



# ИДЕНТИФИКАЦИЯ

(продолжение)

## 2. Морфология колоний.

- **Рост на плотных питательных средах –** колонии округлые, блестящие, гладкие, прозрачные, в проходящем свете с янтарным оттенком или слегка опалесцируют, имея голубоватый оттенок; выпуклые (холмиком), 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 – 0,5 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.).



Рисунок 1 – колонии *Brucella melitensis*.  
(глицериновый агар)



Рисунок 2 – колонии *Brucella melitensis*.  
(мясо-пептонный агар)

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ

(продолжение)

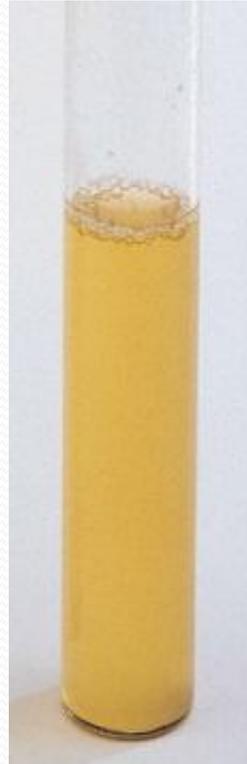
## **2. Морфология колоний.**

**Рост на жидких ПС** – равномерное помутнение среды.

- может выпадать небольшой осадок, легко исчезающий при встряхивании.
- кольцо пристеночного роста голубовато-сероватого цвета, возвышающееся над уровнем бульона по линии мениска (для «старых» бруцелл).

### **Рост L-колоний бруцелл:**

- изолированные или имеют вид нежного сплошного налета;
- золотистый цвет;
- слизистая консистенция;
- часто вырастают в агар;
- размер колоний от 2 до 3 мм;
- при просмотре через бинокулярную лупу имеют вид «яичницы» – плотный центр и ажурные светлые края.



Равномерное помутнение среды



Кольцо пристеночного роста

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ

## (продолжение)

- **3. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)**

- позволяет выявлять как живые, так и нежизнеспособные бактерии;
- позволяет обнаружить возбудителя бруцеллеза через 1 – 2 ч после начала исследования;
- чувствительность метода - не менее  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  м.к./мл;
- материал для исследования: фильтраты и центрифугаты проб воды, почвы и молока, патологический материал от людей и животных;
- использование на этапе идентификации выделенных культур бруцелл.

- **Учет результатов** (по интенсивности свечения):

- 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.

Специфическим считается свечение на 3 – 4 креста по периферии микробной клетки, центральная часть клетки при этом остается неокрашенной. В каждом поле зрения должны выявляться не менее 2 – 3 микробных клеток.

Положительный результат РИФ позволяет дать **предварительный** положительный ответ.

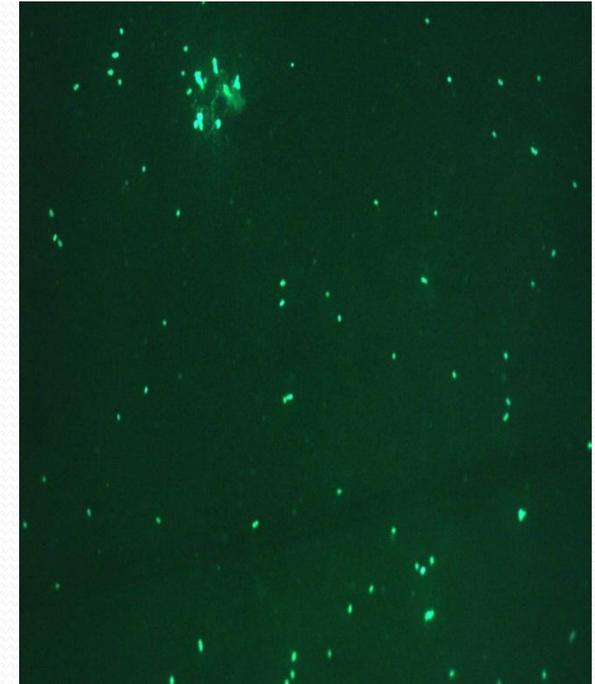


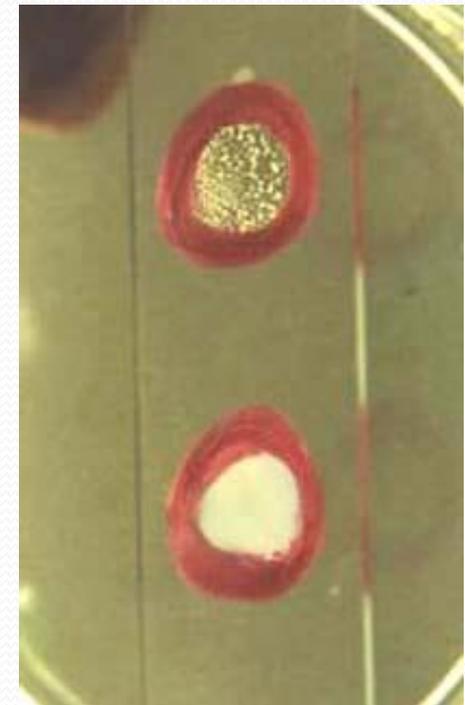
Рисунок 4 – *Brucella spp.*, РИФ

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ

## (продолжение)

### **4.Проба со специфической сывороткой** (бруцеллезная поливалентная сыворотка для РА)

- **Реакция агглютинации (РА) на стекле:** на предметное стекло наносят каплю специфической сыворотки (в разведении 1:25 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.
- Если культура в R-форме, то РА ставят с **R-агглютинирующей сывороткой.**
- Если культура в L-форме, то РА ставят со **специфической агглютинирующей поливалентной антисывороткой.**



# ИДЕНТИФИКАЦИЯ

## (продолжение)

### **5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

- Геном *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae* и *B. suis* биовара 1 - две кольцевые молекулы ДНК размером 2100 и 1500 т.п.н.
- *B. suis* биоваров 2 и 4 - две хромосомы размером 1850 т.п.н. и 1350 т.п.н.
- *B. suis* биовара 3 – одна хромосома размером 3100 т.п.н.
- Молекулярная масса ДНК равна  $2,37 \times 10^3$  Мда.
- Содержание ГЦ-пар 58–59 %.
- Для *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* гомология по аминокислотным последовательностям составляет более 99%.
- Подтверждена принадлежность к роду *Brucella* spp. на основании амплификации родоспецифичных генов *wboA* (ВМЕ10998)

### **Преимущества метода ПЦР:**

- возможность индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза в течение короткого промежутка времени (4–6 ч);
- специфичность - отсутствие перекрестных реакций с ДНК *E. coli*, *V. cholerae*, *F. tularensis*, *Y. enterocolitica* O9, *Y. pestis* EV, *S. typhimurium* и другими микроорганизмами;
- высокая чувствительность (позволяет выявить 100 – 1000 бактериальных клеток в пробе).

### **Материал для исследования:**

- биологический материал от животных (кровь, молоко, плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных, материал от абортированного плода, содержимое бурс и гигом, лимфатические узлы паренхиматозные органы, семенники);
- клинический материал (кровь, сыворотка крови, пунктат из лимфоузлов, синовиальная жидкость);
- объекты окружающей среды (вода, почва, смывы);
- пищевые продукты (молоко, сыр, брынза, кисломолочные продукты, не подвергавшиеся пастеризации).

