

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
Федеральное казённое учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный  
институт Сибири и Дальнего Востока»

## **УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЁЗА**



**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ  
ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ**

ИРКУТСК – 2022



Федеральная служба по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека  
Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный институт  
Сибири и Дальнего Востока»

**РУКОВОДСТВО  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ  
БРУЦЕЛЛЁЗА**

**Учебное пособие  
для врачей-бактериологов**

Иркутск – 2022

УДК 616.993-078  
ББК 53.4:55.146  
P85

Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике бруцеллёза: учебное пособие для врачей-бактериологов. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 74 с.

ISBN 978-5-98277-365-4

Утверждено Ученым советом  
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора»

Руководство составлено в соответствии с программой «Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп».

В теоретической части учебного пособия отражены современные представления по таксономии возбудителя бруцеллёза, его биологическим, биохимическим свойствам, тестам дифференциальной и серологической диагностики.

Учебный материал рассчитан на 50 часов, включает: изучение биологических свойств возбудителя бруцеллёза, лабораторную диагностику бруцеллёза у человека и животных, экспресс- и ускоренную диагностику возбудителя.

К каждому занятию имеются план-задание и перечень необходимых материалов и оборудования.

В приложении представлены меры предосторожности при работе с культурой бруцелл, даны рецепты приготовления основных питательных сред, методики изучения биологических свойств возбудителя, схемы лабораторного исследования на бруцеллёз, таблицы оценки чувствительности/устойчивости возбудителя к антибактериальным препаратам.

Учебное пособие предназначено для обучения врачей-бактериологов (биологов) и лаборантов на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации по ООИ, а также может быть использовано специалистами, занимающимися лабораторной диагностикой и изучением возбудителя бруцеллёза.

Авторы:

*Т.М. Долгова, Т.Ю. Загоскина, О.Б. Колесникова, О.В. Гаврилова,  
В.Ю. Колесникова, Н.Л. Баранникова, С.В. Балахонов*

ISBN 978-5-98277-365-4



© Коллектив авторов, 2022  
© ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора, 2022  
© Оформление ИНЦХТ, 2022



---

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений .....	5
Меры предосторожности при работе с культурой возбудителя бруцеллёза .....	6
<b>1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЁЗА ....</b>	<b>7</b>
Культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства возбудителя бруцеллёза .....	8
Занятие 1 .....	13
Занятие 2 .....	14
<b>2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЁЗА .....</b>	<b>16</b>
Бактериологический метод .....	16
Биологический метод .....	17
<b>3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ И АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА БРУЦЕЛЛЁЗ .....</b>	<b>20</b>
Занятие 3 .....	21
Занятие 4 .....	23
Занятие 5 .....	23
Занятие 6 .....	25
Занятие 7 .....	26
Занятие 8 .....	27
Занятие 9 .....	29
Занятие 10 .....	29
Занятие 11 .....	30
Занятие 12 .....	32
Занятие 13 .....	32
Занятие 14 .....	33
Занятие 15 .....	34
<b>4. ЭКСПРЕССНЫЕ И УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЁЗА .....</b>	<b>36</b>
Занятие 16 .....	37

---

ПРИЛОЖЕНИЕ .....	39
1. Приготовление сред, применяемых для выделения и идентификации бруцелл .....	39
2. Проверка качества питательных сред .....	42
3. Методы получения повышенного содержания углекислого газа .....	43
4. Методы определения признаков диссоциации бруцелл .....	43
5. Тесты идентификации бруцелл .....	44
6. Дифференциация видов и биоваров бруцелл .....	45
7. Серологический диагноз бруцеллёза .....	48
8. Серологическое исследование молока .....	58
10. Определение чувствительности бруцелл ( <i>Brucella</i> spp.) к антибактериальным препаратам .....	64
11. Схема лабораторной диагностики бруцеллёза .....	71
Литература .....	72

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	– антиген
АЕ	– антигенная единица
АТ	– антитело
ДДМ	– диско-диффузионный метод
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– дезоксинуклеозидтрифосфат
ИФА	– иммуноферментный анализ
л/у	– лимфатический узел
ЛЭЖ	– лаборатория экспериментальных животных
м.к./мл	– микробных клеток в мл
мкл	– микролитр
МПК	– минимальная подавляющая концентрация
МСР	– метод серийных разведений
МФА	– метод флуоресцирующих антител
н/к	– накожно
НКС	– нормальная кроличья сыворотка
НКС	– нормальная кроличья сыворотка
ОСО	– отраслевой стандартный образец
п.н.	– пар нуклеотидов
п/к	– подкожно
ПА	– питательный агар
ПБ	– питательный бульон
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РДСК	– реакция длительного связывания комплемента
РНАг	– реакция нейтрализации антигена
РНат	– реакция нейтрализации антител
РПГА	– реакция пассивной гемагглютинации
РСК	– реакция связывания комплемента
РТПГА	– реакция торможения пассивной гемагглютинации
СЕ	– сывороточная единица
т.п.н.	– тысяч пар нуклеотидов
УФ	– ультрафиолет
ФР	– физиологический раствор
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота

## Меры предосторожности при работе с культурой возбудителя бруцеллёза

Возбудитель бруцеллёза относится к ПБА II группы, поэтому при работе с культурой возбудителя бруцеллёза следует соблюдать требования биологической безопасности. Работа со штаммами бруцелл является одной из наиболее опасных. С культурами этого микроорганизма и материалом, содержащим его, следует обращаться с осторожностью. Рекомендуется все манипуляции с живыми культурами бруцелл проводить только в боксах микробиологической безопасности (БМБ) или в помещениях с приточно-вытяжной вентиляцией в полном противочумном костюме. Обеззараживание объектов, инфицированных возбудителем бруцеллёза, осуществлять автоклавированием: 0,15 МПа,  $126 \pm 2$  °С, экспозиция 60 мин. Петли, шпатели обеззараживать на огне. БМБ дезинфицировать парами формальдегида с последующей дезактивацией парами аммиака.

Работу с вирулентными культурами, особенно с *B. melitensis*, следует свести до минимума, там, где возможно, заменить их авирулентными штаммами.

Общие рекомендации по соблюдению мер безопасности при работе с патогенными микроорганизмами даны в санитарно-эпидемиологических требованиях по профилактике инфекционных болезней (СанПиН 3.3686-21).

## 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЁЗА

Бруцеллез – зоонозное инфекционно-аллергическое заболевание, при котором основным источником инфекции для людей являются больные сельскохозяйственные животные.

Согласно современной классификации микроорганизмов, возбудитель бруцеллёза относится к роду *Brucella*, который входит в семейство *Brucellaceae* порядка *Rhizobiales* класса *Alphaproteobacteria*. По международной классификации род *Brucella* состоит из 12 самостоятельных видов, различающихся по генетическим, биохимическим, антигенным и вирулентным характеристикам: *B. melitensis* (3 биовара; преимущественно поражает коз и овец, возможна миграция на крупный рогатый скот и свиней), *B. abortus* (7 биоваров; преимущественно вызывает заболевания у крупного рогатого скота), *B. suis* (5 биоваров; поражает свиней, зайцев, северных оленей, грызунов), *B. neotomae* (выделяется от пустынной кустарниковой крысы), *B. ovis* (поражает овец), *B. canis* (поражает собак), *B. ceti* (выделяются от китообразных), *B. pinnipedialis* (выделяются от ластоногих), *B. microti* (выделяются от серой полевки), *B. inopinata* (основной хозяин не установлен), *B. papionis* (бабуины), *B. vulpis* (обыкновенная рыжая лисица).

Заболевания людей преимущественно вызывают *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* биовары 1–4, реже *B. canis*, *B. ceti* и *B. pinnipedialis*.

Бруцеллы обладают высокой инвазивностью и могут проникать через неповрежденные слизистые и микротравмы кожных покровов. Они относятся к внутриклеточным паразитам, живут и размножаются внутри клеток ретикулоэндотелиальной системы, но могут также находиться и внеклеточно. Микроб проникает в организм через слизистые оболочки пищеварительного тракта, половых и дыхательных путей, конъюнктиву, а также через кожные покровы.

Основными источниками инфекции для людей при бруцеллёзе являются больные животные. В бытовых условиях отмечается чаще контактный путь заражения. Больной бруцеллёзом человек, как источник инфекции, опасности практически не представляет, однако, отмечались редкие случаи инфицирования при пересадке костного мозга, переливании крови и половым путем.

Бруцеллез у людей протекает в виде системного заболевания с вовлечением в процесс многих органов и систем и широким спектром иногда слабо выраженных симптомов. Заболевание начинается, как правило, с острой лихорадки с неспецифическими гриппоподобными проявлениями, склонно к хронизации и появлению осложнений в виде артритов, спондилитов, эндокардитов, менингитов, нейропатии, васкулитов, нефритов, лимфоаденопатии.

### **Культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства возбудителя бруцеллёза**

Морфологически все виды и биовары бруцелл не отличаются друг от друга. Они имеют вид мелких нежных палочек овоидной или слегка удлинённой формы. При сравнительном изучении морфологии бруцелл в S-форме в электронном микроскопе клетки *B. melitensis* преимущественно имеют кокковидную форму, *B. abortus* и *B. suis* – палочковидную. Размер бруцелл кокковидных форм 0,3–0,6 мкм, палочковидных – 0,6–2,5 мкм. Расположение бруцелл в препарате чаще всего беспорядочное, отмечается более или менее выраженный полиморфизм. Бруцеллы неподвижны, спор не образуют, при определенных условиях (воздействие специфическим бактериофагом, выращивание на средах с добавлением 10 % иммунной сыворотки и др.), формируют капсулу. Они грамотрицательны, при окраске по методу Козловского – розового цвета. Оптимальной температурой культивирования бруцелл является 37 °С, максимальный рост наблюдается при pH 6,8–7,2.

Бактериоскопию бруцелл в L-форме осуществляют с помощью светового микроскопа с фазово-контрастным устройством. Бруцеллы в L-форме в той или иной мере утрачивают клеточную стенку, поэтому при окрашивании препаратов получаются различные результаты. На начальных этапах L-трансформации отмечено слипание клеток, образование конгломератов, появление увеличенных изогнутых палочек, клеток бруцелл раздутых и неправильной формы, сферических клеток, в которых более плотные участки выглядят в виде полуколец или колец с просветлением в центре, на более поздних этапах L-трансформации в поле зрения много увеличенных палочковидных и овоидных клеток, имеются клетки в виде темных полуколец или запятых, колец и овалов, нитевидных форм различных размеров. L-трансформанты грамотрицательны, либо не окрашиваются.

Отдельные биовары *B. abortus* и некоторые представители *B. ovis*, в отличие от *B. suis* и *B. melitensis*, в первых генерациях требуют для своего роста повышенного (5–10 %) содержания CO<sub>2</sub>.

Культуры бруцелл, особенно первые генерации, характеризуются замедленным темпом роста на питательных средах, поэтому посевы инфицированного материала от человека и животных инкубируют при 37 °С в течение 10–30 суток. Лабораторные штаммы при пересевах развиваются быстрее, но и у них фаза роста в среднем составляет 18–30 часов. Бруцеллы хорошо растут на печеночных средах, агаре Мартена, Альбими, эритрит-агаре, сухом агаре «Д», на мясопептонном агаре с добавлением глюкозы и глицерина.

Молодые колонии бруцелл в S-форме на агаре выпуклые, круглые с ровными краями и гладкой поверхностью, при просмотре в падающем свете – белесоватые, в проходящем – янтарно-желтые. Величина колоний может в значительной степени колебаться. На 7–10 сутки выращивания колонии становятся крупными, сохраняют прозрачность, уплощаются. Под микроскопом колонии гомогенные с нежной зернистостью в центре. Культуры бруцелл при посеве штрихом на скошенный агар образуют нежный, прозрачный, блестящий, влажный, постепенно грубеющий налет маслянистой консистенции. При выращивании бруцелл в бульоне наблюдается равномерное помутнение среды. В старых бульонных культурах отмечается пристеночный кольцевидный рост. Культуры бруцелл при длительном культивировании на плотных и, особенно, жидких питательных средах и при неблагоприятных условиях роста диссоциируют. Известны R-шероховатые, L- и промежуточные формы колоний. При диссоциации у культур изменяются агглютинабельные, биохимические свойства, вирулентность и антигенная структура (табл. 1).

Выделенные культуры предварительно проверяют на наличие признаков диссоциации, изучая рост в бульоне, форму колоний, эмульгируемость в физиологическом растворе, прижизненную окраску колоний кристаллическим фиолетовым, термопреципитацию и в пробе с трипафлавином.

С диссоциированными культурами проводят дополнительные исследования, подтверждающие их принадлежность к роду *Brucella*. К ним относят ПЦР, ориентировочную реакцию агглютинации с сыворотками анти-R и анти-L (в настоящее время существуют только экспериментальные серии сывороток), или посев выделенной культуры на глюкозо-глицериновом агаре с хлористым кальцием, на котором вокруг роста культуры бруцелл, независимо от состояния диссоциации, образуется белая зона (прил. 1.10).

Бруцеллы продуцируют каталазу, уреазу, гиалуронидазу, пероксидазу, амилазу, липазу, фосфатазу, цитохромоксидазу и некоторые другие ферменты.

