



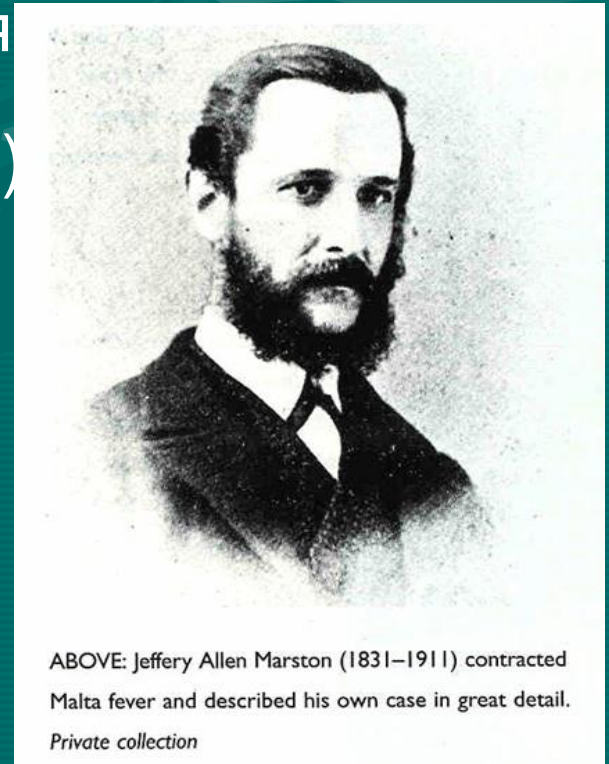
Микробиология возбудителя бруцеллеза



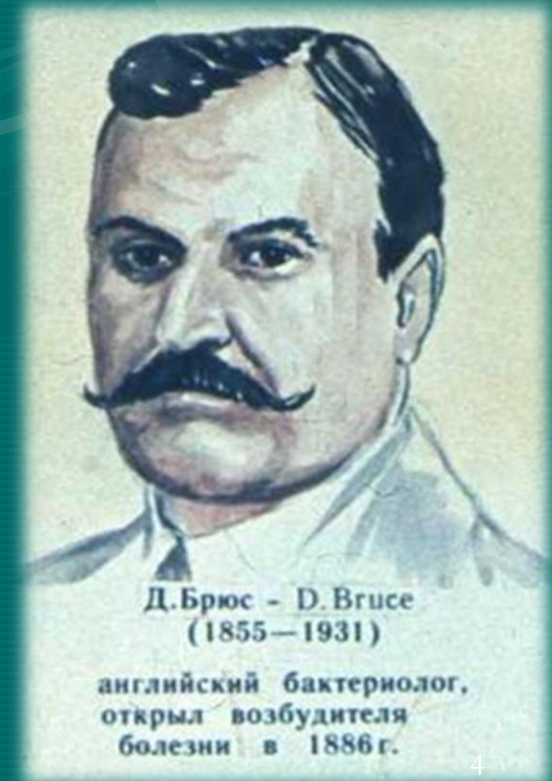
Бруцеллез – острая зоонозная инфекция, вызываемая бактериями рода *Brucella*, характеризующаяся волнообразным течением и имеющая высокую потенциальную возможность перехода в хроническую форму.

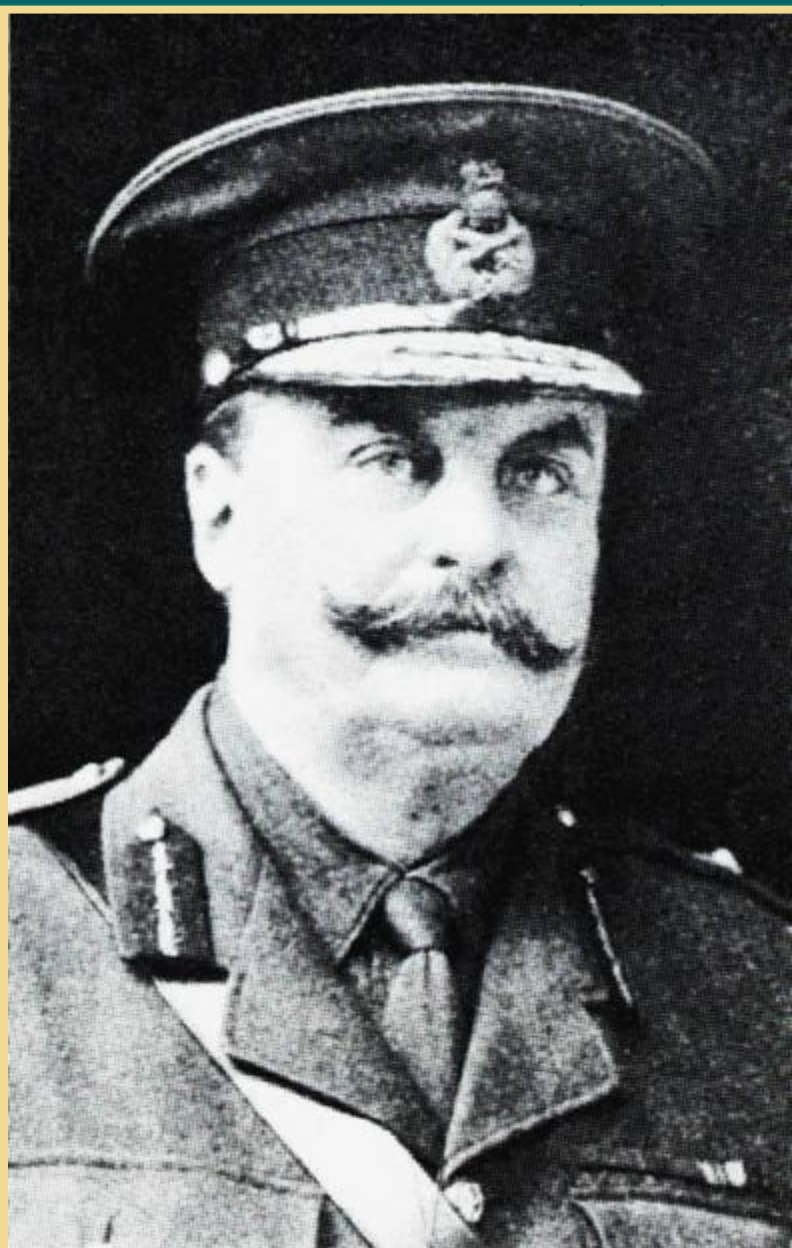
История открытия возбудителя

Бруцеллез, как самостоятельная нозологическая форма была описана хирургом ВМФ Британии Мерстоном [Marston J.A., 1861], который заболел мальтийской лихорадкой и описал симптоматику болезни в деталях. Дал болезни название «средиземноморская ремитирующая или гастрическая ремитирующая лихорадка» (мальтийская лихорадка)



В 1896 г. английским ученым D. Bruce в мазках селезенки человека, умершего от мальтийской лихорадки, был обнаружен возбудитель, такие же микроорганизмы были выявлены им в пунктате селезенки больных людей. В 1897 г. Брюс выделил возбудителя в чистом виде и назвал его *Micrococcus melitensis*





**Врач и
микробиолог
британской
армии
сэр Дэвид Брюс**

В 1897 г. английские исследователи Райт и Семпл (Wright and Semple) установили, что сыворотка крови больных мальтийской лихорадкой обладает способностью специфически агглютинировать культуры *Micr. melitensis*.

Этот принцип, в последующем получивший название реакции Райта, лег в основу серологической диагностики бруцеллеза у людей и ЖИВОТНЫХ.

К концу 19 века были определены основные характеристики бруцеллезной инфекции с точки зрения этиологии, клиники и диагностики.