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

(внутриродовое и внутривидовое типирование возбудителя)

После идентификации культуры бруцелл проверяют на диссоциацию.

- Тесты для определения **S-формы** *Brucella spp.*:

**1) Проба с раствором трипафлавина (на стекле).**

**2) Реакция термоагглютинации (проба с нагреванием).**

**3) Проба Уайт-Вильсона.**

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

(внутриродовое и внутривидовое типирование возбудителя)

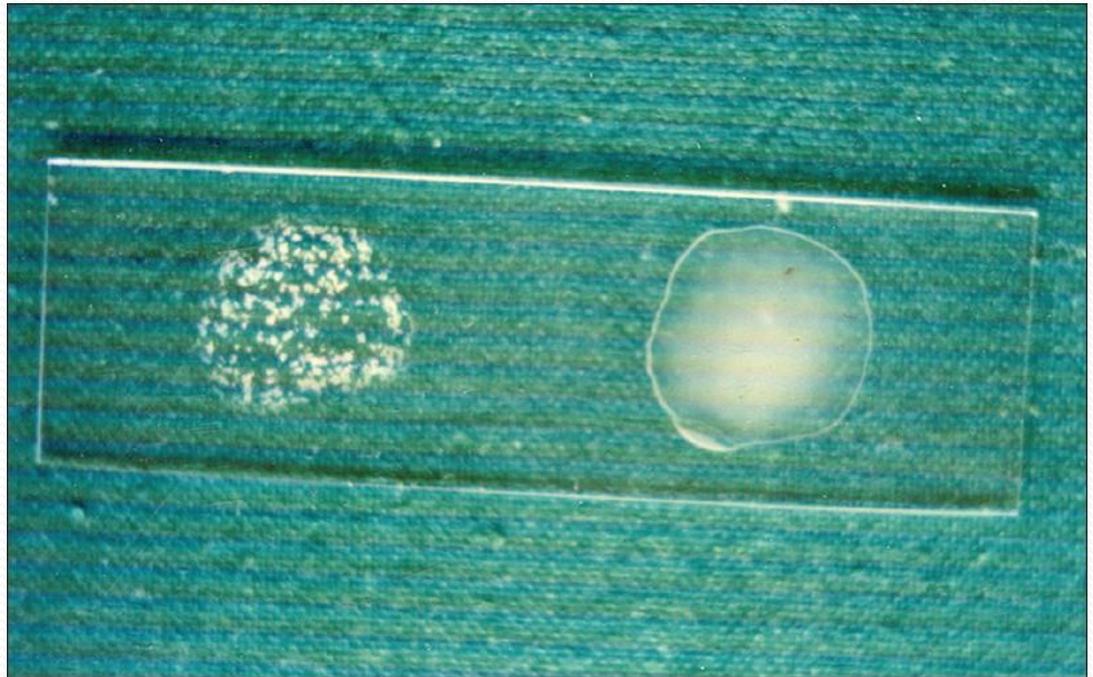
## Тесты для определения S-формы *Brucella spp.*:

1) Проба с раствором трипафлавина (на стекле):

капля солевого (0,85%)  
раствора трипафлавина 1:500  
+ испытуемая культура

Учет в течение 1-2 минут:

диссоциированная культура -  
агглютинация с образованием  
хорошо выраженных хлопьев;  
S-форма -- взвесь гомогенная.



Диссоциированная культура.

S-форма.

## Тесты для определения S-формы *Brucella spp.* (продолжение):

### 2) Реакция термоагглютинации (проба с нагреванием):

2–3 мл 0,9% NaCl +  
исследуемая культура ( $1 \times 10^9$  м.к./мл)

Подогреть в пробирке на водяной бане при  
температуре 90 °С в течение 30 мин и  
оставить при комнатной температуре.

Учет через 30, 60 мин и через 24 ч:

- диссоциированная культура --  
агглютинация с образованием  
хорошо выраженных хлопьев.
- S-форма -- взвесь гомогенная.



Диссоциированная  
культура



S-форма

## Тесты для определения S-формы *Brucella spp.* (продолжение):

### 3) Проба Уайт-Вильсона.

На агаровую пластинку производят посев взвеси исследуемой культуры в концентрации, позволяющей получить изолированные колонии (взвесь 100 м.к./мл) и инкубируют в течение 5 суток.

Кристаллический фиолетовый в разведении 1:2000 (водный раствор) наслаивают пастеровской пипеткой на агаровую пластинку и выдерживают в течение 5 мин, после чего краску отбирают при помощи пипетки.

Учет через 5 минут:

S-колонии неокрашенные;  
диссоциированные колонии окрашены от темно-фиолетового до светло-синего цвета.



# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

Дифференциация проводится параллельно с референтными штаммами (т.е. имеющими стандартные, сохраняющиеся длительное время, свойствами).

Референтные штаммы (1 биовар):

- *B. melitensis* 16М
- *B. abortus* 544
- *B. suis* 1330.
- Из референтных штаммов и гемокультуры готовят стандартную взвесь  $2 \times 10^9$  м.к./мл (ОСО 10 ед.) в объеме около 7-8 мл. Бактериальная петля должна быть в  $d=2$  мм.

## Критерии дифференциации:

- потребность культуры в повышенном содержании  $\text{CO}_2$ ;
- способность продуцировать сероводород  $\text{H}_2\text{S}$ ;
- изучение редуцирующей активности культур в отношении основных красителей: тионина и фуксина;
- РА с моноспецифическими сыворотками (*anti-abortionus* и *anti-melitensis*) и R-сыворотками;
- проба с бактериофагом.

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## **1. Потребность культуры в повышенном содержании $CO_2$** (определяют в период выделения культуры).

- Первые генерации *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* при выделении их от животных и человека легко получить в обычных аэробных условиях.
- Первые генерации культур *B. abortus* и *B. ovis* способны расти только при наличии в атмосфере повышенного содержания углекислоты (5 – 10%), при последующих посевах *B. abortus* растут в нормальной атмосфере.
- Биовары *B. abortus* 5, 6 и 9 могут расти в обычных аэробных условиях.

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## **2. Дифференциация по образованию сероводорода $H_2S$ .**

- Реактив – тест-полоски с водным раствором уксусно-кислого свинца.
- Взвесь культуры в физиологическом растворе ( $2 \times 10^9$  м.к./мл) засевают стандартной петлей (2 мм) на скошенную поверхность агар.
- Инкубация при 37 °С.
- Почернение бумажки измеряется в мм.
- Результаты учитываются через 2 дня в течение 6 дней.
- *При каждом учете* потемневшую бумажку заменяют новой. Для окончательной оценки способности культуры к образованию сероводорода все три показателя суммируют.
- Показателем интенсивности образования сероводорода является почернение нижнего, свисающего над посевом конца бумажки.