Таблица 1

**Характеристика бруцелл в S-, R-, и L-формах**

Признаки	S-форма	R-форма	L-форма
Рост на агаре	Нежный, влажный	Более грубый	Голубовато-серый налет
Морфология колоний	Круглые, выпуклые, правильно контурированные, гомогенные или нежно зернистые, поверхность гладкая, блестящая	Круглые, менее выпуклые, иногда с ровными краями, грубозернистые, поверхность неровная, матовая	Мелкие до 2–3 мм круглые колонии, часто врастают в агар, слизистые или крошковидные, могут иметь вид яичницы – плотный центр и более светлые края
Рост в бульоне	Гомогенный, без просветления	Зернистый, хлопчатый с осадком и просветлением	Крупинки в толще бульона, со временем увеличивающиеся в размерах
Суспендируемость в физиологическом растворе	Взвесь равномерная, стойкая	Взвесь хлопчатая, нестойкая	Плохая суспендируемость, взвесь крошковидная или тяжами
Агглютинабельность с S-сывороткой	До титра сыворотки	Неспецифическая в физиологическом растворе	У стабильных L-форм отсутствует
Вирулентность	Высокая	Часто резко ослабленная	Низкая
Проба на диссоциацию	Отрицательная	Положительная	Положительная

При росте на питательных средах в процессе метаболизма бруцеллы образуют сероводород, интенсивность выделения которого у отдельных видов и биоваров выражена по-разному.

Бруцеллы чувствительны к бактериостатическому действию некоторых красителей (тионин, основной фуксин). Установлено, что красители вступают в связь с питательным субстратом среды, изменяют ее, и среда становится неблагоприятной для роста культуры. Различные виды и биовары бруцелл обладают разной степенью чувствительности к анилиновым краскам.

Известны несколько типов вирулентных бруцеллёзных бактериофагов (Tb, Wb, Fi, BK<sub>2</sub>), сходных по морфологии, серологии и спектру литического действия.



Бруцеллы обладают выраженными антигенными свойствами. Установлено, что количество специфических антигенов А и М, присущих бруцеллам в S-форме, у каждого вида неодинаково. У *B. melitensis* количественное отношение А антигена к М 1:20, а у *B. abortus* – 20:1. Различие в антигенной структуре бруцелл удастся выявить с помощью моноспецифических сывороток антимерелитензис и антиабортус (табл. 2). На основании изучения биохимической активности и антигенной структуры бруцелл исследователи предлагают различные тесты как для идентификации рода бруцелл, так и для дифференциации отдельных видов и биоваров (табл. 2).

Таблица 2  
Дифференциальные свойства видов и биоваров рода *BRUCELLA*

Вид	Биовар	Потребность в CO <sub>2</sub>	Продукция H <sub>2</sub> S			Рост на средах с красками			Агглютинабельность с моноспецифическими сыворотками			Лизис фагами в ДРТ			Основной хозяин
			тионин	основ. фуксин		А	М	Р	ТБ	Wb	Fi	Bk2			
<i>B. abortus</i>	1	(+)	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+		Крупный рогатый скот	
	2	(+)	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+			
	3 <*>	(+)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+			
	4	(+)	+	-	(+) <***>	-	+	-	+	+	+	+			
	5	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+			
	6 <*>	-	(+)	+	+	+	-	-	+	+	+	+			
	9	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+			
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-	-	(-)	-	+	Овцы, козы		
	2	-	-	+	+	+	-	-	-	(-)	-	+			
	3	-	-	+	+	+	+	-	-	(-)	-	+			

<i>B. suis</i>	1	-	+	+	(-) <***>	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи
	2	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи, зайцы
	3	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	-	+	+	±	Олени
	5	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	±	Мышевидные грызуны
<i>B. neotomae</i>		-	+	-	-	+	-	-	±	+	+	+	Пустынные кустарниковые крысы
<i>B. ovis</i>		+	-	+	(-)	-	-	+	-	-	-	-	Овцы
<i>B. canis</i>		-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Собаки
<i>B. pinnipedialis</i>		+	-	+	+	+	±	-	(-)	(+)	+	+	Ластоногие
<i>B. ceti</i>		-	-	+	+	+	±	-	(-)	(+)	+	+	Китообразные
<i>B. microti</i>		-	-	+	+	-	+	-	-	+	X	X	Серая полевка
<i>B. inopinata</i>		-	+	+	+	-	+	-	P	X	X	X	Не установлен
<i>B. papionis</i>	X Бабуины												
<i>B. vulpis</i>	X Обыкновенная рыжая лисица												

**Примечание:** «+» – признак определяется у всех представителей, «-» – признак отсутствует у всех представителей, «±» – признак выявляется у некоторых штаммов, «(+) – большинство культур имеют данный признак, «(-) – большинство культур не имеют данный признак, P – неполный лизис фагом, X – сведения отсутствуют; <\*> – для более точной дифференциации *B. abortus* биовар 3 и 6 используется тионин 1 : 25000 (биовар 3+, биовар 6-); <\*\*\*> – некоторые штаммы этого биовара (биовар 4) ингибируются основным фуксинумом; <\*\*\*\*> – некоторые штаммы могут быть резистентны к основному фуксинуму, пиронину и сафронину O.

Бруцеллы обладают устойчивостью к воздействию низких температур и малоустойчивы к высокой температуре. В жидкой среде они погибают при 60 °С через 30 минут, при 80 °С – через 5 минут, при кипячении – моментально. На бруцеллы губительно действует прямой солнечный свет. Различные дезинфицирующие вещества – 2% раствор карболовой кислоты, 3% раствор лизола и перекиси водорода, 0,2% раствор хлорной извести, 0,5–3,0% раствор хлорамина, 1,0–4,0% формалина – убивают их в течение нескольких минут.

## ЗАНЯТИЕ 1 (4 часа)

### 1.1. Изучение культурально-морфологических и агглютинабельных свойств *B. abortus* 19 ВА.

- 1.1.1. Изучите характер роста культуры на скошенном агаре.
- 1.1.2. Изучите морфологию колоний на пластинчатом агаре.
- 1.1.3. Изучите характер роста культуры бруцелл в бульоне Хоттингера.
- 1.1.4. Изучите морфологию микробов в мазках.
  - 1.1.4.1. Приготовьте 2 мазка из бульонной культуры, зафиксируйте; один мазок окрасите по Граму, второй обработайте люминесцирующей бруцеллёзной сывороткой (прил. 5.3).
- 1.1.5. Поставьте ориентировочную реакцию агглютинации с бруцеллёзной агглютинирующей сывороткой (прил. 5.1).

### 1.2. Дифференциация видов бруцелл (демонстрация).

- 1.2.1. Бактериостатический метод (прил. 6.2).
- 1.2.2. Образование сероводорода (прил. 6.3).
- 1.2.3. Лизис фагом «Тв» (прил. 6.4).
- 1.2.4. Реакция агглютинации с моноспецифическими сыворотками (прил. 6.5).
- 1.2.5. Уреазная активность (прил. 6.6).

#### Примечание:

- ознакомьтесь с приложением 1.

Занятие 1.3 проводится в виде объяснения и демонстрации тестов дифференциации видов и биоваров рода *Brucella*.

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

### Материал и оборудование

48-часовая культура *B. abortus* 19ВА на:

пробирки со скошенным эритроит агаром .....	1 пробирка
бульон Хоттингера .....	1 пробирка
бруцеллёзная агглютинирующая поливалентная сыворотка 1 : 25 ...	0,5 мл
бруцеллёзная люминесцирующая сыворотка .....	0,2 мл
люминесцентный микроскоп .....	

Для демонстрации тестов дифференциации на группу курсантов выдают посевы культур *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* на:

Альбими агар .....	по 1 чашке
Альбими агаре с:	
основным фуксином 1 : 50 000 .....	по 1 чашке
тионином 1 : 50 000 .....	

сыворотно-декстрозный агар с индикаторной бумагой на H <sub>2</sub> S и П-образным патрубком	по 1 пробирке
среде Кристенсена	1 пробирка
проба с фагом «Тб» на агаре Мартена	по 1 чашке
реакция агглютинации объемным методом с сывороткой антиабортус	1 набор
реакция агглютинации объемным методом с сывороткой антимелитензис	1 набор

## ЗАНЯТИЕ 2 (3 часа)

### 1.1. Изучение культурально-морфологических и агглютинабельных свойств *B. abortus* 19 ВА

#### 1.1.1. Изучение признаков изменчивости культур бруцелл.

- 1.1.1.1. Изучите характер роста S- и R-форм бруцелл на пластинчатом агаре и в бульоне.
- 1.1.1.2. Изучите культуры в ориентировочной реакции агглютинации (ОРА) с бруцеллёзной агглютинирующей сывороткой в разведении 1:25 (контроль ОРА с физиологическим раствором) (прил. 5.1).
- 1.1.1.3. Поставьте реакцию с трипафлавином (прил. 4.1).
- 1.1.1.4. Поставьте реакцию термореципитации (прил. 4.2). Предварительно учтите результаты через 2 часа, окончательно через 24 часа.
- 1.1.1.5. Изучите диссоциацию штаммов бруцелл методом Уайта-Вильсона (прил. 4.3).

#### Примечание:

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

### Материал и оборудование

Изолированные колонии на пластинчатом агаре в S- и R-форме <i>B. abortus</i> 19 ВА	1 чашка
Двухсуточный рост на бульоне Хоттингера в S-форме	1 пробирка
Двухсуточный рост на бульоне Хоттингера в R-форме	1 пробирка
На скошенном эритрит агаре в S-форме	1 пробирка
На скошенном эритрит агаре в R-форме	1 пробирка
Бруцеллезная агглютинирующая поливалентная сыворотка 1 : 25	0,5 мл
Физиологический раствор	5,0 мл
Трипафлавина раствор 1 : 500	0,5 мл

---

Кристаллический фиолетовый (раствор 1 : 2000) .....	5,0 мл
Пробирка стерильная .....	2 шт.
Чашка Петри .....	1 шт.
Пипетка стерильная на 5,0 мл .....	2 шт.
Пипетка пастеровская .....	2 шт.
Водяная баня на 90 °С .....	1 шт.

## 2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЁЗА

Разнообразные клинические проявления бруцеллёза приводят к необходимости широкого применения лабораторных методов исследования: бактериологического, биологического, серологического, аллергологического и молекулярно-генетического.

Индикация возбудителя бруцеллёза представляет собой трудоемкий процесс и не всегда дает положительный результат.

При лабораторном исследовании обязательно учитывают клинические, эпидемиологические и эпизоотологические данные (прил. 11).

Работа по выделению и дифференциации бруцелл из любого исследуемого материала должна проводиться в строгом соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями (СанПиН 3.3686-21).

### Бактериологический метод

При исследовании на бруцеллёз в лабораторию поступает патологический материал от больных людей (кровь, мокрота, костный мозг, спинномозговая жидкость, гной, суставная жидкость, пунктат из лимфотических узлов и селезенки, желчь, моча, грудное молоко), сельскохозяйственных животных (абортированный плод, лимфатические узлы, паренхиматозные органы, кровь, моча, молоко, молочные продукты) и различные объекты внешней среды (вода, навоз). Материал для исследования забирают в стерильную посуду.

Для выделения культур бруцелл всех видов используют печеночные и мясопептонные агары в различных модификациях, агар Альбими, сухие питательные среды – агар «Д» и эритрит агар (прил. 1).

Посев материала производят на качественные и предварительно проверенные питательные среды (прил. 2) и выращивают при 37 °С в аэробных условиях и с повышенным (5–10 %) содержанием углекислого газа.

Исследование крови необходимо проводить во время лихорадочного состояния больного до лечения антибиотиками, так как в этот период наблюдается наибольший процент выделения культур. Кровь в количестве не менее 10 мл стерильно берут из локтевой вены и засевают по 5 мл в два флакона среды Кастанеда (прил. 1.7). Начиная с четвертого дня, посевы ежедневно просматривают и при отсутствии роста культуры поверхность агара орошают бульоном путем осторожного

покачивания флакона. При положительном результате на поверхности агара появляются колонии бруцелл. Если в течение месяца роста бруцелл не обнаруживают, то делают контрольный высеv из бульона среды Кастанеда на твердую питательную среду.

При обследовании людей на бруцеллёз для удобства доставки флаконов с кровью на гемокультуру можно пользоваться транспортной жидкой средой, которую готовят заранее и хранят в лаборатории в течение полугода (прил. 1.11). Кровь доставляют в лабораторию в транспортной среде, засевают на среду Кастанеда и исследуют по общепринятой схеме.

Бруцеллы можно выделить из костного мозга, мочи, спинномозговой жидкости, грудного молока, желчи, мокроты, трупного материала и т. д. Исследуемый материал по 0,1 мл засевают на пластинки питательного агара и по 5–10 мл – на жидкие питательные среды. Для задержки роста посторонней микрофлоры при исследовании загрязненного материала к среде добавляют генцианвиолет (1 : 200 000) или антибиотики (пенициллин 0,25 ед./мл и стрептомицин 0,05 ед./мл).

Особого внимания заслуживает получение культуры из молока сельскохозяйственных животных. Забор молока у овец, коров, верблюдов и коз рекомендуется проводить путем сдаивания его последних порций из каждого соска вымени по 10 мл в стерильную посуду. Если исследовать молоко в течение первых суток не удастся, то его консервируют путем добавления сухой борной кислоты 1 %, генцианвиолета 1 : 25 000 или малахитгрюна 1 : 500 000. Для исследования молока из больших емкостей забирают 100 мл верхнего слоя, затем перемешивают и набирают еще 100 мл.

Лучшие результаты дает посев сливок, полученных центрифугированием молока при 2,5–3 тыс. об/мин в течение 3–5 мин или путем отстаивания в течение одних суток в холодильнике. Сливки в количестве 0,1–0,2 мл засевают на твердую питательную среду с подавителем посторонней микрофлоры (4–6 пробирок на 1 пробу).

Недостатком бактериологического метода является его длительность, связанная с медленным ростом возбудителя. Однако метод считается самым достоверным, т. к. выделение бруцелл является неопровержимым доказательством бруцеллёзной инфекции. Отрицательные результаты бактериологического исследования не дают права для заключения об отсутствии заболевания.

### **Биологический метод**

Для выделения бруцелл из материала, загрязненного посторонней микрофлорой или содержащего малые концентрации возбудителя, используют в качестве биологической пробы морских свинок (массой

250–300 г) или белых мышей (массой 17–18 г). Исследуемый материал в количестве не более 0,5 мл вводят подкожно в паховую область белой мыши и 1 мл – морской свинке.