Однако оставался открытым вопрос профилактики этого инфекционной болезни, так как не был известен истинный резервуар возбудителя инфекции.

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

Один из членов комиссии Заммит (Zammit) 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 1897 г. датский врач и ветеринар Bernhard Bang параллельно с V. Stribolt выделили из околоплодной жидкости абортировавшей коровы микроорганизмы и назвали их *Bac. abortus bovis*. Доказали, что они могут инфицировать коров, лошадей, овец и коз.

Bernhard Bang

S. Traum [1914] от абортировавших свиной выделил третий тип – *Bac. abortus suis*.



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

В 1920 г. К. Meyer, M. Shaw объединили возбудителей мальтийской лихорадки и инфекционного аборта в один род.

В дальнейшем было предложено все три типа возбудителя объединить в одну группу, названную в честь первооткрывателя D. Bruce – бруцеллами.

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



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



World Health
Organization

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]

Подкомитета по таксономии бруцелл [2008] выделил в два самостоятельных вида бруцеллы, изолированные от морских млекопитающих:

B. ceti – китообразные,
B. pinnipedialis – ластоногие



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 позволяет отнести культуры к новому виду - *B. microti* [2008].

Род *Brucella* [2008]

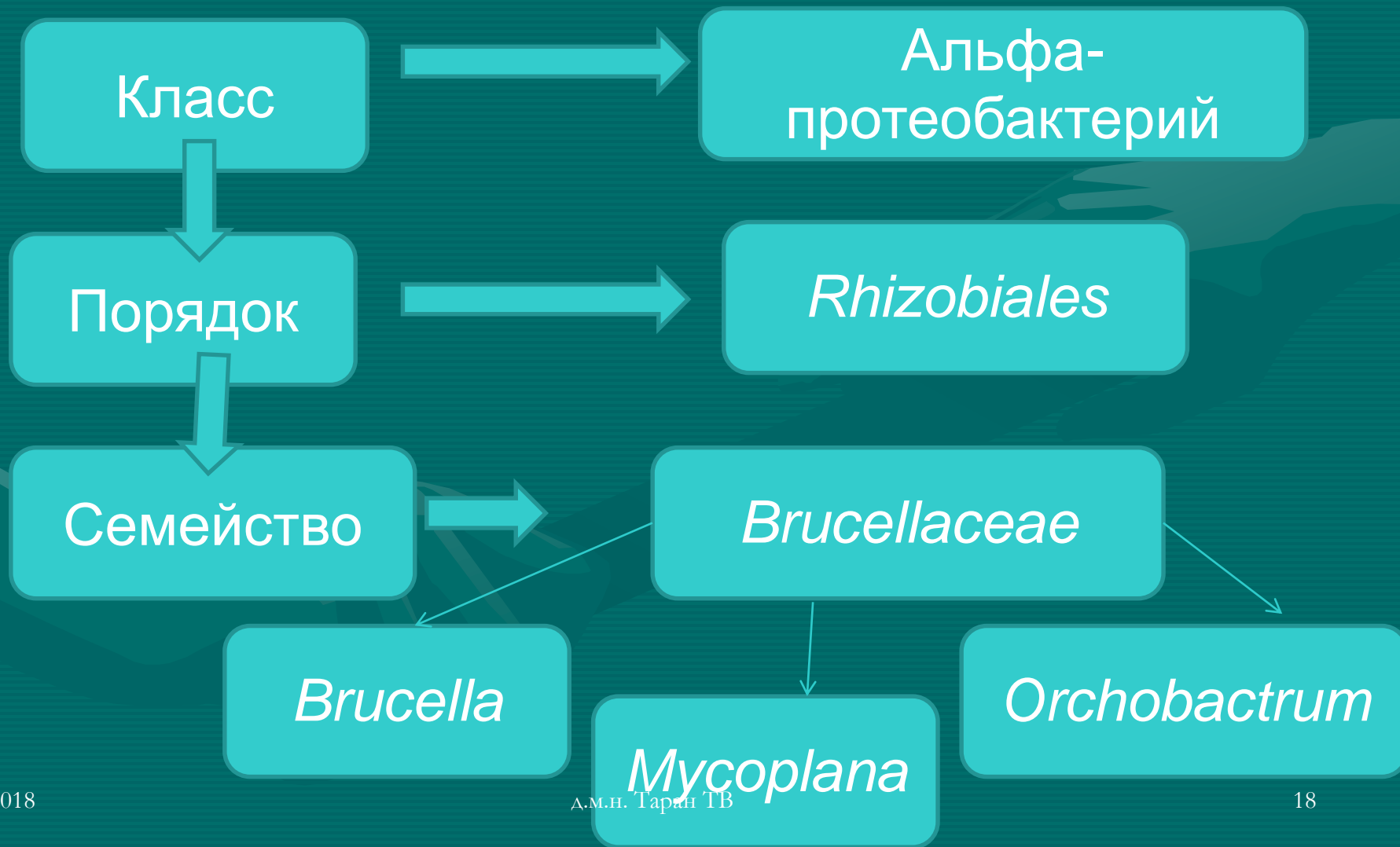
Вид	Биовары	Основной хозяин
<i>Brucella melitensis</i> [1893,1920]	1, 2, 3	Овцы, козы
<i>Brucella abortus</i> [1901, 1920]	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9	Крупный рогатый скот
<i>Brucella suis</i> [1929]	1, 2, 3, 4, 5	Свиньи, кабаны, зайцы, северные олени, мышевидные грызуны
<i>Brucella ovis</i> [1956]		Бараны
<i>Brucella neotomae</i> [1956]		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]		Инфекция импланта молочной железы

Род *Brucella* принадлежит к семейству *Brucellaceae* к порядку *Rhizobiales* внутри класса альфа-протеобактерий.

Филогенетическое положение бруцелл в пределах класса альфа-протеобактерий было подтверждено на основе подобия рибосомальных цистронов и сравнительного сиквенса 16S рРНК.

Являясь внутриклеточными паразитами животных, бруцеллы демонстрируют близкую родственность с почвенными организмами (*Ochrobactrum*), растительными симбионтами (*Rhizobium spp.*) и фитопатогенами (*Agrobacterium spp.*).