## 2. Дифференциация по образованию сероводорода H<sub>2</sub>S (продолжение)

### Показатель образования сероводорода:

*B. suis* (биовар 1) – 12 – 20 мм,

*B. abortus* (биовар 1) – около 5 – 7 мм,

*B. melitensis* (биовар 1) – совсем не образует сероводорода или вызывает только легкое побурение свинцовой бумажки,

*B. neotomae* в среднем равен 5 – 8 мм,

*B. ovis* и *B. canis* сероводорода не образуют.



*B. suis*

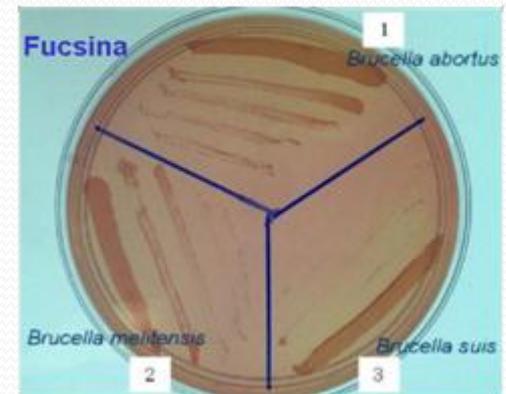
*B. abortus*

*B. melitensis*

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## **3. Изучение редуцирующей активности культур в отношении основных красителей: тионина и фуксина (способность разрушать красители).**

- Используют плотные ПС, в которые добавляют красители – тионин (синий) с конечной концентрацией 1:50000 и основной фуксин (малиновый) с концентрацией 1:50000.
- Среды с красками должны храниться в холодильнике (+4 °С) и пригодны для работы в течение 10 – 15 дней. Обесцвеченные среды применять нельзя.
- **Посев:** чашку делят на сектора в зависимости от количества культур. Посев осуществляют из той же взвеси, что и приготовили в начале ( $2 \times 10^9$  м.к./мл). Посев проводят на 2 чашки: одна – с фуксином и одна – с тионином. 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 (+).



# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## 4. Реакция агглютинации (РА) с моноспецифическими сыворотками (*anti-abortus* и *anti-melitensis*) и R-сыворотками.

- Ставится объемным методом.
- Сыворотка разводится 1:10. В качестве антигена берут взвесь  $2 \times 10^9$  м.к./мл.
- РА ставится в 5-ти пробирках и контроль:

Пробирка	1	2	3	4	5	Контроль АГ <i>B. melitensis</i> 16М	Контроль АГ <i>B. abortus</i> 544
Сыворотка 0,5 мл	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:10	1:10
Исследуемый АГ 0,5 мл	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:20	1:20

На каждую исследуемую культуру ставят два ряда для контроля *anti-abortus* и *anti-melitensis*.

Инкубируют при  $T-37^{\circ}C$  в течение 18 – 20 часов. Затем в течение 2 часов выдерживают при комнатной  $T$ .

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## 4. Реакция агглютинации (РА) с моноспецифическими сыворотками (*anti-abortus* и *anti-melitensis*) и R-сыворотками.

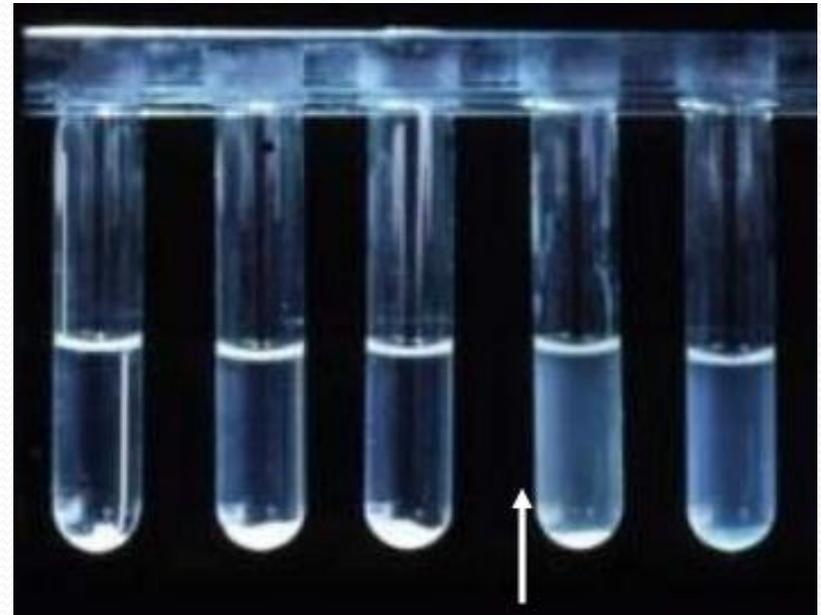
### Учет РА.

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.



1:20

1:40

1:80

1:160

1:320

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## 5. Проба с бактериофагом

### Бруцеллезные бактериофаги

- С 1925 г. – поиски бруцеллезного фага велись E.S. Sanderson.
- 1933 г. – J.K. Lin впервые было доказано существование бруцеллезных бактериофагов (в испражнениях людей, больных бруцеллезом).
- В Советском Союзе бактериофагия у бруцелл была открыта Ф.Е. Сергиенко с соавт. (1940), М.С. Дрожевкиной (1950) (выделен из музейных и свежесвыделенных культур бруцелл, из крови больных бруцеллезом людей и из абортированных плодов сельскохозяйственных животных).
- Для идентификации культур бруцелл бактериофаг впервые введен в практику M.J. Pikket, L. Nelson (1950).
- М.З. Попхадзе и Г.Д. Абашидзе (1955), А.С. Фомичева с соавт. (1956), М.С. Дрожевкина (1957) провели широкие исследования выделенных ими бруцеллезных бактериофагов.
- Эти эксперименты были продолжены Л.В. Ляпустиной с соавт. (1995, 1999, 2004).



# Бруцеллезные бактериофаги

- В **1955** году М.З. Попхадзе и Т.Г. Абашидзе выделили бруцеллезный бактериофаг, проявляющий специфическое литическое действие в отношении культур *B. abortus*. Этот фаг получил название **Тбилиси (Тб)** и признан **эталонным бруцеллезным бактериофагом**.
- В **1969** г. К. Glowinsca из штамма *B. suis* выделила бактериофаг **Weybridge (Wb)**.
- В **1975** г. М. Corbel и Е. Thomas бактериофаг **Firenze (Fi)**.
- В это же время J. Douglas сообщил об изоляции бактериофага **Berkley (Bk)**.
- Получен **R-фаг**, лизирующий измененные варианты бруцелл вида *abortus*.
- В **1982** году изолировали фаги **Izathagar (Iz)**.
- С. Rigby сообщил об изоляции бактериофага **Nepsan (Np)**, который по своим свойствам подобен фагу Тб.
- В соответствии с рекомендациями объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу [1986] в числе комплексных тестов дифференциации выделенных штаммов возбудителя бруцеллеза применяется определение чувствительности изолятов к литическому действию бруцеллезных диагностических бактериофагов **Тб (Тбилиси), Fi (Firenze), Wb (Weybridge), Bk2 (Berkley), R-фага**.



# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## *5. Проба с бактериофагом.*

- Посев исследуемой культуры и референтных штаммов.
- Если используют 4 бактериофага, то делают посев всех 3-х референтных штаммов (*B. melitensis* 16М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330).
- Если ставят с одним бактериофагом Тб, то для контроля используют только *B. abortus* 544.
- Методы нанесения бактериофага:
  - метод дорожки: на подсохший газон у края чашки пастеровской или обычной пипеткой наносят каплю бактериофага в ДТР (диагностический титр разведения) и поворачивают чашку, чтобы капля стекла.  
Если несколько исследуемых культур, то культуры засевают полосками петлей (на одну чашку 5 – 7 культур) и также делают дорожку из бактериофага.
  - посев газоном: на чашку засевают 0,15 мл взвеси одной культуры и распределяют шпателем по агаровой пластине, дают подсохнуть в течение 30 мин. Затем наносят капли бактериофага.
- Инкубируют при T-37° C в течение 36 ч (24 – 48 часов).

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## 5. Проба с бактериофагом.

### Учет:

Четкая дорожка (полный лизис культуры на месте нанесения фага) – лизис на 4+.

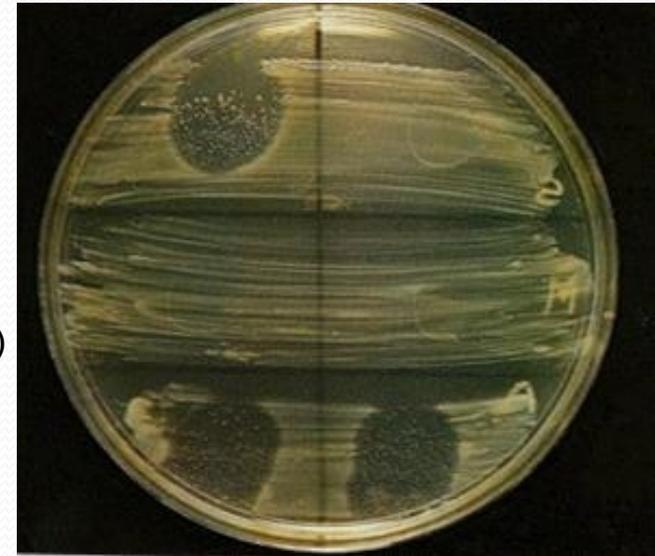
Лизис с небольшим количеством отдельных колоний бруцелл или слившиеся бляшки в виде сот – лизис 3+.

Резко ослабленный рост (количество негативных колоний больше 20) и небольшое количество бляшек – лизис 2+.

Очень слабый лизис (количество негативных колоний менее 20) – лизис 1+.

Отсутствие лизиса – результат отрицательный.

Специфическим считается лизис на 2+ и более на месте нанесения капли бактериофага.



## Литическая активность бруцеллезных бактериофагов в отношении штаммов бруцелл различных видов

Вид возбудителя	Чувствительность к бруцеллезным бактериофагам в ДТР			
	Тб (Тбилиси)	Wb (Weybridge)	Fi (Firenze)	Bk2 (Berkley)
<i>B. melitensis</i>	–	–	–	+
<i>B. abortus</i>	+	+	+	+
<i>B. suis</i>	–	+	+	±

# ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

## **Определение генотипа выделенных штаммов методом MLVA:**

- мультилокусное VNTR-типирование с использованием известных переменных локусов бруцелл.
- Используют для дифференциации и установления генетического родства изучаемых изолятов.
- В настоящее время в геноме бруцеллезного микроба описаны более 100 локусов. Для практического использования предложено 15 локусов, среди которых 8 маркеров с хорошей возможностью к видовой идентификации и 7 – с большей дискриминационной способностью.
- Использование MLVA дает возможность типировать изоляты бруцелл до уровня штаммовых различий и систематизировать штаммы бруцелл в соответствии с существующим таксономическим положением видов и биоваров возбудителя.

# Дифференциальные свойства видов и биоваров бактерий рода *Brucella*

Виды бруцелл	Био-вар	Референ-тные штаммы	Потреб-ность в CO <sub>2</sub>	Продук-ция H <sub>2</sub> S	Рост на средах, содержащих		Агглютинация моноспецифич ескими сыворотками			Лизис фагами в ДРТ				Основные хозяева
					Т	Ф	А	М	Р	Тб	Wb	Fi	Bk2	
<b>B. melitensis</b>	1	16-M	-	-	+	+	-	+	-	-	(-)	-	+	Овцы, козы
	2	63/9	-	-	+	+	+	-	-	-	(-)	-	+	
	3	Ether	-	-	+	+	+	+	-	-	(-)	-	+	
<b>B. abortus</b>	1	544	(+)	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	Крупный рогатый скот
	2	86/8/59	(+)	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	
	3	Tulya	(+)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
	4	292	(+)	+	-	(+)	-	+	-	+	+	+	+	
	5	B-3196	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	
	6	870	-	(+)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
<b>B. suis</b>	1	1330	-	+	+	(-)	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи
	2	Thomsen	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи, зайцы
	3	686	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи
	4	40	-	-	+	(-)	+	+	-	-	+	+	±	Северные олени
	5	513	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	±	Мышевидные грызуны
<b>B. neotomae</b>		5K33	-	+	-	-	+	-	-	±	+	+	+	Кустарниковые крысы
<b>B. ovis</b>		63/290	-	-	+	(-)	-	-	+	-	-	-	-	Овцы
<b>B. canis</b>		RM 6/66	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Собаки
<b>B. pinnipedialis</b>			+	-	+	+	+	±	-	-	+	+	+	Ластоногие
<b>B. ceti</b>			-	-	+	+	+	±	-	-	+	+	+	Китообразные
<b>B. microti</b>			-	-	+	+	-	+	-	-	+			Серая полевка
<b>B. inopinata</b>			-	+	+	+	-	+	-					Не установлен

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

- Наиболее достоверные методы обнаружения возбудителя бруцеллеза в объектах внешней среды, пищевых продуктах, патологическом материале:
  - 1) бактериологический,
  - 2) биологический.
- Для быстрого обнаружения возбудителя бруцеллеза в первичных посевах, пищевых продуктах, воде и патологическом материале рекомендуются следующие методы:
  - 1) микроскопия препаратов (по Граму или Козловскому),
  - 2) реакция иммунофлюоресценции (РИФ),
  - 3) реакция нейтрализации антител (РНАт),
  - 4) иммуноферментный анализ (ИФА),
  - 5) полимеразная цепная реакция (ПЦР).

## Индикация бруцелл в объектах внешней среды, пищевых продуктах и патологическом материале (продолжение)

- **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 и просматривают в световом микроскопе.
- **Реакция иммунофлюоресценции (РИФ), прямой метод** – позволяет обнаружить возбудителя бруцеллеза через 1 – 2 ч после начала исследования.
  - 1) Используется при исследовании фильтратов и центрифугатов проб воды, почвы и молока, патологического материала от людей и животных, а также на этапе идентификации выделенных культур бруцелл.
  - 2) Положительный результат РИФ позволяет дать **предварительный** положительный ответ.

# Индикация бруцелл в объектах внешней среды, пищевых продуктах и патологическом материале (продолжение)

## *Реакция нейтрализации антител (РНАт) – 3 – 4 часа*

- Используют макро- и микрометод.
- 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.
- Результат учитывают после инкубации планшет при температуре 18 – 20 °С в течение 2 ч.