Вскрытие белых мышей производят через 20–25 дней, а морских свинок – через 30–35 дней после введения материала. Перед вскрытием у свинок берут кровь из сердца для исследования сыворотки в реакции агглютинации. Для посевов у морских свинок берут лимфатические узлы (паховый, подчелюстной, шейный, парааортальный), кусочки селезенки, печени, костный мозг, кровь, мочу; у белых мышей – лимфатические узлы (паховый, аксиллярный, парааортальный, подчелюстной), кусочки селезенки и печени. Лимфатические узлы, кусочки печени и селезенки помещают в стерильную чашку. Костный мозг извлекают пипеткой из расчеченной бедренной кости. Посевы крови из сердца, мочи и костного мозга производят стерильной пипеткой непосредственно на питательную среду (агар и бульон). Лимфатические узлы и органы перед посевом надсекают ножницами, берут стерильной деревянной палочкой, вносят первоначально в пробирку с агаром, раздавливают и тщательно втирают материал в поверхность питательной среды. Затем остатки посевного материала переносят в пробирку с бульоном. Палочка должна быть длиной 25–30 см, диаметром 4–5 мм, хорошо отструганная, с несколько заостренным концом. После использования ее погружают на 1 час в дезраствор.

Все посевы дублируют (часть помещают в условия повышенного содержания  $\text{CO}_2$ ), выдерживают при 37 °С в термостате до 30 дней. Для предотвращения высыхания питательных сред пробирки заливают парафином или закрывают резиновыми колпачками.

Посевы просматривают каждые 3–4 дня. Из помутневших бульонов делают высев в пробирки со скошенным агаром. Колонии бруцелл на пластинчатом агаре становятся видимыми на 5–7 сутки, иногда позднее. По истечении 30 дней наблюдение прекращают. Если за это время рост не появился, посевы уничтожают, а результаты бактериологического исследования считают отрицательными.

Результат оценивают положительно при выделении хотя бы одной колонии бруцелл. Идентификацию возбудителя бруцеллёза проводят по:

- характеру роста культуры на плотных питательных средах;
- морфологии микроба в мазках, окрашенных по Граму, Козловскому;
- агглютинации со специфической бруцеллёмной сывороткой на стекле и объемным методом;
- свечению на 3–4+ культур, обработанных бруцеллёмной люминесцирующей сывороткой.

Культуры предварительно проверяют на наличие признаков диссоциации одним из перечисленных выше методов.



Дифференциации (определение видов и биоваров) подлежат культуры в S-форме после идентификации.

Подкомитетом по таксономии бруцелл Международного комитета номенклатуры бактерий и Объединенным комитетом экспертов FAO/ВОЗ по бруцеллёзу в 1972 г. были определены единые тесты для проведения идентификации и дифференциации бруцелл для всех стран мира.

О видовой принадлежности культуры бруцелл и биоварах судят на основании результатов комплексного изучения отношения выделенных культур к условиям выращивания (в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при повышенном содержании углекислого газа или в обычных аэробных условиях), чувствительности к анилиновым краскам (бактериостатическим методом), способности образовывать сероводород, чувствительности к бруцеллёмному фагу «Тb», агглютинабельных свойств культур с использованием монорецепторных сывороток (антиабортус и анти-мелитензис) и дополнительного исследования уреазной активности, вирулентности и других признаков. Дифференциацию бруцелл на виды и биовары проводят в параллельных опытах испытуемых с референтными штаммами всех трех видов бруцелл (табл. 2).

### 3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ И АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА БРУЦЕЛЛЁЗ

Серологические реакции и аллергическая проба являются общедоступными методами и применяются для диагностики бруцеллёза наряду с бактериологическим и биологическим методами.

В случае малой обсемененности пробы и отрицательных результатов, полученных при посеве исследуемого материала на питательные среды и заражении лабораторных животных, серологический метод может быть единственным, позволяющим диагностировать бруцеллёз.

В зависимости от целей исследования используют те или иные серологические методы.

При проведении эпидемиологического исследования в очагах применяют реакцию агглютинации (РА) пластинчатую (Хеддльсона) и объемную (Райта), реакцию Кумбса, реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию длительного связывания комплемента (РДСК), реакцию пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА или РНГА), реакцию нейтрализации антител (РНАТ), кожную аллергическую пробу, иммуноферментный анализ (ИФА). Перед профилактической вакцинацией населения можно ограничиться постановкой пластинчатой реакции агглютинации (Хеддльсона) и кожной аллергической пробой.

Для диагностики острого и подострого бруцеллёза ставят реакцию Хеддльсона, Райта, РПГА и Кумбса. При диагностике хронического бруцеллёза и проведении диспансерного наблюдения за переболевшими рекомендуют наряду с реакциями Хеддльсона и Райта, РПГА, реакцию Кумбса и аллергическую пробу (Бюрне).

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

В ранние сроки от начала заболевания (первые 6 месяцев) диагностическая ценность серологического метода выше, чем аллергологического. Серологические реакции в этот период оказываются положительными почти в 95 % случаев. По мере удлинения срока заболевания процент положительных серологических реакций (реакция агглютинации,

РПГА) начинает снижаться. При проведении обследования необходимо учитывать, что высокие титры антител всегда указывают на наличие инфекции, антитела в низких титрах или их полное отсутствие не исключают возможности заболевания. В связи с этим рекомендуется проводить повторные исследования с интервалом 1–2 недели, особенно при подозрении на острую форму бруцеллёза.

Для постановки диагноза бруцеллёза у крупного рогатого скота применяют серологические и аллергологические методы.

Обследование начинают с постановки роз-бенгал пробы (РБП). Сыворотки, с которыми получена положительная РПБ, исследуют РА в Райта, РСК (РДСК), РПГА для установления титра агглютининов и наличия комплементсвязывающих антител. Исследование проводят двукратно с промежутком в 30 дней.

### ЗАНЯТИЕ 3 (4 часа)

#### 2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека

2.1.1. Бактериологическое исследование крови больного человека.

2.1.1.1. Посейте кровь больного по 4 мл в 2 флакона накопительной среды Кастанеда (1 флакон поместите в CO<sub>2</sub>-инкубатор, прил. 3.1).

2.1.1.2. Посейте кровь больного по 0,1 мл на 4 пробирки скошенного питательного агара (2 пробирки поместите в CO<sub>2</sub>-инкубатор). Все посевы выращивайте при 37 °С.

2.1.2. Биологическое исследование крови больного человека.

2.1.2.1. Введите морской свинке подкожно 1,0 мл крови больного человека.

#### Примечание:

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).
- перед работой познакомьтесь со схемой бактериологического исследования на бруцеллёз (прил. 11);
- пункт 2.1.2 выполняйте в лаборатории экспериментальных животных;
- заполните журналы ф. 1 и 3.

#### Материал и оборудование

Кровь больного человека . . . . . 10 мл

Кастанеда среда . . . . . 2 фл.

Эритрит агар рН 7,2 скошенный . . . . . 4 пробирки

Пипетка стерильная на 1,0 мл	1 шт.
Пипетка стерильная на 5,0 мл	1 шт.
Шприц одноразовый 1,0 мл	1 шт.
Морская свинка	1 шт.

## 2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза у крупного рогатого скота

### 2.2.1. Бактериологическое исследование молока.

2.2.1.1. Отцентрифугируйте молоко при 3 тыс. об/мин в течение 3–5 мин.

2.2.1.2. Соедините сливки и осадок.

2.2.1.3. Посейте по 0,1 мл смеси сливок и осадка на 4 пробирки агара с генцианвиолетом или 4 пробирки агара с антибиотиками (2 засеянные пробирки поместите в CO<sub>2</sub>-инкубатор) (прил. 3.1).

### 2.2.2. Биологическое исследование молока.

2.2.2.1. Введите подкожно морской свинке 1,0 мл смеси сливок и осадка.

#### Примечание:

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).
- центрифугирование молока проводите в БМБ III класса;
- п. 2.2.2.1 выполняйте в лаборатории экспериментальных животных;
- заполните журналы ф. 1 и 3.

### Материал и оборудование

Молоко для исследования	5 мл
Эритрит агар с генцианвиолетом (1 : 200 000) скошенный	4 пробирки
или эритрит агар с пенициллином 0,25 ед./мл	
и стрептомицином 0,05 ед./мл скошенный	4 пробирки
Пробирка центрифужная на 5 мл	2 шт.
Пипетка бактериологическая стерильная на 5,0 мл	2 шт.
Пипетка пастеровская	2 шт.
Шприц одноразовый 1,0 мл	1 шт.
Морская свинка	1 шт.
CO <sub>2</sub> -инкубатор	1 шт.
Центрифуга	1 шт.

## ЗАНЯТИЕ 4 (3 часа)

### 3.1. Серологический диагноз бруцеллёза у человека

3.1.1. Поставьте с исследуемыми сыворотками пластинчатую реакцию агглютинации Хеддльсона (прил. 7.1).

3.1.2. Исследуйте сыворотку больного, давшую положительный результат в реакции Хеддльсона, в реакции Райта (прил. 7.2). Учтите результат реакции через 24 часа и проведите исследование сыворотки в реакции Кумбса (прил. 7.2.1).

3.1.3. Поставьте с исследуемыми сыворотками РПГА (прил. 7.3, 7.4), учтите результат через 2 и 24 часа.

#### Примечание:

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

### Материал и оборудование

Сыворотка крови больного бруцеллёзом	5,0 мл
Сыворотка крови здорового человека	5,0 мл
Диагностикум бруцеллёзный цветной единый цельный (30 млрд./мл)	1,0 мл
Диагностикум бруцеллёзный цветной, разведенный в 10 раз (3 млрд./мл)	3,5 мл
Диагностикум бруцеллёзный эритроцитарный	0,5 мл
НКС 1 : 100	5,0 мл
Физиологический раствор	10,0 мл
Пипетка на 5,0 мл	1 шт.
Пипетка на 1,0 или 2,0 мл	3 шт.
Микропипетка на 0,1 мл	3 шт.
Пробирка бактериологическая	12 шт.
Пластина полистироловая	1 шт.
Чашка Петри	1 шт.
Микротитратор Такачи	1 шт.
Водяная баня	1 шт.

## ЗАНЯТИЕ 5 (4 часа)

### 3.2. Серологический диагноз бруцеллёза у крупного рогатого скота

3.2.1. Исследование сыворотки крови животных.

3.2.1.1. Поставьте с исследуемыми сыворотками РБП (прил. 7.5).

- 3.2.1.2. Исследуйте сыворотку крови животного с положительной реакцией Роз-Бенгал в объемной реакции Райта (прил. 7.2). Учтите реакцию агглютинации через 24 часа.

**Примечание:**

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

**Материал и оборудование**

Сыворотка крови больного животного	2,0 мл
Сыворотка крови здорового животного	2,0 мл
Диагностикум цветной единый разведенный в 10 раз (3 млрд./мл)	3,5 мл
Роз-бенгал антиген	0,1 мл
Физиологический раствор забуференный	5,0 мл
Пробирка бактериологическая	12 шт.
Пипетка бактериологическая на 5,0 мл	1 шт.
Пипетка бактериологическая на 1,0–2,0 мл	3 шт.
Чашка Петри	1 шт.

3.2.2. Исследование молока на бруцеллёз

- 3.2.2.1. Поставьте с цельным молоком кольцевую реакцию с цветным антигеном Триленко (прил. 8.1).
- 3.2.2.2. Исследуйте снятое молоко пластинчатой реакцией агглютинации (прил. 8.2).
- 3.2.2.3. Получите молочную сыворотку добавлением 2–3 капель сычужного фермента. Поставьте с молочной сывороткой пластинчатую реакцию агглютинации (прил. 8.3).

**Примечание:**

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

**Материал и оборудование**

Молоко цельное	2,0 мл
Молоко снятое (обезжиренное)	5,0 мл
Бруцеллезный цветной единый цельный диагностикум (30 млрд./мл)	1,0 мл
Цветной цельный антиген Триленко	0,5 мл
Физиологический раствор	1,0 мл

Сычужный фермент 10%-й .....	0,5 мл
Пипетка на 1,0 млм .....	5 шт.
Микропипетка .....	2 шт.
Чашка Петри .....	2 шт.
Водяная баня 37–39 °С .....	1 шт.

## ЗАНЯТИЕ 6 (2 часа)

### 2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека

2.1.1. Исследуйте посевы крови на накопительной среде Кастанеда и на скошенном агаре.

2.1.2. Отберите подозрительные на рост бруцелл колонии, приготовьте мазки, окрасьте по Граму и просмотрите.

2.1.3. Поставьте ОРА на стекле с бруцеллёзной агглютинирующей сывороткой 1:25 и подозрительными на рост бруцелл колониями (прил. 5.1).

2.1.4. Пересейте 3–4 колонии, агглютинирующиеся бруцеллёзной сывороткой, на пробирки скошенного питательного агара, поместите в термостат на 48 часов при 37 °С.

#### Примечание:

- при работе с культурой и материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

- при отсутствии роста на среде Кастанеда, легким покачиванием флакона смочите поверхность агара бульоном и продолжайте выращивание при тех же условиях.

### Материал и оборудование

Эритрит агар pH 7,0 скошенный .....	4 пробирки
Сыворотка бруцеллёзная агглютинирующая 1 : 25 .....	0,5 мл
Физиологический раствор pH 6,8–7,2 .....	0,5 мл

### 2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза крупного рогатого скота

2.2.1. Бактериологическое исследование молока.

2.2.1.1. Просмотрите посевы на средах с ингибиторами постороннего роста, выращиваемые в аэробных условиях и в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

2.2.1.3. С колониями, подозрительными на рост бруцелл, поставьте ОРА с бруцеллёзной агглютинирующей сывороткой 1:25.