Систематическое положение рода *Brucella*



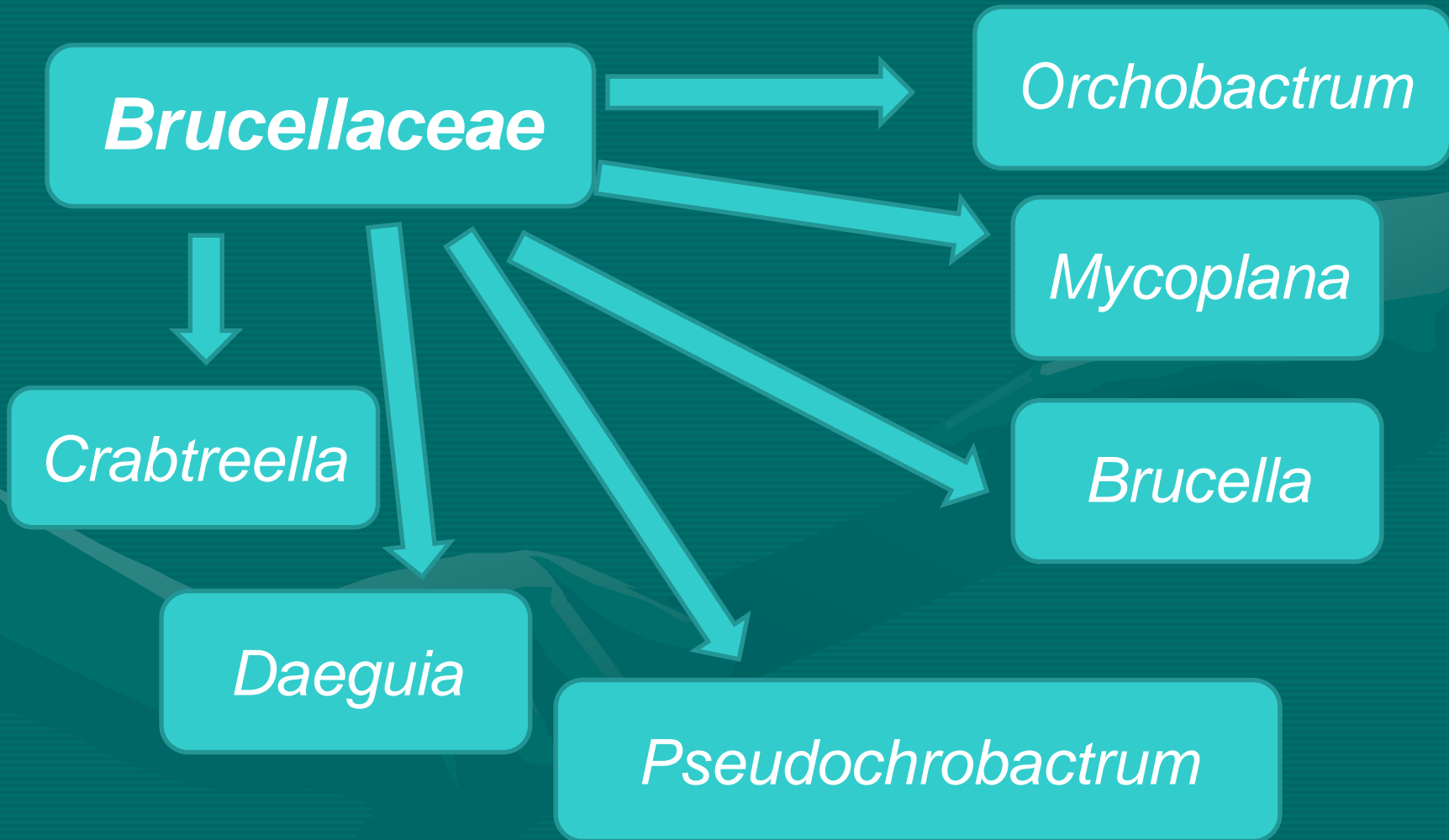
Семейство *Brucellaceae* согласно последней редакции определителя Берги состоит из родов *Brucella*, *Mycoplana* и *Orchobacterium*.

Род *Orchobacterium* наиболее близок фенотипически и генетически к бруцеллам.

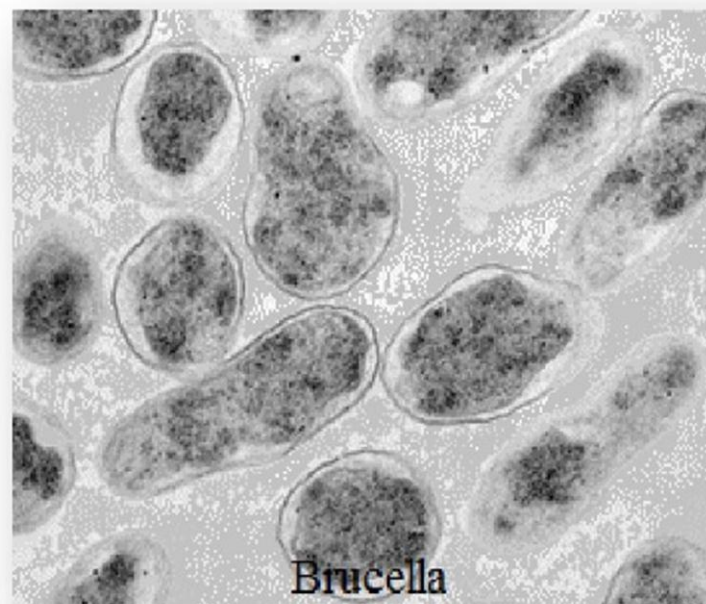
В пределах этого рода вид *Ochrobacterium intermedium* следует рассматривать как филогенетически и таксономически самым родственным к бруцеллам.

В 2007-2008 гг. были описаны еще три дополнительных рода *Pseudochrobacterium*, *Daeguia* и *Crabtreeella*, которые проявляют близкое филогенетическое родство к семейству *Brucellaceae* и которые, вероятно, его расширяют.

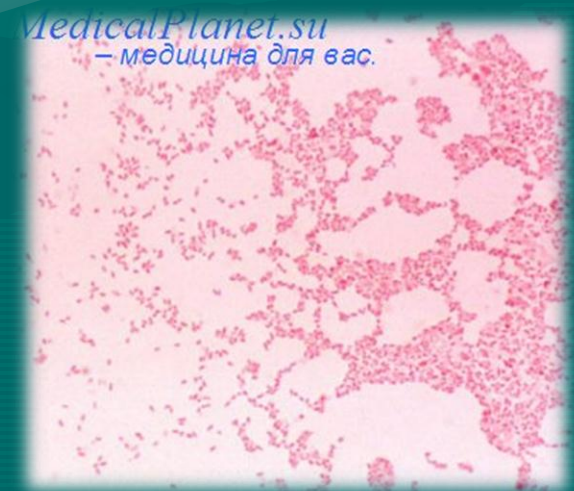
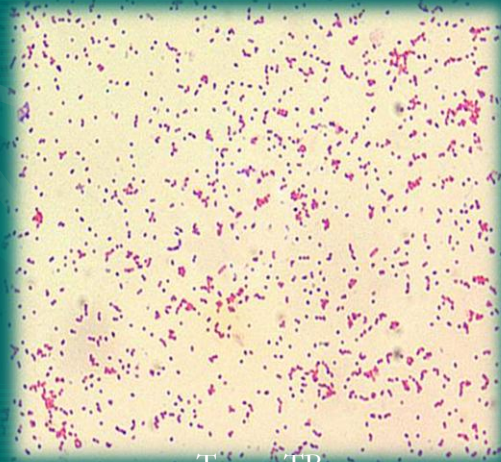
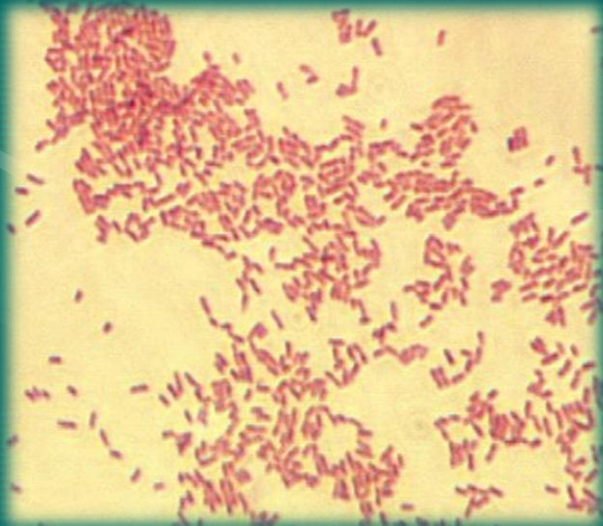
Семейство *Brucellaceae*



Микробные клетки бруцелл грамотрицательны, могут иметь шаровидную, овоидную или палочковидную формы, размеры клеток 0,3-0,6 мкм – для кокковых и 0,6-2,5 мкм – для палочковидных форм (в 1,67 раза мельче *E. coli*).