# Индикация бруцелл в объектах внешней среды, пищевых продуктах и патологическом материале (продолжение)

## *Иммуноферментный анализ (ИФА) – 4 – 5 часов*

- Метод используется для выявления **бруцеллезного антигена** в объектах внешней среды, пищевых продуктах и биологических объектах, а также для идентификации выделенных культур бруцелл.
- Высокая чувствительность (концентрация  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^4$  м.к./мл или 1–5 нг/мл бруцеллезного растворимого антигена), специфичность, возможность количественной и автоматизированной оценки результатов, воспроизводимость и стандартность основных ингредиентов анализа.
- Используют иммуноферментную тест-систему для определения **бруцеллезного антигена**.
- ИФА: происходит 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).

# Индикация бруцелл в объектах внешней среды, пищевых продуктах и патологическом материале (продолжение)

## ***Полимеразная цепная реакция (ПЦР)***

- Преимуществом метода ПЦР (по сравнению с бактериологическим) является возможность индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза в течение короткого промежутка времени (4 – 6 ч).
- Отсутствие перекрестных реакций с ДНК *E. coli*, *V. cholerae*, *F. tularensis*, *Y. enterocolitica* O9, *Y. pestis* EV, *S. typhimurium* и другими микроорганизмами обуславливает его специфичность.
- При тестировании материала от животных ПЦР обладает преимуществом по диагностической чувствительности (позволяет выявить 100 – 1000 бактериальных клеток в пробе).
- Позволяет осуществлять выявление возбудителя бруцеллеза в биологическом материале:
  - 1) от животных (кровь, молоко, плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных, материал от абортированного плода, содержимое бурс и гигром, лимфатические узлы паренхиматозные органы, семенники),
  - 2) в пробах клинического материала (кровь, сыворотка крови, пунктат из лимфоузлов, синовиальная жидкость),
  - 3) в объектах окружающей среды (вода, почва, смывы),
  - 4) в пищевых продуктах (молоко, сыр, брынза, кисломолочные продукты, не подвергавшиеся пастеризации).

## Сравнительные данные по чувствительности методов индикации бруцелл

Метод исследования	Чувствительность метода	Сроки получения результата, ч
РИФ	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл	1–2
РНАт	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл	3–4
ИФА	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ м.к./мл или 1–5 нг/мл растворимого антигена	4–5
ПЦР	$1 \times 10^3$ м.к./мл	4–6

# ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА

Методы:

- 1) Выявление возбудителя бруцеллеза:
  - бактериоскопический метод,
  - реакция иммунофлуоресценции (РИФ).
- 2) выявление бруцеллезного антигена:
  - реакция нейтрализации антител (РНАт),
  - иммуноферментный анализ (ИФА),
  - ПЦР.
- 3) выявление бруцеллезных антител:
  - реакция агглютинации,
  - РСК,
  - кольцевая проба.

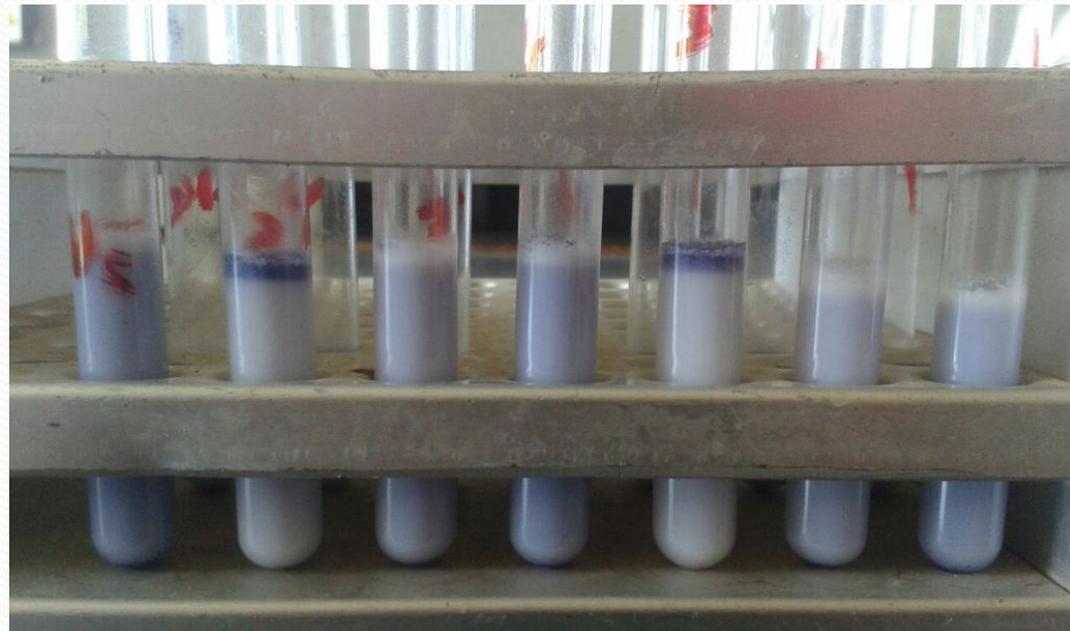
# ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА

- ***Реакция агглютинации*** применяется для исследования молока и молочных продуктов.
- В качестве антигена используют единый антиген.
- Реакция специфична и чувствительна.
- Сыворотку молока можно исследовать в реакции агглютинации (РА) в пробирках (объемная) и на стекле (пластинчатая).
- В объемной РА учитывают положительный результат в разведении сыворотки 1:10.

# ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА

## *Кольцевая проба с окрашенным антигеном*

- Сущность кольцевой реакции – при наличии в молоке специфических агглютининов происходит агглютинация цветного антигена и агглютинат адсорбируется со сливками молока.
- При стоянии в термостате жир молока вследствие меньшего удельного веса поднимается кверху и увлекает за собой адсорбированный агглютинат, который и образует цветное кольцо.
- При отрицательной реакции цветного кольца не образуется, а все молоко остается окрашенным в цвет антигена.
- Кольцевую реакцию с молоком применяют с целью определения благополучия стад (ферм) по бруцеллезу крупного рогатого скота (буйволов) и для проверки молока при продаже его на рынках («Наставление по диагностике бруцеллеза животных» (утв. Минсельхозом РФ 29.09.2003 № 13-5-02/0850)).



# Комплексная серо-аллергическая диагностика бруцеллеза у больных людей

- пластинчатая реакция агглютинации (Хеддльсона);
- объемная реакция агглютинации (Райта);
- антиглобулиновая проба (реакция Кумбса);
- РПГА;
- ИФА (на выявление **бруцеллезных антител** в сыворотке крови);
- внутрикожная проба со специфическим бруцеллезным аллергеном (бруцеллином) – проба Бюрне;
- реакция лизиса лейкоцитов (РЛЛ);
- *In vitro* аллергодиагностика методом проточной цитофлуориметрии.

# Пластинчатая реакция агглютинации (реакция Хеддльсона)

## Преимущества:

простота постановки реакции,  
быстрое получение результатов,  
чувствительность реакции.