2.2.1.4. Колонии, агглютинирующиеся бруцеллёзной сывороткой, отсейте на 4 пробирки скошенного питательного агара, инкубируйте посеvy при 37 °С в течение 48 часов.

**Примечание:**

- при работе с культурой и материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).
- при отсутствии подозрительного роста все посеvy поместите при тех же условиях для подращивания.
- заполните журнал ф. 3.

**Материал и оборудование**

Эритрит агар pH 7,0 скошенный .....	4 пробирки
Сыворотка бруцеллёзная агглютинирующая 1 : 25 .....	0,5 мл
Физиологический раствор pH 6,8–7,2 .....	0,5 мл

**ЗАНЯТИЕ 7 (4 часа)**

**2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека**

2.1.1. Идентификация культуры, выделенной из крови больного человека.

2.1.1.1. Проверьте культуру на чистоту роста и изучите морфологию микроба в мазках с окраской по Граму; исследуйте люминесцентно-серологическим методом (прил. 5.3).

2.1.1.2. Определите наличие признаков диссоциации в пробе с трипафлавином (прил. 4.1).

2.1.1.3. Поставьте ОРА с бруцеллёзной агглютинирующей сывороткой 1:25 (прил. 5.1).

2.1.1.4. Поставьте реакцию агглютинации объемным методом с бруцеллёзной агглютинирующей сывороткой до титра сыворотки (прил. 5.2), учтите реакцию через 24 часа.

2.1.2. Проведите дополнительное исследование культуры; изучите чувствительность выделенной культуры к антибиотикам: распределите на поверхности агара (Мюллера-Хинтона или АГВ) 3 мл расплавленного и остуженного до 45 °С полужидкого агара, содержащего 0,3 мл  $5 \times 10^7$  микроорганизмов в 1 мл, и после подсушивания поместите на поверхность агара диски с тетрациклином, стрептомицином, пенициллином, гентамицином. Результаты учтите через 48 часов инкубации при 37 °С (прил. 10).

2.1.3. Пересейте выделенную культуру на 2 пробирки питательного агара.



**Примечание:**

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).
- заполните журнал ф. 3.

**Материал и оборудование**

Триптафлавина раствор 1 : 500	1 мл
Бруцеллезная агглютинирующая сыворотка (1 : 25)	2 мл
Агар АГВ (Мюллера-Хинтона)	1 чашка
Агар эритрит рН 7,0 (скошенный)	2 пробирки
0,7%-й полужидкий агар	1 пробирка
Физиологический раствор	5 мл
Пробирка бактериологическая нестерильная	10 шт.
Пробирка бактериологическая стерильная	2 шт.
Пипетка стерильная на 5,0 мл	1 шт.
Диски с тетрациклином, стрептомицином, пенициллином, гентамицином	по 1 шт.
Чашка Петри	1 шт.

**2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза у крупного рогатого скота****2.2.1. Идентификация культуры, выделенной из молока.**

Работайте по плану занятия 7, п. 2.1.

**ЗАНЯТИЕ 8 (4 часа)****2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека**

Идентификация культуры, выделенной из крови больного.

2.1.1. Учтите результаты определения чувствительности культуры к антибиотикам по зонам задержки роста вокруг дисков антибиотиков и оценочной таблице.

2.1.2. Проведите дифференциацию культуры, выделенной из крови больного человека по полной схеме:

- бактериостатический метод: посейте одну стандартную 2 мм петлю 2 млрд./мл взвеси изучаемой культуры на чашки с агаром, содержащие тионин, фуксин и на Альбими агар (прил. 6.2);
- сероводородообразование: посейте одну стандартную петлю 2 млрд./мл взвеси микробов на скошенный агар, поместите в пробирку полоску индикаторной бумаги на сероводород (прил. 7.3);
- чувствительность к фагу «Тб»: поставьте пробу с фагом «Тб» (прил. 6.4). Фаголизис учтите через 24 часа инкубирования;

- реакция агглютинации с моноспецифическими сыворотками: поставьте развернутую реакцию агглютинации с выделенной культурой и с сыворотками антиабортус и антимиелитензис (прил. 6.5);
- уреазная активность: посейте изучаемую культуру на скошенном агаре Кристенсена (прил. 6.6).

**Примечание:**

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше)
- двухсуточную агаровую культуру, выделенную из крови, дифференцируйте параллельно с 48 ч культурами эталонных штаммов *B. abortus* 544, *B. melitensis* 164, *B. suis* 1330 первых биоваров;
- объекты с посевами запишите к *B. melitensis*;
- результаты расщепления мочевины на среде Кристенсена отмечайте в течение дня;
- учет тестов дифференциации проводите трижды в течение 6 дней;
- заполните журнал ф. 3.

### Материал и оборудование

Каждый курсант получает двухсуточные агаровые культуры референтных штаммов *B. abortus* 544, *B. melitensis* 16М, *B. suis* 1330

на скошенном агара	по 1 пробирке
Агар Альбими с тионином 1 : 50 000	1 чашка
Агар Альбими с фуксином 1 : 50 000	1 чашка
Агар Альбими рН 7,2	2 чашки
Сывороточно-декстрозный агар рН 7,2 скошенный	5 пробирок
Среду Кристенсена	5 пробирок
Физиологический раствор	10 мл
Полоски индикаторной бумаги на сероводород	6 шт.
Фаг «Тв» – РТД	0,2 мл
Сыворотку агглютинирующую антиабортус	3 мл
Сыворотку агглютинирующую антимиелитензис	3 мл
Пробирки бактериологические стерильные	4 шт.
Пробирки бактериологические нестерильные	14 шт.
Пипетки	
5 мл	1 шт.
2 мл	10 шт.
Пипетка пастеровская	1 шт.

## 2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза у крупного рогатого скота

Идентификация и дифференциация культуры, выделенной из молока.

Работайте согласно п. 2.1. См. план занятия, примечание, материалы и оборудование.

## ЗАНЯТИЕ 9 (2 часа)

### 2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека

Дифференциация культуры, выделенной из крови.

2.1.1. Учтите развернутые реакции агглютинации с моноспецифическими сыворотками антиабортус и антимиелитензис.

2.1.2. Отметьте результаты пробы с фагом «Тб».

2.1.3. Проведите окончательный учет уреазной активности культуры на среде Кристенсена.

#### Примечание:

- при работе с культурой строго соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).
- учет тестов дифференциации проводите в сравнении с эталонными штаммами.
- при слабом росте культуры в пробе с фагом «Тб» посеvy поместите при 37 °С еще на 24 часа.
- передайте пробирки с реакциями агглютинации и посеvy на среде Кристенсена на уничтожение.
- результаты изучения культур бруцелл впишите в рабочие тетради.
- заполните журнал ф. № 3.

### 2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза у крупного рогатого скота

Продолжение дифференциации культуры, выделенной из молока.

Культуру, выделенную из молока животных, дифференцируйте согласно п. 2.1 и примечанию к занятию.

#### Примечание:

- при работе с культурой строго соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

## ЗАНЯТИЕ 10 (2 часа)

### 2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека

2.1.1. Продолжение изучения культуры, выделенной из крови больного (1-я отметка тестов дифференциации).

2.1.1.1. **Бактериостатический метод** (прил. 6.2). Отметьте наличие роста культуры на средах с фуксином, тионином и на Альбими агаре.

2.1.1.2. **Сероводородообразование** (прил. 6.3). Измерьте почерневшую часть индикаторной бумаги, замените полоску на новую.

## 2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза у крупного рогатого скота

2.2.1. Продолжение дифференциации культуры, выделенной из молока (1-я отметка тестов дифференциации).

Работайте по плану занятия п. 2.1.

### Примечание:

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).
- учитывайте результаты дифференциации в сравнении с эталонными штаммами.
- объекты с посевами после учета поместите при всех тех же условиях.
- результаты изучения культуры впишите в рабочую тетрадь.

### Материал и оборудование

Полоски индикаторной бумаги на  $H_2S$  ..... 5 шт.

Линейка ..... 1 шт.

## ЗАНЯТИЕ 11 (4 часа)

### 2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека

2.1.1. Продолжение изучения культуры, выделенной из крови больного (2-я отметка тестов дифференциации).

2.1.1.1. **Бактериостатический метод** (прил. 6.2). Отметьте наличие роста культуры на средах с фуксином, тионином, на Альбими агаре.

2.1.1.2. **Сероводородообразование** (прил. 6.3). Измерьте почерневшую часть индикаторной бумаги на  $H_2S$ , замените полоску индикаторной бумаги на новую.

### 2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза у крупного рогатого скота

2.2.1. Продолжение дифференциации культуры, выделенной из молока (2-я отметка тестов дифференциации).

См. план п. 2.1.

### Примечание:

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

- учет результатов проводите в сравнении с эталонными штаммами.
- результаты изучения культуры впишите в рабочую тетрадь.
- объекты с посевами после учета поставьте при тех же условиях.

### Материал и оборудование

Полоски индикаторной бумаги на $H_2S$ .....	5 шт.
Линейка .....	1 шт.

2.1.2. Биологическое исследование материала от больного человека. Исследование биопробных животных, зараженных кровью больного.

Возьмите кровь у биопробных животных, получите сыворотку отстаиванием на холоду, определите титр антител в реакции Райта (прил. 7.2) и РПГА – микрометодом (прил. 7.4).

#### Примечание:

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

### Материал и оборудование

Диагностикум цветной бруцеллёзный 3 млрд./мл .....	10,0 мл
Физиологический раствор .....	20 мл
Диагностикум эритроцитарный антигенный .....	2,0 мл
НКС .....	1,0 мл
Шприц на 5 мл .....	2 шт.
Пробирка бактериологическая стерильная .....	2 шт.
Пробирка бактериологическая нестерильная .....	6 шт.
Пипетка на 5 мл стерильная .....	2 шт.
Пластина полистироловая .....	1 шт.
Пипетка на 1,0 мл стерильная .....	4 шт.
Микротитратор Такачи .....	1 шт.
Водяная баня .....	1 шт.
Фиксирующий столик, повязки .....	1 шт.
Тампоны ватные .....	1 шт.
Спирт этиловый .....	10 мл

2.2.1. Биологическое исследование материала от крупного рогатого скота.

См. план работы, материал и оборудование п. 2.1.2.

## ЗАНЯТИЕ 12 (2 часа)

### 2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека

Окончание дифференциации культуры, выделенной из крови больного (3-я отметка тестов дифференциации).

2.1.1. **Бактериостатический метод.** Отметьте наличие роста культуры на средах с фуксином, тионином, Альбими агаре.

2.1.2. **Сероводородообразование.** Измерьте почерневшую часть индикаторной бумаги на  $H_2S$ , суммируйте результаты 3-х измерений.

### 2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза у крупного рогатого скота

Окончание дифференциации культуры, выделенной из молока больного животного.

Работайте по плану п. 2.1.

#### Примечание:

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).
- учет результатов проводите в сравнении с эталонными штаммами.
- составьте таблицу результатов идентификации и дифференциации выделенных культур, проанализируйте данные и дайте заключение.
- передайте на уничтожение все имеющиеся посевы на средах с красками, на скошенном агаре.
- сделайте соответствующие записи в журнале ф. 3.

## ЗАНЯТИЕ 13 (2 часа)

2.1.1. Биологическое исследование крови больного бруцеллёзом.

2.1.1.1. Вскройте биопробное животное, зараженное кровью больного, возьмите кровь из сердца шприцем в пробирку, поместите пробирку на 2 часа в термостат, затем на 2 часа в холодильник, отделите сыворотку от сгустка.

2.1.1.2. Посейте лимфатические узлы – парааортальный, регионарный (паховый), печень, селезенку, кровь на 2 пробирки с твердой питательной средой (например, эритроцит агар) и кровь на 2 пробирки бульона Хоттингера.

2.2.1. Биологическое исследование материала от крупного рогатого скота.

Работайте по плану п. 2.1.1.

#### Примечание:

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

- работу выполняйте в лаборатории экспериментальных животных.
- посевы органов и крови проводите с помощью стерильных деревянных палочек или петли.
- по 1 пробирке с посевами органов на плотной питательной среде и по 1 пробирке с посевами в бульоне поместите в  $\text{CO}_2$ -инкубатор, остальные посевы – в термостат. Все посевы инкубируйте при температуре 37 °С.

### Материал и оборудование

Эритрит агар pH 7,2	24 пробирки
Бульон Хоттингера	4 пробирки
Пробирка стерильная	2 шт.
Палочка деревянная	12 шт.
Шприцы на 5–10 мл	2 шт.
Хлороформ	5 мл
$\text{CO}_2$ -инкубатор	1 шт.
Инструменты для вскрытия животных	1 набор
Спирт этиловый	50 мл

## ЗАНЯТИЕ 14 (2 часа)

### 2.1.1. Биологическое исследование крови больного бруцеллёзом.

Продолжение исследования сыворотки биопробного животного, зараженного кровью больного.

Исследуйте сыворотку, взятую накануне от больного животного в реакции Хеддльсона, Райта (прил. 7.1, 7.2) и РПГА микрометодом (прил. 7.4).

#### Примечание:

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).
- учет реакции Райта проводите через 24 часа.
- сравните титр реакции Райта с титром предыдущего исследования.

### Материал и оборудование

Бруцеллезный цветной единый диагностикум цельный	1,5 мл
Бруцеллезный цветной единый диагностикум разведенный до 3 млрд./мл	10, мл
Бруцеллезный антигенный эритроцитарный диагностикум	2,0 мл
НКС	1,0 мл
Физиологический раствор 100 мл	1 фл.

Пробирка бактериологическая нестерильная .....	6 шт.
Пипетка нестерильная на 5 мл .....	2 шт.
Пипетка нестерильная на 1,0 мл .....	2 шт.
Чашка Петри .....	1 шт.
Полистироловая пластина .....	1 шт.
Микротитратор Такачи .....	1 шт.
Водяная баня .....	1 шт.