В микроскопических препаратах микробные клетки располагаются чаще всего беспорядочно, иногда формируют цепочки, а в некоторых случаях встречаются клетки, расположенные попарно в виде диплококков.



Бруцеллы – 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.

Особенностью питательных потребностей обладают культуры вида *B. ovis*.

Для культивирования штаммов данного вида необходимы среды, в состав которых дополнительно вносится 10 % нормальной кроличьей сыворотки или аминокислоты.

- Максимальный рост бруцеллезного микроба при прочих благоприятных условиях наблюдается при рН – 6,6-7,4 (оптимум 7,2).
- Наилучшей температурой культивирования бруцелл является температурный диапазон от 34 до 37 °С (оптимум 37 °С).

Для выделения и культивирования бруцелл используют:

- печеночные и мясопеченочные агары и бульоны,
- агар и бульон Альбими (дрожжевой гидролизат)
- агар Д (рыбный гидролизат)
- сывороточно-декстрозный агар,
- эритрит-агар,
- кровяной агар.
- Бруцелла агар

На минимальных средах установлено, что для культивирования бруцелл необходимо наличие следующих аминокислот: α -аланин, α -лизин, α -гистидин, α -метионин, α -цистеин.

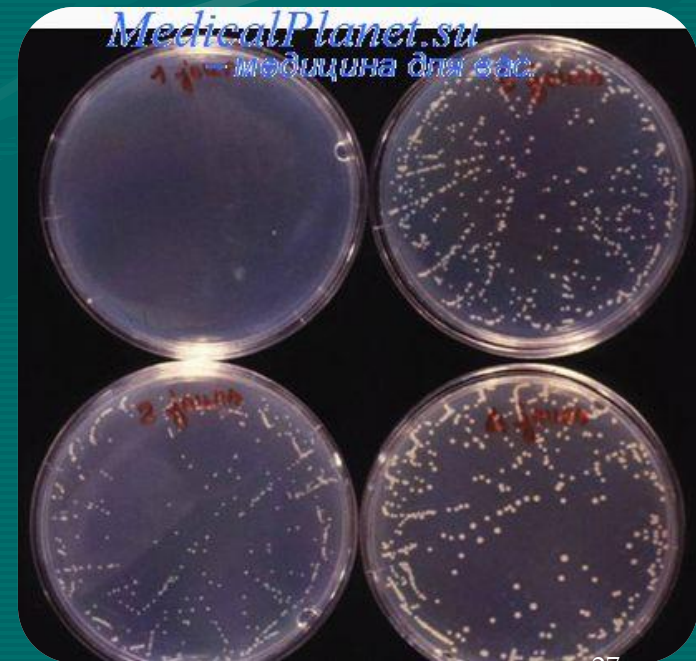
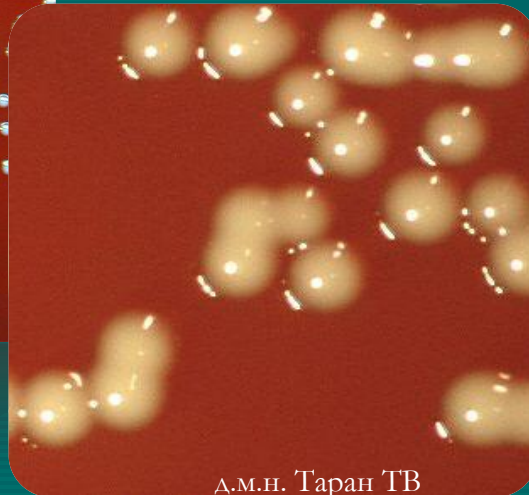
Коммерческие отечественные среды:

- питательная среда для выделения бруцелл,
- эритрит-бульон и эритрит-агар.

Среды зарубежного производства:

- Brucella agar base,
- Brucella broth base,
- Brucella vitamin K,
- Blood agar base (Himedia, Индия) и др.

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.



Для бруцелл характерно явление диссоциации (изменение исходных свойств культур), 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 ее пассажа на плотных питательных средах или через биопробных животных.

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

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.

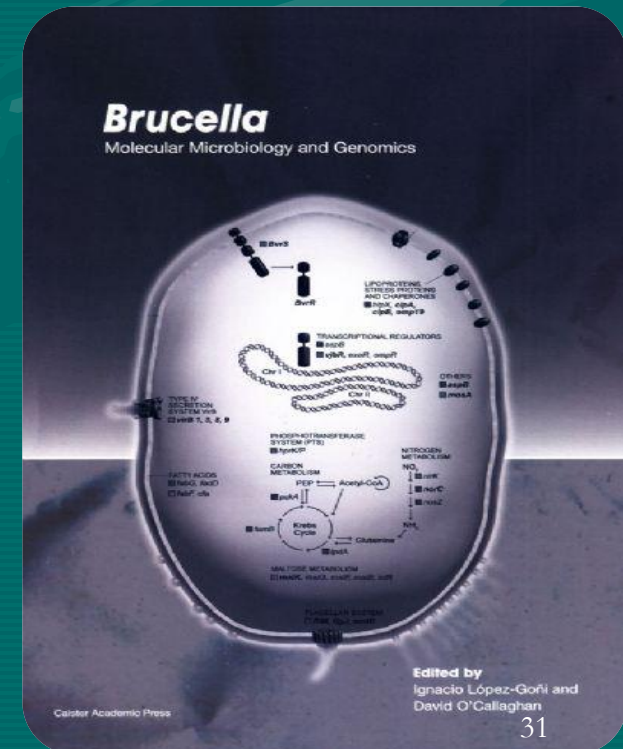
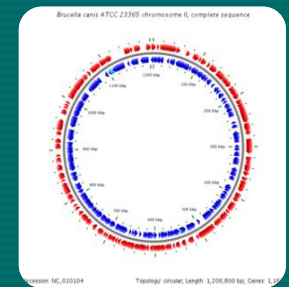
По морфологии L-формы бруцелл представляют собой полиморфные клетки в виде шаров, грушевидных и неправильной формы тел от 1 до 6 мкм.

- Впервые в качестве L-трансформирующих агентов для бруцелл использована комбинация бицилина-3 с глицином в возрастающих концентрациях бицилина-3 при каждом пассаже от 50 ЕД/мл до 20 000 ЕД/мл и глицина от 0,1 до 3 %.
- Нестабильные L-формы появлялись на 5-15 пассаж.
 - Условно стабильные L-формы бруцелл получали периодическим пассированием L-трансформирующих культур через организм белых мышей, обработанных бицилином-3.

Геном бруцелл

Анализ геномов 3-х патогенных видов бруцелл (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*) выявил высокую гомологию ДНК на нуклеотидном уровне (> 90 %).

Общий размер генома бруцелл составляет $2,37 \times 10^3$ МДа, с содержанием ГЦ пар 58-59 моль %.