**Антиген** – единый бруцеллезный диагностикум.

**Положительная реакция** – хлопья (агглютинат).  
Максимальный срок наблюдения 8 минут.

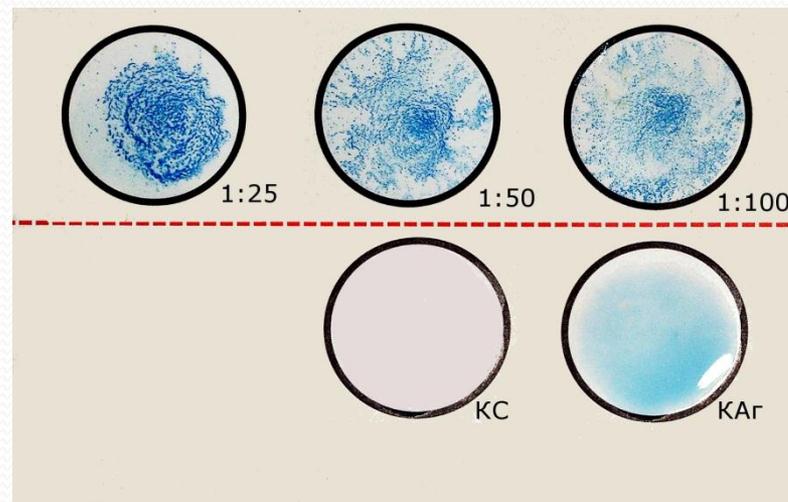
## Учет реакции:

- 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".

	1	2	3	КС	КАг
ИС	0,04 мл	0,02 мл	0,01 мл	0,03 мл	--
Аг	0,03 мл	0,03 мл	0,03 мл	--	0,03 мл
ФР	--	--	--	0,03 мл	0,03 мл



## Реакция агглютинации в пробирках (реакция Райта)

Антиген – единый бруцеллезный диагностикум.

	1	2	3	4	5	6	КС	КАг
ИС (по 0,5 мл)	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800 и т.д.	1:25	--
ФР, мл	--	--	--	--	--	--	0,5	0,5
Аг, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5
Итоговое разведение ИС	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600 и т.д.	1:50	--

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

# Реакция агглютинации в пробирках (реакция Райта)

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.

- **Реакция Кумбса (антиглобулиновая проба)** используется при хроническом бруцеллезе, выявляет неполные антитела.
- При постановке реакции Кумбса используют предварительно оттитрованную антиглобулиновую сыворотку против глобулинов человека (например – антиглобулиновая сыворотка для иммуноэлектрофореза против глобулинов человека).
- Антиглобулиновые сыворотки получают путем иммунизации кроликов сывороткой того вида животных, кровь которых подлежит исследованию. Для получения сыворотки против человеческого глобулина кролики иммунизируются цельной человеческой сывороткой крови группы I (0) (два цикла по 4-5 внутривенных инъекций 0,5 мл неразведенной сыворотки).
- Диагностический титр 1:50 (агглютинация не менее чем на 2+).

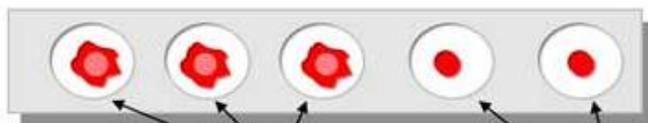
# Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)

- 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.
- **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.

# Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)

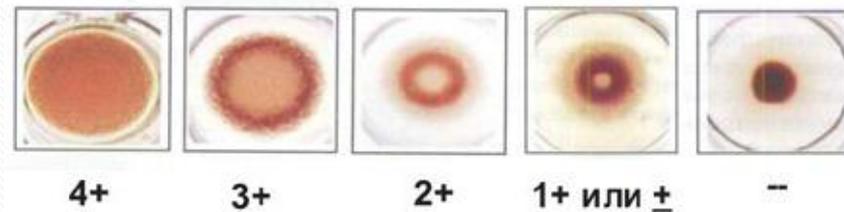
- **Оценка реакции проводится по следующей схеме:**
- 4+ - эритроциты покрывают все дно лунки равномерным слоем, иногда наблюдается зонтик.
- 3+ - эритроциты выстилают все дно лунки тонким равномерным слоем, но площадь его меньше, чем при 4-крестовой реакции, размеры зонтика также меньше.
- 2+ - агглютинат 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.

## Результат РПГА (РПГА)



Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)



4+

3+

2+

1+ или ±

--

# Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод используют для:

- 1) диагностики всех форм заболевания,
- 2) при эпидемиологическом обследовании населения,
- 3) при отборе лиц для вакцинации против бруцеллезной инфекции.

- Для постановки ИФА используют диагностическую тест-систему, иммуноферментную **для определения бруцеллезных антител**.
- Диагностическим титром в ИФА считается разведение сыворотки более чем 1:400.

# Проба Бюрне (кожно-аллергическая проба с бруцеллином)

- Внутрикожная аллергическая проба основана на способности организма, сенсibilизированного бруцеллезным антигеном, специфически отвечать местной реакцией (отек, болезненность) на внутрикожное введение бруцеллезного аллергена.
- Бруцеллезный аллерген вводится **строго внутрикожно!!!**
- 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 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.

# Проба Бюрне

## *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;
- отрицательный результат – гиперемия кожи при отсутствии отека или отсутствие каких-либо проявлений.



## Реакция лизиса лейкоцитов (РЛЛ) -

- выявление гиперчувствительности замедленного типа методом *in vitro*.
- РЛЛ основана на учете разрушения лейкоцитов сенсibilизированного организма под влиянием специфического антигена, регистрируемого методом *in vitro*.
- РЛЛ обладает строгой специфичностью, дает возможность количественного учета степени сенсibilизации организма, позволяет получить ответ через 3 - 4 часа после взятия крови.
- 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.

# *In vitro* аллергодиагностика методом проточной цитофлуориметрии

- Определение аллергической перестройки организма проводят в условиях *in vitro*, в качестве антигена используют аллерген бруцеллезный жидкий – бруцеллин.
- Принцип метода

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

# ***In vitro* аллергодиагностика методом проточной цитофлуориметрии**

- **Учет результатов**

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

- **Оценка результатов:**

- от 0 до 5% – отрицательная реакция;
- > 5% – положительная реакция.

- **Преимущества данного метода:**

- исключение дополнительной сенсibilизации организма при введении бруцеллезного аллергена,
- исключение ложноположительных и ложноотрицательных реакций,
- быстрое получение ответа.

## Сроки появления положительных серологических и аллергических реакций у больных бруцеллезом в ходе развития инфекционного процесса

Реакции	Сроки исследования, сут.					
	10	30	60	120	180	360
Реакция Хеддльсона	+	+	+	+	+	+
Реакция Райта	—	+	+	±	—	—
РНГА	±	+	+	+	+	+
Проба Бюрне	—	+	+	+	+	+

Примечания:

1. «+» – реакция положительная; «—» – реакция отрицательная; «±» – реакция сомнительная.

2. При обострении инфекционного процесса, а также при суперинфекции утраченная серологическая реакция может восстановиться.