### 2.2.1. Биологическое исследование материала от крупного рогатого скота.

Исследуйте сыворотку биопробного животного, зараженного молоком.

Работайте по плану п. 2.1.1, учитывая примечания, материал и оборудование.

**Примечание:**

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

## ЗАНЯТИЕ 15 (2 часа)

### 2.1. Лабораторный диагноз бруцеллёза у человека

#### 2.1.1. Биологическое исследование крови больного бруцеллёзом.

2.1.1.1. Просмотрите посеы лимфатических узлов, органов, крови биопробных животных, зараженных кровью больного, на плотных питательных средах. Отберите подозрительные на рост бруцелл колонии. Приготовьте мазки, окрасьте по Граму, просмотрите. Поставьте реакцию агглютинации с трипафлавином (прил. 4.1).

2.1.1.2. Поставьте ОРА с бруцеллёзной агглютинирующей сывороткой в разведении 1:25 (прил. 5.1).

### 2.2. Лабораторный диагноз бруцеллёза у животного

#### 2.2.1. Биологическое исследование материала от крупного рогатого скота. Окончание исследования молока.

Работайте по плану п. 2.1.1.

**Примечание:**

- при работе с культурой соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).



- выдайте окончательный ответ, сделайте записи в рабочих тетрадях.
- передайте все посевы от животных на уничтожение, заполните акт об уничтожении культуры по ф. 12.
- заполните паспорта на выделенные из крови больного и молока животного культуры бруцелл.
- заполните журналы ф. 1–4.
- если из анализов крови больного человека и молока крупного рогатого скота бактериологическим методом выделить культуры бруцелл не удалось, то при наличии роста культуры от биопробных животных выделите культуру, идентифицируйте и дифференцируйте согласно планам занятий 7–12.

### Материал и оборудование

Бруцеллезная диагностическая агглютинирующая сыворотка 1 : 25 . . . . .	0,5 мл
Физиологический раствор pH 6,8–7,2 . . . . .	0,5 мл
Паспорт культуры (бланк) . . . . .	2 шт.

#### 4. ЭКСПРЕССНЫЕ И УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЁЗА

Учитывая, что бруцеллы относятся к медленно растущим микроорганизмам и окончательный ответ бактериологического и биологического методов исследования можно ожидать только через 3–5 недель, были разработаны тесты, основанные на иммунологическом взаимодействии специфического антигена и антител (метод флуоресцирующих антител (МФА) – прямой вариант, РНАт, иммуноферментный анализ (ИФА), а также молекулярно-биологический метод – полимеразная цепная реакция (ПЦР).

МФА и РНАт, для быстрого обнаружения возбудителя бруцеллёза в исследуемом материале при индикации, разработаны достаточно хорошо. Чувствительность этих методов колеблется в пределах сотен тысяч микробных клеток в 1,0 мл исследуемого материала.

Бруцеллезная агглютинирующая люминесцирующая сыворотка выявляет бруцеллы всех видов. Для РНАт используют эритроцитарный антигенный диагностикум. Положительный результат позволяет заподозрить наличие бактерий рода *Brucella*.

Чувствительность ПЦР  $10^3$  м.к./мл.

Отрицательный результат экспрессного исследования не является основанием для отрицательного ответа по анализу. Ввиду медленного роста возбудителя бруцеллёза на питательных средах, а также сравнительно медленного размножения в организме зараженных животных, в качестве ускоренных методов можно рекомендовать исследование посевов на питательных средах через 24–26 ч инкубирования с помощью МФА и РНАт, а также исследование этими методами органов биопробных животных через 24–40 ч после заражения.

Сигнальное исследование на бруцеллёз всегда проводится в комплексе с развернутым классическим бактериологическим анализом.

После выделения и идентификации культуры, в случае необходимости, производят дифференциацию видов бруцелл.

## ЗАНЯТИЕ 16 (6 часа)

### 4. Экспрессное и ускоренное обнаружение возбудителя бруцеллёза

4.1. Приготовьте из нативного материала мазок, обработайте его люминесцирующей бруцеллёзной сывороткой и просмотрите. Дайте предварительный ответ не позднее 2 ч от начала исследования (прил. 5.3).

4.2. Исследуемый материал прогрейте в течение 10 мин при 100 °С. Поставьте микрометодом РНАт с эритроцитарным диагностикумом. Через 2 ч дайте предварительный ответ, окончательный – через 24 часа (прил. 7.4).

4.3. Посейте исследуемый материал на 4 чашки с питательной средой на бруцеллёз (например, эритрит агар). Через 24–36 ч инкубирования при 37 °С приготовьте мазки с чашек (смойте культуру физиологическим раствором). Обработайте люминесцирующей сывороткой, просмотрите.

4.4. Введите нативный материал в объеме 0,5 мл двум белым мышам в/бр. Через 24–40 ч животных захлороформируйте, вскрыйте, из органов приготовьте мазки-отпечатки, обработайте люминесцирующей сывороткой, просмотрите. Одновременно из органов приготовьте взвесь на физиологическом растворе. После обеззараживания взвеси (см. 4.2) поставьте РНАт микрометодом (прил. 7.4). Через 2 часа выдайте предварительный ответ, окончательный – через 24 часа. При наличии четких положительных результатов выдайте положительный ответ о выделении возбудителя бруцеллёза.

4.5. Исследуйте материал в ПЦР (прил. 9).

#### Примечание:

- при работе с материалом, подозрительным на зараженность возбудителем бруцеллёза, соблюдать требования биологической безопасности (см. выше).

### Материал и оборудование

Люминесцирующая бруцеллёзная сыворотка . . . . .	1,5 мл
Бруцеллезный эритроцитарный диагностикум антигенный . . . . .	0,5 мл
Сыворотка бруцеллёзная агглютинирующая 4 СЕ . . . . .	0,4 мл
НКС . . . . .	1,0 мл
Эритрит агар рН 7,0 . . . . .	4 чашки
Чашка Петри . . . . .	1 шт.
Пипетка бактериологическая 1,0 мл . . . . .	5 шт.
Пробирка стерильная . . . . .	4 шт.

---

Шприц на 5,0 мл . . . . .	2 шт.
Микротитратор Такачи . . . . .	1 шт.
Предметное стекло . . . . .	6 шт.
Полистироловые пластины . . . . .	3 шт.
Дозатор на 1000 мкл . . . . .	1 шт.
Дозатор на 200 мкл . . . . .	2 шт.
Дозатор на 10 мкл . . . . .	2 шт.
Штатив для микроцентрифужных пробирок . . . . .	1 шт.
Центрифуга «МиниСпин» . . . . .	1 шт.
Центрифуга «Фуга/вортекс микро-спин» . . . . .	1 шт.
Термостат твердотельный «Термит» . . . . .	1 шт.
Термостат программируемый «Терцик» . . . . .	1 шт.
Камера для электрофореза . . . . .	1 шт.
Источник питания . . . . .	1 шт.
Трансиллюминатор . . . . .	1 шт.
Наконечники на 1000 мкл . . . . .	3 шт.
Наконечники на 200 мкл . . . . .	10 шт.
Наконечники на 10 мкл . . . . .	18 шт.
Микроцентрифужная пробирка 1,5 мл . . . . .	1 шт.
Микроцентрифужная пробирка на 500 мкл . . . . .	6 шт.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### 1. Приготовление сред, применяемых для выделения и идентификации бруцелл

#### 1.1. Сыворотно-декстрозный агар.

К 835 мл дистиллированной воды добавляют 15 г агар-агара, 10 г пептона, 5 г химически чистого хлористого натрия и 165 мл мясной воды.

Все ингредиенты соединяют и подвергают обработке текучим паром в течение 1 часа. Устанавливают рН 7,8. Затем сосуд ставят в автоклав и подвергают одномоментному давлению (2 атмосферы) при 120 °С для выпадания фосфатов. Среду фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 7,4, разливают в мерную посуду и стерилизуют при температуре 116 °С в течение 15 мин.

Питательный агар по мере надобности расплавляют в водяной бане и охлаждают до 50 °С. Затем к нему добавляют нормальную инактивированную (30 мин при 56 °С) лошадиную или бычью сыворотку и раствор декстрозы (глюкозы), предварительно простерилизованной путем фильтрации через фильтр Зейтца, так чтобы окончательная концентрация сыворотки была 5 % и декстрозы – 1 %.

#### 1.2. Печеночный агар.

К 500 г свежего фарша, приготовленного из печени, добавляют 500 мл воды. Смесь при перемешивании кипятят в течение 1 часа, снимая накипь, затем фильтруют через ватно-бумажный фильтр. Печеночный настой разливают по бутылкам и стерилизуют в автоклаве при 120–115 °С в течение 20 мин.

Для приготовления агара к 500 мл печеночного настоя добавляют 500 мл воды, 10 г сухого пептона, 5 г химически чистого хлористого натрия и 26 г агар-агара, промытого водой и хорошо отжатого. Среду варят до полного расплавления агара, устанавливают рН 7,4 и разливают в необходимую посуду. Среду автоклавируют при 115 °С в течение 20 мин, отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, предварительно смоченный теплой водой, устанавливают рН 7,2, разливают в посуду, стерилизуют 30 мин при 115 °С.

#### 1.3. Печеночный бульон.

К 500 мл печеночного настоя добавляют 500 мл водопроводной воды, 10 г сухого пептона и 5 г химически чистого хлористого натрия.

Смесь кипятят, устанавливают рН 7,4, фильтруют через фильтровальную бумагу, стерилизуют 20 мин при 115–120 °С. После стерилизации рН бульона должен быть 7,1–7,2.

#### **1.4. Агар Альбими.**

К 1 л дистиллированной воды добавляют 20 г сухого пептона, 20 мл дрожжевой воды, 5 г химически чистой поваренной соли, 20 г агар-агара. Вещества растворяют, фильтруют через ватный фильтр, предварительно смоченный горячей водой и хорошо отжатый. К фильтрату добавляют 1 г глюкозы и 0,1 г бисульфита натрия. Устанавливают рН 7,2–7,3, разливают в необходимую посуду, стерилизуют 40 мин текучим паром, а затем еще при 110 °С 20 мин.

#### ***Дрожжевая вода***

1 кг хлебных дрожжей и 1 л дистиллированной воды кипятят до растворения, фильтруют, хранят под хлороформом в течение двух недель.

#### **1.5. Сухая среда «Д».**

Сухая среда состоит из рыбного и дрожжевого гидролизатов, агара, хлористого натрия, глюкозы, рН 7,0–7,2. Навеску среды растворяют в дистиллированной воде, кипятят до полного растворения агара, фильтруют, после разлива автоклавируют в течение 20 мин при 120 °С.

#### **1.6. Эритрит агар сухой.**

Состав в г на 1 л: гидролизат кильки – 17,9, натрия хлорид – 5,9, тиамин бромид – 0,005, глюкоза – 1,0, эритрит – 0,0122, дистиллированная вода до 1 л, рН  $7,2 \pm 0,2$ , агар – 11,2.

36 г порошка размешивают в 1 л холодной дистиллированной воды, кипятят 1–2 мин до образования быстро оседающей крупнопузырчатой пены, фильтруют через ватный тампон. После разлива автоклавируют при 1 атм. 20 мин.

#### **1.7. Среда Кастанеда.**

Во флаконы разливают по 20 мл агара и стерилизуют. После стерилизации укладывают горизонтально так, чтобы агар равномерно застыл на одной стороне флакона. Затем в каждый флакон стерильно добавляют 10–15 мл предварительно простерилизованного бульона с 2 % лимоннокислого натрия (для предупреждения свертывания крови). Подготовленную среду выдерживают при 37 °С в течение 2–3 суток.

#### **1.8. Питательная среда для бактериостатического метода.**

Для приготовления сред с красками питательный агар Альбими расплавляют, охлаждают до 45–50 °С и к нему стерильно добавляют основной раствор стандартной краски.

Приготовление красок: 0,1 г краски растворяют при растирании в ступке в 20 мл 96° этилового спирта, затем постепенно добавляют 80 мл дистиллированной воды. Основные растворы (1 : 1 000) красок могут храниться в темном месте в баночке с притертой пробкой до 6–10 месяцев.

Для получения в среде концентрации краски 1 : 50 000 к 100 мл среды добавляют 2 мл основного раствора краски.

При дифференциации видов бруцелл и их биотипов применяют тионин в концентрации 1 : 50 000 и фуксин – 1 : 50 000 (20 мг/мл).

Краски подтитровывают по эталонным штаммам бруцелл (*B. melitensis* 16М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330). Для этого испытуемую краску добавляют в различных количествах: тионин в концентрации от 1 : 15 000 до 1 : 100 000, фуксин от 1 : 20 000 до 1 : 100 000. Концентрация красок в среде, с которыми получается четкая дифференциация эталонных штаммов бруцелл, и является рабочей дозой. Среды с красками можно хранить в холодильнике 10–15 дней: для того, чтобы среды не высохли, их помещают в целлофановые мешки. Обесцвеченные среды применять нельзя.

### 1.9. Агар Кристенсена.

Сухого пептона 1 г, поваренной соли – 5 г, однозамещенного фосфорнокислого калия – 2 г, фенолового красного – 0,012 г, глюкозы – 2 г, агар-агара – 20 г, дистиллированной воды – 1 л.

После растворения всех ингредиентов устанавливают рН 6,8, среду разливают в колбы по 500 мл или по 5 мл в пробирки и стерилизуют при 120 °С 20 мин. Затем среду охлаждают до 50 °С и добавляют простерилизованный через асбестовый или фильтр Зейтца 20% раствор мочевины на дистиллированной воде, чтобы окончательная концентрация ее была равна 2 % (т. е. на 500 мл – 50 мл раствора мочевины, а на 5 мл – 0,5 мл). Среду стерильно разливают в пробирки и охлаждают в наклонном положении.