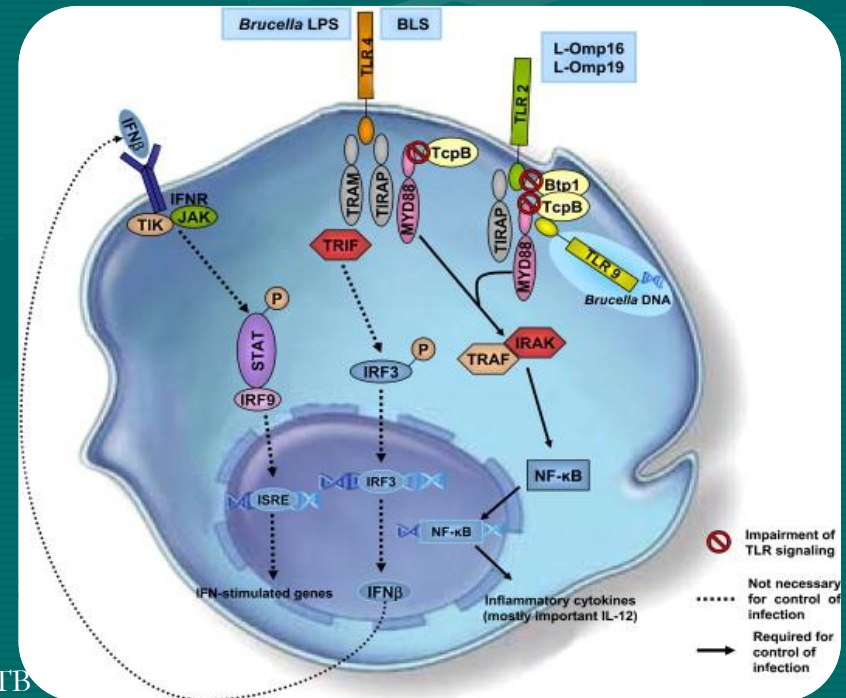
Геномы культур видов *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae* и *B. suis* 1 биовара представлен двумя хромосомами с размерами 2,1 Mb и 1,5 Mb.

Оба репликона определяют метаболические и репликативные функции и, следовательно, являются хромосомами, а не плазмидами .

Геномы культур вида *B. suis* 2 и 4 биоваров имеет две хромосомы размером 1,85 Mb и 1,35 Mb, а *B. suis* 3 биовара – всего одну 3,1 Mb.

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.



Как и другие грамотрицательные микроорганизмы бруцеллы содержат ЛПС, как основной компонент их наружной мембраны и важный фактор вирулентности. Морфология колоний, (S-, R-) зависит от структуры ЛПС.

Гладкий фенотип формируется благодаря присутствию полного ЛПС, который состоит из липида А, корового олигосахарида и O-боковых цепей полисахарида.

ЛПС шероховатых штаммов не содержит боковые O-цепи.

Эти антигены отражают различия, которые обнаруживаются у А-доминантных штаммов (связывание с альфа-1,2), и у М-доминантных штаммов (каждый пятый остаток связан с альфа-1,3).

Антигенные О-цепочки полисахаридов *B. abortus* и *Yersinia enterocolitica* серовар 0:9 имеют сходную структуру, что определяет перекресты серологических реакций.

В настоящее время у бруцелл описаны также:

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

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

- S-ЛПС – основной антиген, использующийся в стандартных диагностических тестах: агглютинация, связывание комплемента, кольцевая реакция.
- чистый гаптен и полисахарид В – в пробе радиальной иммунодиффузии для дифференциации инфицированных и иммунизированных животных.
- внутриклеточный A_2 -антиген – в тестах иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза, которые при некоторых обстоятельствах позволяют также отличить инфицированных животных от иммунизированных.

Биохимическая активность

- Каталазы
- Уреазы
- Гиалуронидазы
- Липазы и амилазы
- Аденин дезаминазы
- Низкая сахаролитическая активность

Сравнительная биохимическая активность представителей рода *Brucella*

Вид бруцелл	Уреаза	Каталаза	Аденин-дезаминаза	Сахаролитическая активность						
				Эритритол	Глюкоза	Инозит	Манноза	Рамноза	Мальтоза	Трегалоза
<i>B. melitensis</i>	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
<i>B. abortus</i>	±	±	—	+	+	+	+	+	—	—
<i>B. suis</i>	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+

Бактериофаги бруцелл

- Тб (Тбилиси) – 1956 г. Попхадзе и Абашидзе
- Wb (Weybridge)
- Fi (Firenze),
- Bk (Berkley)
- R-фагом (R/O, R/C)
- Iz (Izatnagar)

Бактериоциногенность

Бактериоциногенность – это способность бактерий синтезировать белковоподобные антибактериальные вещества с ограниченным диапазоном активности.

Продукция бруцеллацина является стабильным признаком, в случае его угасания может восстановиться путем пассирования культуры через биопробных животных или пересевах на питательных средах.

Выражена у культур вида *B. ovis*

Факторы патогенности

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

Наиболее вирулентным для человека и животных является культура вида *B. melitensis*. Штаммы данного вида способны вызывать заболевание при введении единичных микробных клеток, так для морских свинок это доза составляет 20 м.к. Инфицирующая доза (ИД₅₀) *B. melitensis* для обезьян при подкожном введении не достигает 100 м.к., а для *B. suis* при введении в форме аэрозоля морским свинкам составляет 36 м.к. Общая смертность при бруцеллезе не достигает 2 %.

Лабораторная диагностика бруцеллеза

Лабораторные методы диагностики бруцеллеза

I группа – методы, позволяющие выявить бруцеллы и их растворимые антигены

II группа – тесты, выявляющие специфические антитела

III группа – методы, выявляющие повышенную сенсibilизацию организма к бруцеллезному антигену

I. Методы, позволяющие выявить бруцеллы и их растворимые антигены

- Бактериологический
- Биологический
- Иммунофлуоресцентный
- Реакция нейтрализации антител (РНАт)
- Иммуноферментный анализ (ИФА)
- Полимеразная цепная реакция (ПЦР)
- Иммунорадиометрический анализ (ИРМА)
- Реакция двойной диффузии в геле (РДГА)
- Иммуноблотинг

Материал для исследования на бруцеллез:

- от людей: кровь, костный мозг, спинномозговая жидкость, моча, желчь, суставная жидкость (при артритах), гной (при абсцессах), секционный материал
- от животных: кровь, абортированные плоды, околоплодные оболочки или желудок плода с его содержимым, лимфатические узлы, влагалищные выделения, молоко;
- пищевые продукты: сливки, сыры, творог, мясо
- объекты внешней среды: вода, почва, навоз

Бактериологическая диагностика бруцеллёза

Бактериологический метод

Кровь, моча, костный мозг, СМЖ, желчь, пунктаты

Загрязнённый материал

СТБ

Среда с ГВ

Среды с антибиотиками

Бифазная среда (по Кастанеда)

Чистая культура

Идентификация

Окраска по Граму, Козловскому

Характер роста на питательных средах

РА с поливалентной бруцеллёзной сывороткой

МФА

BRUCELLA

Биологический метод

Б/м, п/к 0,5 мл

М/св, п/к 1 мл

Вскрытие – 21 сут

Вскрытие – 30 сут

Паренхиматозные органы; лимфоузлы (5 групп)

Межвидовая дифференциация

Потребность в CO₂

Продукция H₂S

Рост на средах с основными красителями

Чувствительность к бактериофагам

РА с моноспецифическими сыворотками

ОВ метаболизм

Выделение культуры бруцелл с помощью бактериологического метода осуществляют методом Кастанеда — посев крови одновременно на плотную и жидкую питательные среды.