# Схема диагностики бруцеллеза

	РХ	РР	РНГА	ИФА	РК	Проба Бюрне
Острый и подострый бруцеллез	+	+	+	+	+ при «отр.» предыдущей реакции	
Перед вакцинацией	+	+		+	+	+
Эпидобследование	+	+	+	+	+ при «отр.» предыдущей реакции	+
Хронический бруцеллез					+	+

# Основные лабораторные признаки различных клинических форм бруцеллеза

Лабораторный признак	Формы бруцеллеза			
	Острый (до 3 мес.)	Подострый (до 6 мес.)	Хронический (свыше 6 мес.)	Резидуальный (свыше 2-3 лет)
Обнаружение возбудителя в крови	Довольно часто	Часто	Очень редко, чаще при реинфекции	Не обнаруживается
Реакция агглютинации Райта (РР)	Высокие титры часто с нарастанием в динамике (1:200 – 1:640) и выше	Высокие титры часто с нарастанием в динамике (1:200 – 1:6400)	Диагностические титры без нарастания в динамике (1:200 – 1:800)	Низкие титры (1:50 – 1:100), иногда антитела не выявляются
РНГА	Высокие титры с нарастанием в динамике (1:400 – 1:12800) и выше	Высокие титры часто с нарастанием в динамике (1:200 – 1:6400)	Иногда диагностические титры (1:200 – 1:800)	антитела не выявляются, иногда низкие титры (1:50 – 1:100)
Реакция Хеддльсона	Резко положительная	Резко положительная	положительная	иногда положительная
ИФА*	1:25600	1:10000	1:5120	
Кожно-аллергическая проба Бюрне	Положительная у 40% больных	Положительная у 60% больных	Положительная у 90% больных	Положительная у 40% больных
ПЦР*	96,3±3,7 %	100 %	95,9±1,6 %	не выявляется

\* по данным д.м.н. М.М. Желудкова (2009)

# Порядок исследования клинического материала

## I этап

- прием, сортировка, регистрация и кодирование проб;
- первичная обработка проб и подготовка их к исследованию;
- ПЦР с пробами из нативного материала;
- постановка РНАт, ИФА для выявления специфических антигенов;
- постановка реакций агглютинации Хеддльсона и Райта, реакции Кумбса, РНГА, ИФА для выявления специфических антител в крови (сыворотке крови) больного;
- пересев клинического материала с питательной среды жидкой для транспортировки материала и накопления бруцелл на плотные и жидкие питательные среды;
- инкубация бифазной среды с посевом клинического материала при 37 °С до 20–30 сут.;
- заражение биопробных животных (морские свинки, белые мыши) подкожно в паховую область или внутрибрюшинно – при исследовании крови, спинномозговой жидкости, костного мозга.

# Порядок исследования клинического материала

## II этап

- **8 минут** от начала исследования – учет результатов реакции Хеддльсона.
- **2-6 ч** от начала исследования – учет результатов ИФА, РНГА, РНАт.
- **8-10 ч** от начала исследования – учет результатов ПЦР.
- **18-20 ч** от начала исследования – учет результатов реакции агглютинации Райта;
- **48 ч** от начала исследования:
  - учет результатов реакции Кумбса;
  - выдача **предварительного положительного ответа** на основании положительного результата ПЦР, положительных иммуносерологических реакций (РА, РК, РХ, РНГА, ИФА, РНАт).

# Порядок исследования клинического материала

## III этап

- **3-21 сут.** от начала исследования:
  - учёт результатов роста на бифазной среде, плотных и жидких питательных средах;
  - при наличии роста культуры (или единичных колоний) на питательных средах производят отбор колоний сходных по морфологии с колониями возбудителя бруцеллеза;
  - приготовление и микроскопия мазков в окраске по Граму из подозрительных колоний;
  - отсев отобранных изолированных колоний на плотные питательные среды для получения чистой культуры;
  - с материалом из подозрительных колоний (ПЦР, МФА);
  - постановка реакции слайд-агглютинации отобранных изолированных колоний с сывороткой бруцеллезной диагностической поливалентной для РА;
  - **подтверждение** предварительного ответа на основании наличия характерного роста на плотных питательных средах, наличия в мазках из колоний мелких грамотрицательных кокковидных палочек, положительной реакции слайд-агглютинации, положительных результатов ПЦР и МФА с материалом из подозрительных колоний.

# Порядок исследования клинического материала

## IV этап

- **5-30 дней** от начала исследования:
  - пересев чистых культур на скошенный агар для хранения и последующей работы с ней;
  - определение степени диссоциации выделенных культур;
  - постановка с культурами возбудителя бруцеллеза, находящимися в стабильной S-форме, тестов межвидовой дифференциации:
    - отношение к избыточному содержанию углекислоты в воздухе;
    - способность к образованию сероводорода;
    - редуцирующая активность в отношении красителей (тионин, основной фуксин);
    - агглютинация моноспецифическими бруцеллезными сыворотками (*anti-abortus*, *anti-melitensis*);
    - чувствительность к бруцеллезному бактериофагу Тб;
  - определение чувствительности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом;

## IV этап (продолжение)

- вскрытие биопробных животных, посев органов и крови на плотные питательные среды:
  - белых мышей через 20–25сут., посев на питательные среды патологического материала: лимфатические узлы (паховый, аксельлярный, парааортальный, подчелюстной), кусочки органов (селезенка);
  - морских свинок через 30–35 сут., посев на питательные среды патологического материала: лимфатические узлы (регионарные в месте введения исследуемого материала, паховый, подчелюстной, шейный, парааортальный), кусочки органов (селезенка, печень, костный мозг), кровь;
  - приготовление мазков-отпечатков из органов биопробных животных, постановка МФА;
  - постановка ПЦР (суспензия из гомогената органов, лимфатических узлов, костный мозг, сыворотка крови);
  - постановка слайд-агглютинации и реакций агглютинации Хеддльсона и Райта;
  - учет результатов МФА, ПЦР, РА и слайд-агглютинации.

# Порядок исследования клинического материала

## V этап

- **10-40 сут.** от начала исследования:
  - учет результатов дифференциации культур для определения вида и биовара возбудителя бруцеллеза;
  - учет посевов материала от биопробных животных;
  - выдача **окончательного положительного ответа** по результатам бактериологического исследования на основании выделения чистой культуры бруцелл из посевов нативного материала или от биопробных животных, или по результатам иммуно-серологического и молекулярно-генетического исследований на основании положительных результатов иммуно-серологических индикационных тестов.
- **36-60 сут.** от начала исследования:

Завершение исследования и выдача **окончательного отрицательного ответа** проводятся на основании отсутствия специфического роста на питательных средах, отрицательных результатов ПЦР и иммуно-серологических реакций на всех этапах исследования, отсутствия специфического роста в посевах от биопробных животных.