### 1.10. Питательная среда с кальцием.

В качестве основы питательной среды рекомендуется глюкозоглицериновый агар, приготовленный на переваре Мартена или печеночном настое рН 7,0 при концентрации агара 1,3–1,5 %.

Навеску хлористого кальция, равную 20–22,2 мг, растворяют в 2–3 мл стерильного физиологического раствора и вносят в 100 мл расплавленного и остуженного до 45–50 °С питательного агара. Среду разливают по чашкам Петри.

### 1.11. «Транспортная» среда.

В стерильные пенициллиновые флаконы разливают по 2 мл мясопептонного глюкозо-глицеринового бульона с 2 % лимоннокислого

натрия. Флаконы закрывают прокипяченными резиновыми пробками и закатывают металлическими колпачками. Затем флаконы стерилизуют при 120 °С, 0,6 атм. 30 мин. Для проверки стерильности их ставят на 1–2 сут в термостат при температуре 37 °С.

Стерильные флаконы с питательной средой можно использовать для посева крови.

### **1.12. Питательная среда для определения чувствительности к антибиотикам сухая (АГВ).**

Панкреатический гидролизат кильки – 25,0 г, натрия хлорид – 5,0 г, натрия фосфат двухзамещенный – 1,0 г, агар – 13,5 г, крахмал – 0,5 г, рН 7,4 ± 0,2.

Навеску среды 45 г порошка размешивают в 1 л дистиллированной воды, доводят до кипения, кипятят до полного расплавления агара (2–3 мин), фильтруют, после разлива автоклавируют при давлении 1 атм. 112 °С в течение 20 мин.

## **2. Проверка качества питательных сред**

Двухсуточную агаровую культуру тест-штаммов бруцелл (*B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16М, *B. suis* 1330) смывают с поверхности 0,9% раствором натрия хлорида, затем доводят концентрацию микробной взвеси до  $1,7 \times 10^9$  м.к./мл по 10-единичному стандарту мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России (ОСО соответствующего года выпуска). Полученные взвеси разводят до концентрации  $1 \times 10^9$  м.к./мл и делают 10-кратные последовательные разведения, перенося 0,5 мл взвеси в 4,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида до разведения  $10^{-7}$  ( $10^2$  м.к./мл), тщательно перемешивая и меняя пипетки.

**Для проверки качества жидких питательных сред** – по 1,0 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения  $10^{-7}$  ( $10^2$  м.к.) вносят в 3 пробирки с 9 мл жидкой питательной среды, перемешивают и инкубируют при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение 22–26 ч.

Одновременно по 0,1 мл каждого тест-штамма из разведения  $10^{-7}$  (10 м.к.) высевают на 3 чашки плотного эритрит агара и равномерно распределяют покачиванием по всей поверхности агара.

Через 22–26 ч инкубации при температуре  $37 \pm 1$  °С по 0,1 мл микробной взвеси из каждой пробирки высевают на 3 чашки плотного эритрит агара.

Засеянные чашки с эритрит агаром без подрачивания и с подрачиванием инкубируют при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение 70–74 ч.

Жидкая среда считается пригодной (по показателю эффективности) если среднее число колоний, выросших на чашках с плотным эритрит



агаром после обогащения в эритрит бульоне, в 3 раза превосходит среднее число колоний, выросших на эритрит агаре до обогащения.

**Для проверки качества плотных сред** – по 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения  $10^{-6}$  ( $10^2$  м.к.) и  $10^{-7}$  (10 м.к.) высевают на 3 чашки с испытуемой средой и равномерно распределяют взвесь покачиванием по всей поверхности. Для контроля берут заранее проверенный агар высокого качества, который аналогично засевают из взвеси тех же разведений.

Засеянные среды инкубируют в течение  $72 \pm 2$  ч при температуре  $37 \pm 1$  °С.

Среда считается пригодной, если при высеве 10 м.к. наблюдается рост на всех агаровых пластинах; при высеве 100 м.к. – не менее 60 % из засеянных.

### **3. Методы получения повышенного содержания углекислого газа**

**3.1. В условиях лаборатории при отсутствии  $\text{CO}_2$ -инкубатора повышенное содержание углекислого газа получают по методике Хеддльсона (1920).**

Для этого в эксикатор помещают на дно небольшую емкость с двууглекислой содой из расчета 1 г на 1 л объема и загружают засеянные чашки, пробирки. Края крышки смазывают вазелином и закрывают эксикатор, оставив небольшое отверстие. Через эту щель быстро и осторожно вливают 10% серную или соляную кислоту по 8–9 мл на каждый литр объема и задвигают крышку.

**3.2. В экспедиционных условиях повышения концентрации  $\text{CO}_2$  достигают путем пробкования пробирок тлеющими ватными пробками, которые продвигают вглубь пробирки на 0,5–1 см от края и заливают расплавленным парафином или воском.**

### **4. Методы определения признаков диссоциации бруцелл**

#### **4.1. Проба с раствором трипафлавина.**

На предметное стекло наносят каплю раствора трипафлавина 1 : 500 на физиологическом растворе, в которой эмульгируют испытуемую культуру. У диссоциированных культур быстро, в течение 1–2 мин, наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев. Взвесь культуры в S-форме остается гомогенной.

#### **4.2. Реакция термоагглютинации (термопреципитации).**

Бактериальную суспензию двухсуточной культуры концентрацией не менее чем  $2 \times 10^9$  прогревают на водяной бане при 90 °С в течение

45 мин. Результат учитывают тотчас после прогревания и окончательный – через 24 часа при комнатной температуре. Суспензия бруцелл недиссоциированных (S) штаммов остается гомогенной, при наличии диссоциации – ясно выраженная агглютинация клеток бруцелл.

### **4.3. Витальная окраска диссоциированных форм бруцелл.**

Уайт и Вильсон применили этот метод для дифференциации S- и R-форм колоний бруцелл. Метод окраски колоний кристаллическим фиолетовым основан на том, что колонии, находящиеся на разных стадиях диссоциации, окрашиваются по-разному. С этой целью Альбими агар разливают в чашки Петри и подсушивают в течение суток, испытываемую культуру засевают, выращивают в термостате при 37 °С. Через четверо суток, когда сформируются колонии, на поверхность агара наливают водный раствор кристаллического фиолетового 1 : 2 000. Спустя 3–5 мин краску удаляют в дезинфицирующий раствор. Колонии культур просматривают с помощью лупы или стереоскопического микроскопа.

Колонии, находящиеся в S-форме, имеют светло-желтый или светло-зеленый цвет, а колонии шероховатые в R-форме – темно-фиолетовый или светло-синий.

## **5. Тесты идентификации бруцелл**

### **5.1. Ориентировочная реакция агглютинации со специфической сывороткой.**

На предметное стекло наносят каплю бруцеллѐзной поливалентной агглютинирующей сыворотки 1 : 25, в которой эмульгируют выделенную культуру. В положительных случаях быстро наступает агглютинация – хорошо выраженные хлопья и полное просветление жидкости. Для контроля испытываемую культуру суспендируют в физиологическом растворе – хлопьев не должно быть.

### **5.2. Реакция агглютинации со специфической сывороткой (объемная).**

Ставят реакцию агглютинации в пробирках в объеме 1,0 мл. Для этого готовят ряд двукратных разведений бруцеллѐзной агглютинирующей сыворотки в физиологическом растворе с 1:25 до титра или ½ титра. Суспензию испытываемой культуры готовят по стандарту мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России 10 единиц (ОСО соответствующего года выпуска). Реакцию ставят с двумя контролями:

- а) контроль сыворотки, где разведение сыворотки должно соответствовать ее начальному разведению в ряду агглютинации;
- б) контроль испытываемой культуры.

Реакцию выдерживают при 37 °С 20–24 ч. Положительной реакция считается на 2+ в разведении сыворотки  $\frac{1}{2}$  – или до ее титра.

**Примечание:**

- титр сыворотки 1 : 1 600.

Таблица 3

**Схема постановки реакции агглютинации со специфической сывороткой (объемная)**

Ингредиенты	№ пробирок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Физиологический раствор	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Специфическая сыворотка 1 : 25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Испытуемая культура 10 МЕ	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–
Полученные разведения	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	КА	КС

КА – контроль антигена

КС – контроль сыворотки

### 5.3. Люминесцентно-серологическое исследование.

На тщательно обезжиренном предметном стекле готовят мазок исследуемого материала, фиксируют в этиловом спирте, сушат на воздухе. Наносят каплю люминесцентной бруцеллёзной сыворотки в рабочем разведении. Препарат помещают во влажную камеру на 15–20 мин при 37 °С. Затем промывают в течение 10 мин водой или забуференным физиологическим раствором pH 7,2–7,5, затем дистиллированной водой, подсушивают на воздухе, наносят каплю забуференного глицерина (9 частей глицерина и 1 часть забуференного физиологического раствора), накрывают покровным стеклом, наносят иммерсионное нелюминесцирующее масло и микроскопируют в люминесцентном микроскопе.

Периферическая часть клетки светится ярким желтовато-зеленым цветом, центральная часть клетки темная, морфология клетки четко выражена.

## 6. Дифференциация видов и биоваров бруцелл

### 6.1. Отношение первых генераций бруцелл к углекислому газу.

Первые генерации овечьих, свиных штаммов хорошо растут в обычных аэробных условиях. Отдельные биовары *B. abortus*, *B. ovis*

для своего первичного роста из патологического материала требуют повышенного (5–10 %) содержания углекислого газа. Этот метод может быть использован для дифференциации *B. abortus* и *B. ovis* от других видов бруцелл и справедлив только в отношении первых генераций *B. abortus*, так как с последующим пересевом это свойство коровьих культур утрачивается.

### 6.2. Бактериостатический метод.

Питательный агар Альбими с фуксином 1 : 50 000 и тионином 1 : 50 000 разливают в чашки Петри, подсушивают. Перед посевом культур каждую чашку Петри делят на сектора по количеству изучаемых культур и эталонных штаммов. Посевы эталонных штаммов трех видов первого биовара бруцелл и испытуемых культур производят стандартной петлей (диаметр 2 мм) из взвеси 2-суточной агаровой культуры приготовленной на физиологическом растворе по стандарту мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России 10 единиц (ОСО соответствующего года выпуска). Одну петлю взвеси засевают штрихом или «бляшками» на сектора агара. Учет полученных результатов производят по наличию или отсутствию роста бруцелл через каждые 48 ч инкубации в термостате при 37 °С в течение 6 суток.

### 6.3. Изучение сероводородообразования.

На скошенную поверхность сывороточно-декстрозного агара (рН 6,8–7,2) засевают одну стандартную петлю (внутренний диаметр 2 мм) взвеси испытуемой культуры  $1,7 \times 10^9$  м.к./мл. Реактивом на сероводород служат полоски фильтровальной бумаги (1 × 8 см), пропитанные насыщенным водным раствором углекислого свинца. Полоски подсушивают на воздухе и хранят в банке из темного стекла с притертой пробкой. После засева культуры индикаторную бумагу укрепляют между пробкой и стенкой пробирки так, чтобы конец ее находился на уровне верхнего края среды, но не касался ее.

Для предотвращения скопления в пробирке углекислого газа, задерживающего образование сероводорода, в пробку вставляют П-образный патрубков. Пробирки с посевом ставят для инкубации в термостат при температуре 37 °С.

Показателем образования сероводорода является почернение нижнего края индикаторной полоски. Интенсивность сероводородообразования определяют измерением (в мм) потемневшей части. Результаты учитывают через каждые двое суток в течение 6 дней. При каждом учете потемневшую бумагу заменяют новой. Для окончательной оценки результатов показатели трех измерений суммируют.

Для *B. suis* (биовар 1) суммарный показатель образования сероводорода составляет примерно от 19 до 20 мм, для *B. abortus* (биовар 1) – около 5–7 мм. Штаммы *B. melitensis* (биовар 1), как правило, не выделяют сероводород или же вызывают легкое побурение края свинцовой бумажки. У штаммов *B. neotomae* показатель в среднем равен 5–8 мм. Культуры *B. ovis* и *B. canis* сероводорода не образуют.

#### 6.4. Проба с фагом «Тб».

На чашки Петри с подсушенным 1,5 % агаром Мартена или агаром Альбими в наносят 0,1 мл суспензии бруцелл в физиологическом растворе  $1,7 \times 10^9$  м.к./мл, приготовленной из 48-часовой, и распределяют шпателем по поверхности. На подсушенный бактериальный газон наносят бактериофаг в рабочей дозе (RTD). Легким наклоном чашки капле бактериофага дают стечь в виде «дорожки». После подсыхания чашки переворачивают и ставят в термостат при 37 °С. Результаты учитывают через 24 ч. *B. abortus* лизируется фагом «Тб» в дозе RTD, *B. melitensis* и *B. suis* – не лизируются.

#### 6.5. Реакция агглютинации с моноспецифическими сыворотками.

Реакцию ставят объемным методом, начиная с разведения сыворотки 1:10 до ее титра. Антигеном служит суспензия, приготовленная на физиологическом растворе из 2-суточной агаровой культуры изучаемого штамма бруцелл по международному стандарту мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России 10 единиц (СО соответствующего года выпуска).

Для разведения сыворотки и антигена применяют физиологический раствор pH 7,0. Антиген добавляют по 0,5 мл во все пробирки, кроме контроля.

Таблица 4

#### Схема постановки реакции агглютинации с моноспецифическими сыворотками

Кол-во пробирок	1	2	3	4	5	6	7
Физиологический раствор	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сыворотка антиабортус 1 : 5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–
Суспензия исследуемой культуры на физиологическом растворе	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Разведения сыворотки	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	КС	КА

КА – контроль антигена

КС – контроль сыворотки

**Примечание:**

- по такой же схеме ставят реакции агглютинации с сывороткой антимиелитензис. В качестве контроля используют эталонные штаммы *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*.

Учет реакции производят через 18–20 ч выдерживания в термостате при 37 °С, а затем в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакция считается положительной с разведения сыворотки 1 : 10 не менее, чем на 2+ (таблица 2).