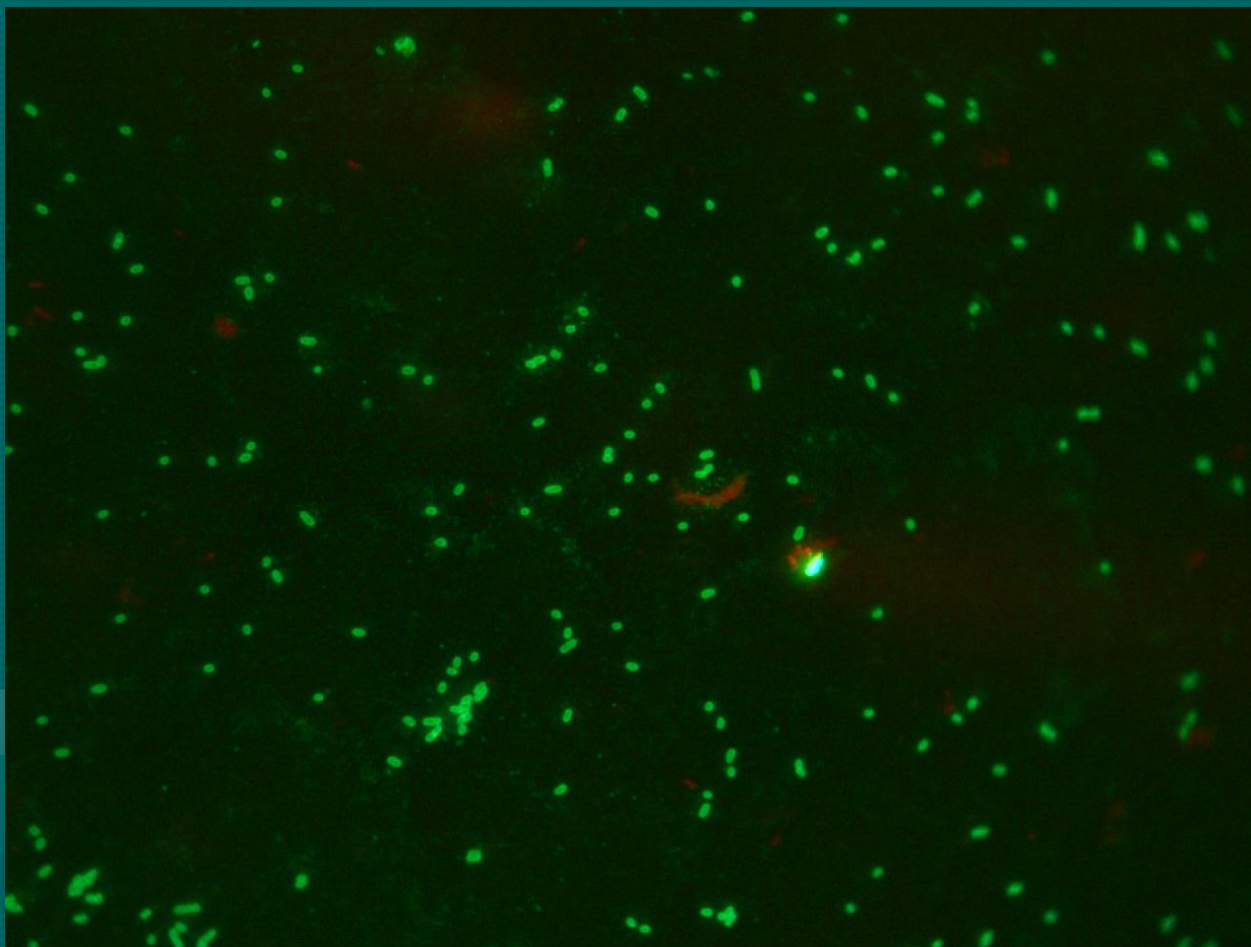
Для посева крови и транспортирования материала предложена среда для транспортирования биоматериала и накопления бруцелл.



Тесты родовой идентификации бруцелл

- изучение морфологии колоний (диаметр 3-4 мм) и характера роста на плотных и в жидких питательных средах
- микроскопия окрашенных препаратов по Граму (грамотрицательны) или Козловскому (красные - сафранин)
- проба со специфической бруцеллезной агглютинирующей сывороткой (1:25) в РА на стекле

- МФА (свечение на 3-4 креста, 2-3 клетки в каждом поле зрения)



Пробы для выявления S-культур бруцелл

- проба с трипафлавином (солевым раствором трипафлавина 1:500)
- реакция термопреципитации (прогревание взвеси концентрацией 1 млрд м.к./мл на водяной бане при температуре 90 гр. С в течение 30 мин; наблюдение через 30, 60 мин и 24 ч инкубации взвеси при комнатной температуре)
- проба Уайт-Вильсона (раствор кристаллвиолета 1:2000)

Референтные штаммы бруцелл, применяемые при межвидовой дифференциации

- *B. melitensis* 16-M (1 биовар)
- *B. abortus* 544 (1 биовар)
- *B. suis* 1330 (1 биовар)

Тесты межвидовой дифференциации бруцелл

- отношение культур к повышенному содержанию в атмосфере углекислого газа
- образование сероводорода
- редуцирующая активность в отношении основных красителей (фуксин и тионин)
- агглютинация моноспецифическими сыворотками
- лизис бруцеллезным бактериофагом Тб

Потребность в повышенном содержании в атмосфере углекислого газа

<i>B. melitensis</i>	нет
<i>B. abortus</i>	да
<i>B. suis</i>	нет

Продукция сероводорода

<i>B. melitensis</i> (1 биовар)	нет
<i>B. abortus</i> (1 биовар)	5-7 мм
<i>B. suis</i> (1 биовар)	15-20 мм

Редуцирующая активность в отношении основных красителей

	Тионин (20 мкг/мл)	Фуксин (20 мкг/мл)
<i>B. melitensis</i> (1 биовар)	Есть	Есть
<i>B. abortus</i> (1 биовар)	Нет	Есть
<i>B. suis</i> (1 биовар)	Есть	Нет

РА с моноспецифическими сыворотками

	сыворотка anti-abortionus	сыворотка anti-melitensis
<i>B. melitensis</i> (1 биовар)	отрицательная	1:20 (не менее, чем на 2 креста)
<i>B. abortus</i> (1 биовар)	1:20 (не менее, чем на 2 креста)	отрицательная
<i>B. suis</i> (1 биовар)	1:20 (не менее, чем на 2 креста)	отрицательная

Фагочувствительность

	Тб (Тбилиси)	Wb (Weybridge)	Fi (Firenze)	Bk (Berkley)
<i>B. melitensis</i> (1 б/в)	-	-	-	+
<i>B. abortus</i> (1 б/в)	+	+	+	+
<i>B. suis</i> (1 б/в)	-	+	±	+

Обозначения: (+) - 100 % лизис культур данного вида
 (+) - частичный лизис культур данного вида
 (-) - отсутствие лизиса

Субстраты реакции окислительного метаболизма

- L-аланин
- L-аспарагин
- L-глутаминовая кислота
- L-аргинин
- L-цитрулин
- DL-орнитин
- L-лизин
- D-рибоза
- D-ксилоза
- D-галактоза
- D-глюкоза
- i-эритритол

Определение дезаминазной активности

Основано на качественном определении аммиака, образующегося в результате дезаминирования аденина до гипоксантина.

Готовят взвесь 2-х суточной агаровой культуры исследуемых штаммов в 1 мл фосфатного буфера до конечной концентрации 3 млрд м.к./мл.

Пробу делят пополам: в опытную – добавляют 1 мл 1 % раствора аденина, в контрольную – 1 мл дистиллированной воды.

Пробирки инкубируют при температуре 37 гр С в течение 24 ч после чего добавляют в каждую из них по 0,2 мл реактива Несслера.

Реактив Несслера - щелочной водный раствор дигидрата тетраiodомеркурата (II) калия ($K_2[HgI_4(H_2O)_2]$).

При взаимодействии с аммиаком и гуанидинами образует красно-коричневый осадок $(Hg_2N)I \cdot H_2O$ с органическими восстановителями.

Применяется для качественного обнаружения вышеуказанных соединений, а также для калориметрического определения небольших количеств (около 0,001 % по объёму) аммиака.

Предложен к применению немецким химиком Юлиусом Несслером в 1868 г.