№ п/п	Наименование препарата	Техническая документация	Производитель
1	Аллерген бруцеллезный жидкий (Бруцеллин), раствор для внутрикожного введения	ФСП 42-0504-7375-06 РУ № ЛС-002 624 до 29.12.11 г.	Филиал ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ «Омское предприятие по производству бакпрепаратов» г.Омск, пр. Мира, д.7 Тел: (3812) 65-35-70, 65-15-33 Факс: (3812) 65-35-70 E-mail: <a href="mailto:bakprep@omskcity.com">bakprep@omskcity.com</a>
2	Бруцелла тест для выявления антител против бруцелл с помощью реакции агглютинации (Райта) и реакции агглютинации (Хеддельсона)	ФСП 42-0180-4778-03 РУ № 003 617/01	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ (филиал «Медгамал») г. Москва, ул. Гамалеи, 18 Тел.: (499)193-30-50; 190-44-59 Факс: (499)190-66-71 Веб-сайт: <a href="http://www.medgamal.ru">www.medgamal.ru</a>
3	Диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации, суспензия для диагностических целей	ФСП 42-01804778-03 РУ № 003 617/01  ФСП 42-0397-5668-04 ТУ 9388-001-01 897 080-2007 РУ № ФСР 2008/03141	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ (филиал «Медгамал») г. Москва, ул. Гамалеи, 18 Тел.: (499)193-30-50; 190-44-59 Факс: (499)190-66-71 Веб-сайт: <a href="http://www.medgamal.ru">www.medgamal.ru</a>  ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15 Тел./факс: (8652) 26-40-39 E-mail: <a href="mailto:snipchi@mail.stv.ru">snipchi@mail.stv.ru</a> Веб-сайт: <a href="http://www.stavnipchi.ru">www.stavnipchi.ru</a>

№ п/п	Наименование препарата	Техническая документация	Производитель
4	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие, лиофилизат для диагностических целей	ФСП 42-0180-5315-04 РУ № ЛС-000 252	ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ (филиал «Медгамал») г. Москва, ул. Гамалеи, 18 Тел.: (499)193-30-50; 190-44-59 Факс: (499)190-66-71 Веб-сайт: <a href="http://www.medgamal.ru">www.medgamal.ru</a>
5	Набор реагентов. Бактериофаги диагностические бруцеллезные жидкие (Тб, Wb, Bk, Fi)	ТУ 9386-001-01897080-2008 РУ № ФСР 2009/05200	
6	Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в иммуноферментном анализе (ИФА) («ИФА- Бру-СтавНИПЧИ»)	ТУ 9388-011-01897080-2010 РУ ФСР 2010/06745 от 26.12.2012 г. Сертификат соответствия № РОСС RU.ИМ22.Н02164 от 29.11.2013 г.	ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15 Тел./факс: (8652) 26-40-39 E-mail: <a href="mailto:snipchi@mail.stv.ru">snipchi@mail.stv.ru</a> Веб-сайт: <a href="http://www.stavnipchi.ru">www.stavnipchi.ru</a>
7	Набор реагентов тест-система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю бруцеллеза («ИФА-Бру-Аг-СтавНИПЧИ»)	ТУ 9388-031-01897080-2012 РУ РЗН 2013/428 от 05.04.2013 г. Сертификат соответствия № РОСС RU.ИМ22.Н02158 от 22.11.2013 г.	

№ п/п	Наименование препарата	Техническая документация	Производитель
8	Тест-система для выявления ДНК <i>Brucella spp.</i> методом полимеразной цепной реакции (Ген-Бру)	ТУ 8895-008-01898109-2007 РУ № ФСР 2007/0099	ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» г. Саратов, ул. Университетская, д.46 Тел.: (8452) 26-21-31 Факс: (8452) 51-52-12 E-mail: <a href="mailto:microbe@san.ru">microbe@san.ru</a> Веб-сайт: <a href="http://www.microbe.ru">www.microbe.ru</a>
9	«Набор реагентов для выявления ДНК бактерий <i>Brucella spp.</i> в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс <i>Brucella spp.</i> -FL"	ФСР 2009/04212	ФГУН « ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а Тел.: (495) 105-05-43 E-mail: <a href="mailto:info@interlabservice.ru">info@interlabservice.ru</a> Веб-сайт: <a href="http://www.interlabservice.ru">www.interlabservice.ru</a>
10	ПЦР-тест-система для выявления ДНК <i>Brucella melitensis</i> «Bru»	ТУ 9398-001-73 867 468-2005 РУ № ФС 012а-2005/3203-06	ООО «Лаборатория Изоген», г. Москва
11	Питательная среда жидкая для транспортировки биоматериала и накопления бруцелл	ПУР № 01897080-16-11 ТУ 9385-025-01897080-2011 Регистрационное удостоверение № РНЗ 2013/1153 Дата выдачи 09.09.2013 г.	ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15 Тел./факс: (8652) 26-40-39 E-mail: <a href="mailto:snipchi@mail.stv.ru">snipchi@mail.stv.ru</a> Веб-сайт: <a href="http://www.stavnipchi.ru">www.stavnipchi.ru</a>

№ п/п	Наименование препарата	Техническая документация	Производитель
12	Питательная среда для выделения и культивирования бруцелл (эритрит-агар), порошок для микробиологических целей	94/161/241 ФСП 42-0504-7788-06	Филиал ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Махачкала НПО «Питательные среды», г. Махачкала
13	Питательная среда для накопления бруцелл (эритрит-бульон), порошок для микро-биологических целей	98/367/3 ФСП 42-0504-7786-06	115114, г. Москва, Кожевнический проезд, 4 Тел: (495) 790-77-73 E-mail: <a href="mailto:secretariat@microgen.ru">secretariat@microgen.ru</a> Веб-сайт: <a href="http://www.microgen.ru/">http://www.microgen.ru/</a>
14	<b>Бруцелла-IgG – ИФА – БЕСТ</b> Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителю бруцеллеза в сыворотке (плазме) крови человека	РУ № ФСР 2012/13844	ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» 630117, г. Новосибирск-117, а/я 492
15	<b>Бруцелла-IgA-ИФА-БЕСТ</b> Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов класса A к возбудителю бруцеллеза в сыворотке (плазме) крови человека	РУ № ФСР 2012/13843	Тел./факс (383) 227-73-60 (многоканальный) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34, 332-67-52, 332-67-49, 332-81-34
16	<b>Бруцелла-IgM-ИФА-БЕСТ</b> Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов класса M к возбудителю бруцеллеза в сыворотке (плазме) крови человека	РУ № ФСР 2012/13842	E-mail: <a href="mailto:ybmarket@vector-best.ru">ybmarket@vector-best.ru</a>

# Нормативные и методические документы по лабораторной диагностике бруцеллеза:

1. Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика бруцеллеза» (СП 3.1.7. 2613-10).
2. **Методические указания «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» (МУ 3.1.7.1189-03).**
3. Методические указания «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» (МУК 4.2.3010-12).
4. Методические указания «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чумы, сибирской язвы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза) к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.2495-09).
5. «Руководство по вакцинопрофилактике особо опасных инфекций» (раздел «Вакцинопрофилактика бруцеллеза»)/ Под ред. профессора И.В. Борисевича, профессора И.В. Дармова. – Киров: ООО «Кировская областная типография», 2011 г.
6. «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство» / Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. – Издание 2-е, переработанное и дополненное. – 2013. – М.: Шико. – 560 с.

## В стадии утверждения находятся:

1. **«Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза» (МУК 3.1.73402-16)**  
Введены взамен Методических указаний «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» (МУ 3.1.7.1189-03).



**Благодарю за внимание**