**6.6. Дифференциация бруцелл по их уреазной активности**

Этот метод основан на учете времени, в течение которого отдельные виды рода бруцелл расщепляют мочевины на аммиак и углекислоту, в результате чего происходит щелочение среды, которое выявляется индикатором, добавленным в среду Кристенсена. На косячки агара Кристенсена производят посев одной полной стандартной петли двухсуточной агаровой культуры испытуемого штамма бруцелл.

Учет результатов производят через каждый час в течение 5 ч и окончательно через 24 ч. Наиболее быстро и интенсивно краснеет среда при посеве бруцелл вида *B. suis*, медленнее и менее интенсивно – бруцелл вида *B. melitensis* и еще медленнее и менее интенсивно – бруцелл вида *B. abortus*.

**7. Серологический диагноз бруцеллёза**

Перед проведением серологических исследований сыворотку крови обеззараживают добавлением мертиолята натрия до концентрации 1 : 10 000, с последующим прогреванием при 56 °С в течение 30 мин.

**7.1. Реакция Хеддльсона (пластинчатый метод)**

Преимущество этого метода заключается в простоте постановки реакции, быстром получении результатов и чувствительности реакции. В качестве антигена для постановки реакции Хеддльсона и Райта применяют единый бруцелллезный диагностикум. Реакцию ставят на обычном (22 × 22 см) оконном, тщательно вымытом обезжиренном стекле, расчерченном на квадраты величиной 4 × 4 см каждый, по горизонтали должно быть 5 квадратов. На первом квадрате с левой стороны записывается номер испытуемой сыворотки, в последующие квадраты слева направо разливают (микропипеткой или 1 мл градуированной пипеткой) испытуемую сыворотку в следующих дозах: 0,04; 0,02; 0,01 и 0,03 (контроль сыворотки). К первым трем дозам сыворотки добавляют по 0,03 мл антигена. К последней дозе сыворотки (0,03) добавляют 0,03 мл физиологического раствора. Сыворотку осторожно смешивают с антигеном палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. Контроль антигена

ставят, добавляя 0,03 мл физиологического раствора к 0,03 мл антигена. Затем стекло слегка подогревают над пламенем спиртовки так, чтобы происходило равномерное нагревание всей поверхности стекла.

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

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

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

Учет реакции проводят невооруженным глазом по следующей схеме:

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

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

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

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

д) равномерная мутная жидкость (-).

Для оценки результатов рекомендуется следующая схема:

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

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

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

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

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

## **7.2. Реакция агглютинации объемная (реакция Райта)**

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

### **Техника постановки реакции**

Реакция ставится с контролем сыворотки (первая пробирка) и контролем диагностикума (последняя пробирка).

В пробирки разливают физиологический раствор: во вторую – 2,4 мл, в остальные по 0,5 мл. Во вторую пробирку добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки в разведении 1:5, перемешивают, титруют по 0,5 мл до предпоследней пробирки и удаляют 0,5 мл в дезинфицирующий раствор. Из второй пробирки 0,5 мл сыворотки переносят в первую пробирку (контроль сыворотки в разведении 1 : 50) и 1,0 мл удаляют в дезинфицирующий раствор.

Диагностикум разводят физиологическим раствором согласно прилагаемому к нему наставлению и добавляют по 0,5 мл во все пробирки, кроме первой (контроля сыворотки). После добавления диагностикума получают следующие разведения сыворотки – 1:50, 1:100 и т.д. Сыворотки с антигеном смешивают путем встряхивания и помещают в термостат (37 °С) на 18–20 часов. После инкубации пробирки выдерживают 1–2 часа при комнатной температуре и проводят учет реакции.

Учет реакции проводят по стандарту мутности в зависимости от степени осаждения агглютината и просветления жидкости.

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

Дальнейшее разведение антигена физиологическим раствором производят в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

#### **Разведение антигена физиологическим раствором**

	Степень агглютинации				
	++++	+++	++	+	–
Антиген, разведенный 1 : 2	0	0,25	0,5	0,75	1,0
Физ. раствор	1,0	0,75	0,5	0,25	0
% просветления	100	75	50	25	0

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

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

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



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

При диагностической оценке РА рекомендуется следующая схема:

- титр сыворотки 1 : 100 (100 МЕ/мл) – результат положительный;
- титр сыворотки 1 : 200 (200 МЕ/мл) – результат положительный;
- титр сыворотки 1 : 400 (400 МЕ/мл) – результат резко положительный.

тительный.

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

При диагностике бруцеллёза крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов положительными считаются такие сыворотки, которые дают выраженную реакцию агглютинации 1:100.

Сыворотки крови овец, коз и свиней расцениваются как положительные в разведении 1 : 50 (++) и выше, северных оленей – 1 : 25 (++) и выше. Реакция агглютинации в титре 1 : 50 у крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов в титре 1 : 25 – у овец, коз и свиней – считается сомнительной.

Реакция Райта у экспериментальных животных (морских свинок) обнаруживается с большим постоянством к концу первого месяца и удерживается в течение 12 месяцев при титрах 1 : 240–1 : 830.

Для получения разведения сыворотки 1:5 и 0,4 мл сыворотки добавить 1,6 мл физиологического раствора.

Таблица 6

**Схема реакции Райта с сывороткой морской свинки**

№ пробирок	1	2	3	4	5	6
Физиологический раствор	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сыворотка 1 : 5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Бруцеллезный диагностикум, разведенный в 10 раз	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Разведения сыворотки	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	КС	КД

КС – контроль сыворотки

КД – контроль диагностикума

### 7.2.1. Реакция Кумбса.

Реакция Кумбса направлена на выявление неполных антител, что имеет важное значение при хроническом бруцеллёзе, когда другие реакции могут быть отрицательными. Для постановки реакции Кумбса вначале ставят реакцию Райта. После учета реакции берут не менее трех пробирок с отрицательным или слабopоложительным результатом. Пробирки центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин.

Надосадочную жидкость осторожно отсасывают и погружают вместе с пастеровской пипеткой в дезраствор. К осадку приливают 1 мл ЗФР, встряхивают и вновь центрифугируют, как указано выше. Операцию повторяют три раза. Затем к осадку добавляют 0,5 мл антиглобулиновой сыворотки в удвоенном рабочем титре, пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат на 18–20 часов. Учет реакции проводят так же, как и в реакции Райта. Диагностическим титром реакции Кумбса считается агглютинация не менее чем на два креста в разведении сыворотки 1:50.

Для контроля антиглобулиновой сыворотки берут в опыт сыворотку, содержащую неполные антитела с известным титром. Контроль антигена. Взвесь антигена в физиологическом растворе подвергается отмыванию центрифугированием, как в основной реакции, после чего добавляют 0,5 мл антиглобулиновой сыворотки. При учете – в контроле антигена наблюдается равномерное помутнение.

Схема титрования антиглобулиновой сыворотки для РК.

Для титрования антиглобулиновой сыворотки (против глобулинов человека) необходимо иметь сыворотку крови человека, заведомо содержащую неполные антитела к бруцеллам в высоком титре.

Титрование антиглобулиновой сыворотки производят следующим образом. Вначале титруют положительную бруцеллезную сыворотку в реакции агглютинации (Райта). При этом делают несколько рядов разведений сыворотки, приблизительно 8 рядов (табл. 7).

Таблица 7

**Результаты реакции агглютинации**

№ рядов	Разведения сыворотки, содержащей неполные антитела							
	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400
1	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
2	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
3	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
4	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
5	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
6	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
7	4+	4+	2+	–	–	–	–	–
8	4+	4+	2+	–	–	–	–	–

После учета реакции агглютинации во всех рядах отбирают пробирки, в которых отсутствует агглютинация (в табл. 7 – начиная с 1 : 400) и в каждой из них отмывают антиген, согласно методике постановки реакции Кумбса. Затем (табл. 8) делают несколько разведений титруемой антиглобулиновой сыворотки (в нашем примере от 1 : 10 до 1 : 250) и добавляют по 0,5 мл каждого разведения этой сыворотки в один ряд пробирок с оставшимся после отмывания антигеном. Объем жидкости в каждой пробирке должен быть доведен до 0,5 мл. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37 °С. Результаты учитывают так же, как реакцию агглютинации. За титр антиглобулиновой сыворотки принимают ее наибольшее разведение (в нашем примере 1 : 80 – 4 ряд), которое выявляет неполные антитела в максимальном титре (1 : 3 200). Для реакции Кумбса антиглобулиновая сыворотка применяется в удвоенном титре (1 : 40).

Таблица 8

**Результаты реакции Кумбса**

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

**7.3. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) макрометодом.**

РНГА является специфичным и высокочувствительным методом выявления бруцеллёзных антител в сыворотке крови человека. Для постановки РНГА необходимо иметь: а) бруцеллёзный эритроцитарный антигенный диагностикум; б) контрольные (несенсибилизированные) эритроциты барана; в) нормальную сыворотку кролика; г) бруцеллёзную сыворотку.

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

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

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

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

#### ***Техника постановки РНГА***

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

В первые лунки (контроль сыворотки) добавляют микропипеткой по 0,05 мл контрольных эритроцитов. Затем в каждую лунку, начиная со второй, с помощью микропипетки добавляют по 0,05 мл диагностикума. Пластины осторожно встряхивают до полного перемешивания содержимого лунки, следя, чтобы не было разбрызгивания жидкости, и оставляют при комнатной температуре. Учет реакции проводят через 2–3 часа.

При постановке РНГА предусматриваются следующие контроли:

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

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

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

Оценка реакции проводится по следующей схеме:

4+ – эритроциты покрывают все дно лунки равномерным слоем.

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 бруцеллёз в РНГА у людей: титр 1 : 50 – реакция сомнительная, титр 1 : 100 и выше – реакция положительная. При записи результатов РНГА следует указывать титр сыворотки.

#### **7.4. Техника постановки РНГА и РНАт микрометодом.**

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

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

В лунки после титрования добавляют 25 мкл эритроцитарного диагностикума, разведенного 1 : 10, пластины слегка встряхивают до полу-

чения гомогенной взвеси. Учет проводят через 2–3 часа по аналогичной схеме, как и при использовании макрометода.

#### **Техника постановки РНАт в микрообъемах**

В лунки микротитровальных пластинок вливают по 0,025 мл (1 капля) 1%-й нормальной сыворотки кролика. Затем титратором с головкой, вмещающей 0,025 мл, набирают исследуемый материал 1 : 5 – 1 : 10 и титруют переносом по 0,025 мл из одной лунки в другую в 7–8 разведениях. Из последней лунки 0,025 мл удаляют в дезраствор (так же, как в РНГА). После этого в лунки добавляют по 0,025 мл раствора бруцеллзной сыворотки в такой концентрации, чтобы в этом объеме содержалось две гемагглютинирующие единицы сыворотки. Пластины оставляют на 1 час при комнатной температуре и затем во все лунки добавляют по 0,025 мл диагностикума бруцеллзного эритроцитарного антигенного в концентрации 0,5 %. За титр реакции принимают последнее разведение исследуемого материала, в котором отмечено полное подавление гемагглютинации.

#### **Примечания:**

1. Перед работой головки используемых титраторов следует предварительно обжечь.
2. При заборе материала для исследования и титрации нельзя прикасаться головкой титратора к стенкам пробирок или лунок титровальных пластинок, что может привести к удалению части жидкости.
3. Для заполнения титраторов достаточно погрузить их головки в исследуемую жидкость и убедиться в заполнении головок жидкостью.

#### **7.5. Роз-Бенгал проба (РБП).**

Роз-Бенгал проба, по сравнению с другими методами серологической диагностики бруцеллза, обладает следующими преимуществами: большой чувствительностью, способностью в короткие сроки после заражения выявлять специфические бруцеллзные антитела и, благодаря кислой реакции антигена, ингибировать проявления неспецифических антител, а также стабильностью показаний, технической простотой постановки, требующей небольшой затраты труда и времени, четкостью и быстротой получаемых результатов.

Сыворотки крови, подлежащие исследованию, должны быть прозрачными, без примеси эритроцитов. Их исследуют не позднее, чем через 4 дня хранения при температуре от +4 до +8 °С.

Допускается исследовать сыворотки, консервированные сухой борной кислотой (2 % борной кислоты к объему сыворотки). Консервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 14 дней.

Антиген представляет собой суспензию инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл в буферном растворе, окрашенных бен-

гальским розовым в розовый цвет. Расфасован во флаконы из темного стекла, подлежит хранению в темном сухом месте при температуре от +4 до +12 °С.

Срок годности антигена 18 месяцев со дня его изготовления при соблюдении условий хранения.

Антиген во флаконах без этикетки (надписи) или с трещинами, содержащий постороннюю примесь, неразбивающиеся хлопья, плесень, с истекшим сроком годности или подвергавшийся замораживанию для применения не годен.

Перед употреблением антиген выдерживают в течение 30–40 мин при комнатной температуре и затем тщательно встряхивают.

#### ***Техника постановки Роз-Бенгал пробы***

Реакцию проводят на чистых сухих металлических эмалированных пластинках или изразцовых плитках с лунками при комнатной температуре (от +18 до +22 °С).

Исследуемые сыворотки крови 0,03 мл вносят на дно лунки шприцем-полуавтоматом или микропипеткой. В каждую лунку рядом с сывороткой пипеткой-капельницей вносят равное количество (0,03 мл антигена) и тщательно смешивают активным движением ручного полисмесителя на 5 или 25 проб для получения однородной смеси, распределяя ее при этом по всей поверхности лунки.

Пластину с внесенными на нее сыворотками и антигеном покачивают в течение 4 мин осторожными вращательными движениями вручную или при помощи автоматического прибора, предназначенного для этой цели. При положительной реакции появляются хлопья агглютината розового цвета.