Учет результатов производят визуально по изменению окраски содержимого пробирок непосредственно после добавления реактива Несслера.

Если исследуемая культура не обладает дезаминазной активностью в отношении аденина (отрицательная проба) – раствор бесцветен или слегка окрашен в желтовато-зеленый цвет, как и в контроле.

При наличии дезаминазной активности (положительная проба) наблюдается ярко-красное окрашивание, возможно появление оранжевой взвеси и последующее ее выпадение в осадок.

Дезаминазная активность бруцелл

<i>B. melitensis</i>	нет
<i>B. abortus</i>	нет
<i>B. suis</i>	есть

Упрощенная схема дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза

Используемые тесты:	Видовая принадлежность культур		
	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>
агглютинация сывороткой диагностической бруцеллезной поливалентной сывороткой для РА	+	+	+
микроскопия мазков, окрашенных по Граму	Г ⁻	Г ⁻	Г ⁻
МФА	+	+	+
чувствительность к бактериофагу Тб в ДТР	+	-	-
адениндезаминазная активность	-	-	+

Дифференциальные признаки полевых культур вида *B. abortus* от вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА

Штамм	Потре бность в CO2	Рост на среде			Рост в присутствии пенициллина	
		тионин	i-эритритол		3 мкг	6 мкг
		2 мкг/мл	1 мкг/мл	2 мкг/мл		
<i>B. abortus</i> I биовар полевой	(+)	—	+	+	+	+
<i>B. abortus</i> 19 ВА	—	—	(-)	(-)	—	—

Идентификация L-культур бруцелл

- изучение характера роста и морфологии колоний
- микроскопия нативных препаратов
- проба со специфической сывороткой в реакции агглютинации на стекле
- 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, размером от 2 до 3 мм имеют золотистый цвет, слизистую консистенцию, часто врастают в агар.
- При просмотре в биноккулярную лупу имеют вид «яичницы» - плотный центр и ажурная светлая периферия.

Микроскопия нативных препаратов

Для приготовления мазка на предметное стекло наносят каплю 0,9 % раствора хлорида натрия, в которой эмульгируют одну каплю исследуемой культуры, закрывают покровным стеклом, края заливают парафином и просматривают в световом микроскопе в фазовом контрасте с иммерсией.

- L-формы бруцелл – полиморфные клетки в виде шаров, грушевидной и неправильной формы тел от 1 до 6 мкм с цитоплазмой разной оптической плотности с вакуолями и зернистостью
- 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 сывороткой в разведении 1:25.

При бактериологическом исследовании проб из окружающей среды и пищевых продуктов необходимо последовательное проведение следующих этапов

- перевод в жидкую фазу: суспендирование в 0,9 % растворе натрия хлорида или бульоне (почва, пищевые продукты);
- концентрация возбудителя в исследуемом материале путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 2 ч., фильтрация или добавление специфической бруцеллезной агглютинирующей сыворотки в соотношении 1:100;
- посев на плотные питательные среды.

При исследовании материала, контаминированного посторонней микрофлорой, к питательным средам добавляют ингибиторы - генцианвиолет (из расчета 1:200000).

Комитет экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу рекомендует : 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

Биологический метод

Биологические модели:

- белые мыши (генерализация инфекции 21 сут.)
- морское свинок (генерализация инфекции 30 сут.)

Посев:

- лимфоузлы (паховые, шейные, подчелюстные, аксиллярные, парааортальные)
- паренхиматозные органы (печень, селезенка)
- кровь, костный мозг

Алгоритм диагностики при бруцеллезе:

Выделение культуры не является определяющим в постановке диагноза

Диагноз ставится на основании клинико-эпидемиологических данных, результатов иммуно-серологического исследования

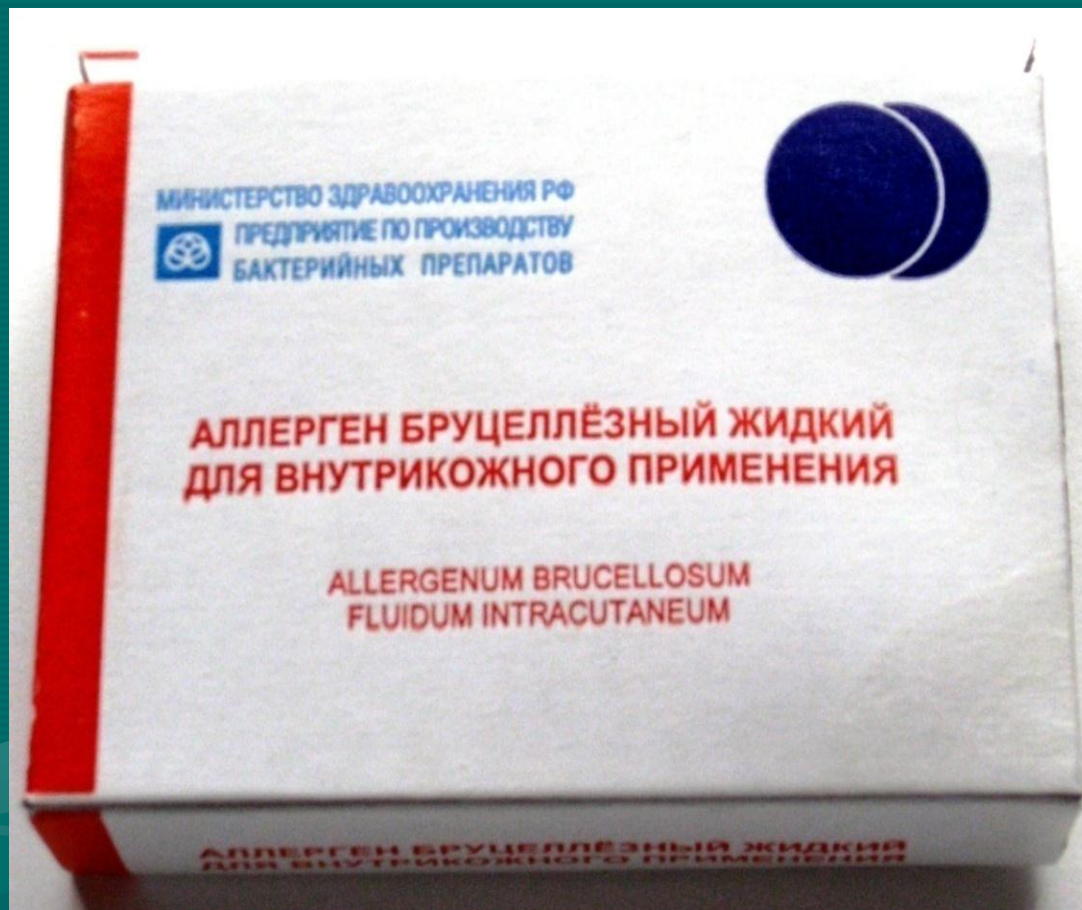
Тесты, выявляющие специфические антитела

1. Реакция агглютинации в пробирках (Райта)
2. Пластинчатая реакция агглютинации (Хеддльсона)
3. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)
4. Антиглобулиновая проба Кумбса (РК)
5. Иммуноферментный анализ (ИФА)
6. Реакция связывания комплемента (РСК) и длительного связывания комплемента (РДСК)
7. Реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)

Внутрикожная аллергическая проба Бюрне

Основана на способности организма, сенсibilизированного бруцеллезным антигеном, специфически отвечать местной реакцией (отек, болезненность) на внутрикожное введение бруцеллина.

Бруцеллин представляет собой фильтрат трехнедельной бульонной культуры бруцелл.



Реакция специфична, но выявляется у больных позднее, чем антитела, и сохраняется очень долго, иногда годами, после исчезновения клинических СИМПТОМОВ.

Аллергическая реакция может быть положительной в случаях:

- бессимптомной инфекции
- у привитых живой бруцеллезной вакциной
- у лиц, длительно контактировавших со специфическим антигеном

- Бруцеллин вводят внутрикожно в количестве 0,1 мл. Инъекция делается на ладонной поверхности предплечья.
- Учет реакции производится через 24-48 ч. после введения бруцеллина путем осмотра и ощупывания кожи.
- В некоторых случаях аллергическая реакция становится положительной к 72 ч.

- При положительной реакции на месте введения бруцеллина появляется красноватая или бледная болезненная отечность удлиненной или овальной формы.
- При слабо выраженной реакции отек распознается только при ощупывании.
- При учете реакции отмечается размер отека в сантиметрах (длина и ширина), степень болезненности через 24 и 48 ч. При отрицательном результате следует учитывать реакцию и через 72 ч.

Учет аллергологической пробы

Результат пробы	Критерий оценки
Слабо положительная	Слабо выраженный отек не более 3 см в диаметре
Положительная	Отек размером от 2 до 6 см в диаметре
Резко положительная	Отек свыше 6 см, иногда сопровождающаяся лимфаденитом и общей реакцией

- Отсутствие болезненности и гиперемии при наличии отека не исключает положительной оценки пробы.
- Гиперемия кожи при отсутствии отека принимается за отрицательный результат.

Реакция лизиса лейкоцитов (РЛЛ)

Реакция 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 ч. после взятия крови.

- Кровь для исследования берут в объеме 1 мл и вносят в колбочку с гепарином (75-80 МЕ гепарина на 1 мл крови). По 0,4 мл гепаринизированной крови помещают в 2 пробирки.
- В опытную – добавляют 0,1 мл бруцеллезного антигена (*B. abortus* 19 ВА в концентрации 1×10^7 м.к./мл), в контрольную – 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

- Проводят подсчет лейкоцитов в камере Горяева после добавления антигена и через 2 ч. инкубации при температуре 37 °С, определяя их среднее количество после 2-3 подсчетов для каждой пробирки.
- Процент лейкоцитов после инкубации в опытной и контрольной пробирках определяют отношением количества лейкоцитов после инкубации к количеству лейкоцитов до инкубации.

- Показатель специфического лизиса лейкоцитов (ПСЛ) подсчитывают 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.

Поэтапное развитие иммунологической реактивности у больных бруцеллезом

	10 сут	30 сут	60 сут	90 сут	120 сут	180 сут
РХ	+	+	+	+	+	+
РА	-	+	+	±	-	-
РПГА	±	+	+	+	+	+
РК	-	±	+	+	+	+
Проба Бюрне	-	+	+	+	+	+
ИФА	-	+	+	+	+	+

Полимеразная цепная реакция

Преимуществом метода является возможность индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза в течение короткого промежутка времени (4-6 ч.) и его высокая чувствительность ($1 \times 10^2 - 10^3$ м.к. /мл).

Отсутствие перекрестных реакций с ДНК *E. coli*, *V. cholerae*, *F. tularensis*, *Y. enterocolitica* 09, *Y. pestis* EV, *S. typhimurium* обуславливает специфичность метода.

ПЦР позволяют осуществлять выявление возбудителя бруцеллеза

- в пробах клинического материала (кровь, сыворотка крови, гистологический материал)
- в объектах окружающей среды (вода, почва, смывы)
- в пищевых продуктах (молоко, кисломолочные продукты).

- Регламентированным методом выделения ДНК при подготовке проб к ПЦР-анализу является метод нуклеосорбции в присутствии высокомолярного гуанидинтиоцианата
- ПЦР была разработана для фрагмента ДНК гена BCSP31, кодирующего один из поверхностных белков бруцелл размером 31 кД
- При оценке результатов ПЦР следует учитывать, что праймеры, используемые в тест-системах, обеспечивают амплификацию специфичных фрагментов ДНК всех видов бруцелл, в т.ч. и вакцинных штаммов.

Подходы к использованию лабораторных методов исследования при бруцеллезе

Цель исследования	Посев крови	РХ	РА	РПГА	РК	ИФА	Проба Бюрне
Острый и подострый бруцеллез	+	+	+	+	если все тесты отриц., то +	+	
Перед вакцинацией		+				+	+
Эпидобследование		+	+	+	+		+
Хронический бруцеллез					+	+	+

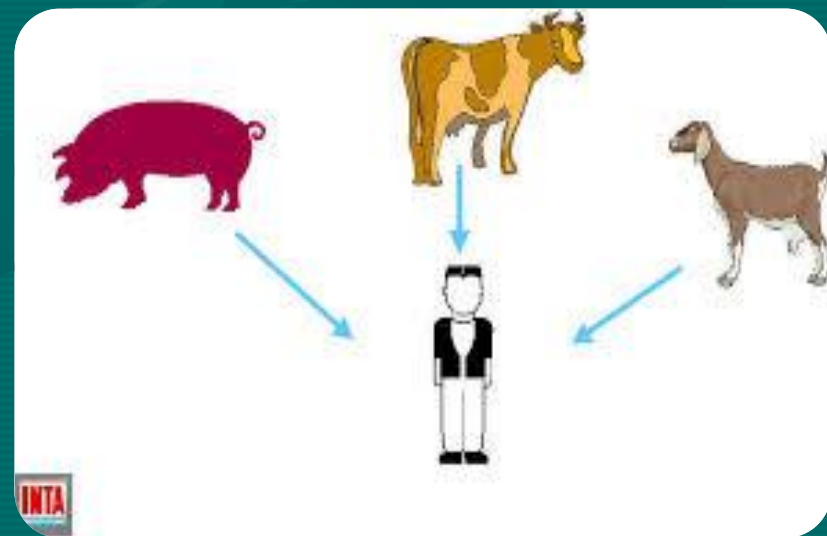
Бруцеллезные диагностические препараты и питательные среды:

1. Аллерген бруцеллезный жидкий (Бруцеллин), филиал ФГУП НПО «Микроген» г. Омск
2. ГенБру Тест-система для выявления ДНК *Brucella* spp. методом ПЦР (РосНИПЧИ «Микроб»);
3. Набор реагентов «АмплиСенс® *Brucella* spp FRTи FER» (ФБУН ЦНИИЭ, г. Москва);
4. Диагностикум бруцеллезный жидкий для РА (филиал «Медгамал», Ставропольский противочумный институт)
5. Иммуноглобулины флуоресцирующие (филиал «Медгамал»)
6. Эритрит-агар (филиал ФГУП НПО «Микроген», г. Махачкала)
7. Бруцелл-агар (ГНЦ ПМБ г. Оболенск)

- 8 Набор реагентов. Бактериофаги бруцеллезные диагностические жидкие (Ставропольский противочумный институт)
9. Тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в ИФА (ИФА-Бру-СтавНИПЧИ)
10. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителю бруцеллеза в сыворотке (плазме) крови человека. (Вектор-Бест)
11. Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов класса M к возбудителю бруцеллеза в сыворотке (плазме) крови человека. (Вектор-Бест)
12. Набор реагентов для выявления иммуноглобулинов класса A к возбудителю бруцеллеза в сыворотке (плазме) крови человека(Вектор-Бест)

13. Среда питательная жидкая для транспортирования биоматериала и накопления бруцелл (СтавНИПЧИ)

14. Тест-система для выявления антител к возбудителю бруцеллеза в ИФА (СтавНИПЧИ)



Благодарю за внимание