В начале работы ставят контроль антигена с нормальной (отрицательной) и положительной агглютинирующей сыворотками в тех же дозах, а также контроль антигена на спонтанную агглютинацию (к 0,03 мл антигена добавляют 0,03 мл физиологического раствора).

Учет реакции проводят невооруженным глазом в течение 4 мин после смешивания сыворотки с антигеном при слегка наклонном положении пластинки.

Агглютинацию, которая наступает позже, чем через 4 мин, не учитывают.

Реакцию считают положительной при наличии выраженной агглютинации в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета. При отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена) реакцию считают отрицательной. После учета реакции пластинки дезинфицируют погружением на 5 мин в 3% раствор фенола или 1% раствор хлорамина, затем тщательно промывают водопроводной водой,

высушивают и используют повторно. Для этих целей можно применять кассеты и штативы сушилки.

При нечетко выраженной агглютинации проводят повторное исследование.

По результатам повторного исследования дают окончательную оценку реакции (положительная или отрицательная).

Сыворотки, с которыми получена положительная РБП, исследуют в РА и РСК (РДСК) для установления титра агглютининов и наличия комплементсвязывающих антител.

Сыворотки, с которыми получена отрицательная РБП, дополнительно в РА и РСК (РДСК) не исследуют.

## **8. Серологическое исследование молока**

### **8.1. Кольцевая реакция с молоком.**

Кольцевая реакция применяется с целью ориентировочной проверки благополучных по бруцеллёзу молочных стад и для проверки молока на рынках.

Сущность кольцевой реакции заключается в том, что в молоке бруцеллёзных животных при добавлении антигена образуется комплекс антиген-антитело, который адсорбируется жировыми частицами молока. Жировые частицы вследствие своего малого удельного веса поднимаются вверх, увлекая адсорбированный агглютинат, который, в зависимости от цвета антигена, образует на поверхности жидкости окрашенное кольцо.

Для кольцевой реакции применяют цветной антиген Триленко, представляющий взвесь убитых окрашенных бруцеллёзных микробов.

Для исследования необходимо брать цельное, лучше свежее, молоко или консервированное формалином (из расчета 0,1 мл 10% раствора формалина на 10 мл молока).

В пробирку берут 2 мл молока и добавляют 0,1 мл (2 капли) концентрированного антигена, тщательно встряхивают и помещают в водяную баню или термостат на 45–50 мин при температуре 37–39 °С.

Учет реакции:

а) если в верхней части столбика молока (в слое сливок) четко выражено синее кольцо, а остальная часть молока белая, реакция оценивается положительной – 100 или 75 % агглютинации (+ + + + +);

б) при наличии достаточно выраженного синего кольца в слое сливок, а остальная часть молока синеватого цвета, реакция оценивается положительной – 50 % агглютинации (+ +);

в) если синее кольцо в слое сливок слабо выражено и весь столбик молока имеет синий цвет, реакция считается сомнительной – 25 % агглютинации (+ и ±);



г) если столбик молока равномерно окрашен в синий цвет, а слой сливок остается белым или слегка желтоватым, реакция отрицательная (-).

Молоко от коров с сомнительной реакцией исследуют повторно через 10–15 суток. При получении отрицательного или снова сомнительного результата животных считают благополучными по бруцеллёзу.

### **8.2. Пластинчатая реакция агглютинации.**

Данная реакция применяется для исследования только свежего молока и молочной сыворотки. Не подлежат исследованию пастеризованное, кипяченое и замороженное молоко (в таком молоке антибруцеллёзные агглютинины разрушаются), а также молоко, имеющее кислотность выше 30° по Тернеру (во избежание получения неспецифических результатов).

Реакцией агглютинации можно исследовать молоко жирное (цельное), обезжиренное (снятое) и молозиво.

Жирное молоко предварительно обезжиривают отстаиванием или центрифугированием, затем из-под слоя сливок забирают молоко для исследования.

Обезжиренное молоко и молозиво исследуют без предварительной подготовки, но так, чтобы сливок попало минимальное количество.

Для реакции обезжиренное молоко наносят на стекло (чашку Петри) в количестве 0,1 мл (или двух капель) и 0,05 мл (или одной капли). К каждой дозе испытуемого молока добавляют по одной капле бруцеллёзного диагностикума. Реакция сопровождается двумя контролями: к 0,05 мл диагностикума добавляют 0,1 мл физиологического раствора, и 0,1 мл испытуемого молока смешивают с 0,05 мл 12%-го раствора хлористого натрия. Путем покачивания чашки Петри смешивают ингредиенты. Учет реакции производят в первые 3–5 мин.

Положительная реакция агглютинации характеризуется выпадением хлопьев с большим или меньшим обесцвечиванием молока. При отрицательном результате молоко остается равномерно окрашенным в голубой цвет (цвет антигена).

### **8.3. Исследование молочной сыворотки.**

Перед получением молочной сыворотки жирное молоко обезжиривают путем центрифугирования или отстаивания. Молочную сыворотку получают при створаживании молока сычужным ферментом. Для этого к 5 мл молока добавляют 1–2 капли 10% сычужного фермента на физиологическом растворе хлористого натрия. Пробирки помещают при температуре 37 °С на 20–30 мин (до свертывания молока). Молочную сыворотку можно получить также путем помещения молока при 37 °С

на сутки. Молочную сыворотку сразу отделяют путем фильтрации через бумажный фильтр.

Дальнейшие манипуляции: постановка реакции и учет результатов аналогично постановке и учету реакции агглютинации с цельным молоком.

При оценке результатов исследования молока на бруцеллёз при помощи пластинчатой реакции агглютинации необходимо учесть возможность образования мелкохлопчатого агглютината, который, из-за мутности молока, может быть не отмечен и результаты реакции могут быть приняты за отрицательные. В отрицательных реакциях рекомендуется молоко исследовать в реакции агглютинации с молочной сывороткой.

### **9. ПЦР, направленная на выявление ДНК *Brucella spp.***

ГенБру тест-система предназначена для выявления *Brucella spp.* в клиническом материале, органах животных и объектах внешней среды.

Для детекции *Brucella spp.* подобрана система, состоящая из двух пар праймеров. Праймеры Bru31 и Bru32 обеспечивают специфическую амплификацию фрагмента ДНК размером 299 п.н., праймеры Bru3 и Bru4 – специфическую амплификацию фрагмента ДНК размером 175 п.н.

Тест-система выявляет в ПЦР  $1 \times 10^3$  м.к./мл *Brucella spp.*

В состав тест-системы входят следующие компоненты:

1–2. Праймеры Bru31 и Bru32 – водные растворы двух олигонуклеотидных праймеров, синтезированных в автоматическом ген-синтезаторе ДНК.

3–4. Праймеры Bru3 и Bru4 – водные растворы двух олигонуклеотидных праймеров, синтезированных в автоматическом ген-синтезаторе ДНК.

5. Таq-полимераза – термостабильная ДНК-полимераза в буферном растворе, рекомбинантная.

6. дНТФ – водный раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

7. ДНК (положительный контроль) – водный раствор ДНК *V. abortus* 19 ВА.

8.  $10 \times B$  – 10-кратный буферный раствор.

9.  $MgCl_2$  – 1% раствор магния хлорида.

10.  $H_2O$  – вода бидистиллированная.

11. Масло – масло вазелиновое стерильное.

Объектом для исследования может быть клинический материал, объекты внешней среды, органы животных, а также микробные взвеси при идентификации выделенных культур. При работе с клиническим материалом и загрязненными объектами внешней среды необходим предварительный этап подготовки проб (выделение ДНК). Подготовку

проб осуществляют с помощью поставляемого отдельно набора и прилагаемой к нему инструкции.

ПЦР – анализ выполняется в соответствии с санитарными правилами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»; «Методическими указаниями по детекции патогенной микрофлоры в клиническом материале, пищевых продуктах, объектах внешней среды и выполнением генетической идентификации клеток с помощью полимеразной цепной реакции» (Москва, 1996) и «Методическими указаниями по обеззараживанию биологического материала и объектов внешней среды, зараженных бактериями I–IV групп патогенности, при исследованиях методом ПЦР» (Саратов, 2001).

#### **Подготовка к анализу**

Подготовка проб из клинического материала и объектов внешней среды

При анализе крови к образцу объемом 1 мл после забора добавляют 1/10 объема 4%-го раствора цитрата натрия и осторожно перемешивают.

Молоко в количестве 10 мл центрифугируют при 8000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют в дезраствор. Осадок суспендируют в 1 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия.

Смывы с поверхностей берут с помощью стерильного ватного тампона во флакон с 50 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия.

Кусочки органов в количестве 1 г растирают в ступке с 0,5–1,0 г стеклянного порошка, добавляют 1–2 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия. Надосадочную жидкость отбирают через ватный тампон в отдельные пробирки.

Почву в количестве 10 г тщательно перемешивают с 50 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость центрифугируют при 8000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Обеззараживание проводят прогреванием проб, в которые добавлен мертиолят натрия до конечной концентрации 0,01 % при температуре 56 °С в течение 30 мин.

Выделение ДНК из объектов внешней среды осуществляют с помощью набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Выделенную ДНК в объеме 10 мкл используют в ПЦР.

Подготовка проб из чистых культур микроорганизмов

Для исследования чистых культур микроорганизмов готовят бактериальную взвесь клеток, выросших на плотной питательной среде, в 2 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия по стандартному образцу мутно-

сти 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России 10 единиц (ОСО соответствующего года выпуска), что эквивалентно  $1,0 \times 10^9$  м.к. возбудителя бруцеллёза в 1 мл. Затем взвесь разводят 0,9% раствором хлорида натрия до концентрации  $1 \times 10$  м.к./мл и обеззараживают добавлением мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %) и прогреванием при 56 °С в течение 30 мин. После этого 1 мл обеззараженной взвеси переносят в микропробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 50 мкл стерильной бидистиллированной воды, прогревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 1–2 мин. Супернатант в объеме 10 мкл используют для ПЦР.

### ***Проведение анализа***

Реактивы для проведения ПЦР извлекают из холодильника и полностью размораживают при комнатной температуре. Для проведения амплификации ДНК готовят микропробирки объемом 0,6 мл в соответствии с количеством образцов. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с помощью дозаторов переменного объема: 0,5–10, 5–40 и 40–200 мкл. В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл готовят смесь компонентов из расчета на одну пробу в следующей последовательности:  $H_2O$  – 6,8 мкл;  $10 \times B$  – 2,5 мкл; дНТФ – 2,5 мкл;  $MgCl_2$  – 1 мкл, праймер  $Bru31$  – 1 мкл, праймер  $Bru32$  – 1 мкл; Taq-полимераза – 0,2 мкл.

Смесь перемешивают пипетированием и вносят по 15 мкл в заранее маркированные микропробирки. Затем наслаивают по 30 мкл масла и вносят: 10 мкл бидистиллированной воды (в отрицательный контроль), 10 мкл ДНК (положительный контроль), а в остальные – по 10 мкл проб.

Общий (конечный) объем во всех пробирках должен составлять 25 мкл.

Микропробирки помещают в амплификатор и проводят полимеразную цепную реакцию по следующей матричной схеме: предварительная денатурация ДНК при  $94 \pm 0,1$  °С в течение 3 мин. Затем проводят 25 циклов. Каждый цикл амплификации включает в себя: денатурацию ДНК при температуре  $94 \pm 0,1$  °С в течение 40 сек, отжиг праймеров при температуре  $60 \pm 0,1$  °С в течение 40 сек, синтез комплементарной цепи при температуре  $72 \pm 0,1$  °С в течение 40 сек. После последнего цикла пробы прогревают в течение 3 мин при температуре  $72 \pm 0,1$  °С. При необходимости оставить пробы после реакции на ночь, их помещают в холодильник при температуре  $4 \pm 0,1$  °С или вводят дополнительный цикл на амплификаторе  $4 \pm 0,1$  °С 12 ч и более.

После первого этапа амплификации для повышения чувствительности и специфичности реакции проводят вторую стадию. Для этого готовят реакционную смесь из расчета на одну пробу:  $H_2O$  – 15,8 мкл, 10 × Б – 2,5 мкл, дНТФ – 2,5 мкл,  $MgCl_2$ , праймеров Bcu3 и Bcu4 – по 1 мкл каждого и фермента Taq-полимеразы – 0,2 мкл. При постановке второго этапа ПЦР реакционную смесь разливают по 24 мкл в каждую пробирку, наслаивают на нее по капле вазелинового масла и вносят под масло по 1 мкл амплификата, полученного после первого этапа реакции.

Термоциклирование проводят по следующей схеме: 25 циклов, включающих в себя денатурацию при 94 °С – 30 сек, отжиг праймеров при 60 °С – 30 сек и синтез при 72 °С – 30 сек. Заключительный цикл 72 °С – 3 минуты.

К продуктам амплификации (после второго этапа), находящимся в микропробирках после термоциклирования, с помощью микропипетки добавляют по 4 мкл буферного раствора для нанесения проб, перемешивают пипетированием и по 15 мкл переносят в лунки геля. Затем закрывают крышку аппарата, подсоединяют блок питания, включают его и проводят электрофорез.

Электрофорез проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора в течение 30–40 мин при градиенте напряжения 10 В/см до прохождения лидирующего красителя 2/3 длины трека.

С гелем агарозы следует работать в перчатках, поскольку этидиум бромид является мутагеном.

#### **Оценка результатов ПЦР**

По окончании электрофореза агарозный гель извлекают из камеры и помещают на 10 мин в ванночку с раствором бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл для окрашивания ПЦР-продуктов.

Результат проведения ПЦР регистрируют и документируют в проходящем ультрафиолете с использованием документирующей видео-системы или зеркального фотоаппарата с пленкой типа «Микрат» 300.

Результаты оценивают по наличию фрагментов ДНК, полосы которых располагаются на том же уровне в геле, что и полосы в положительном контроле с препаратом ДНК. Фрагмент ДНК *Brucella spp.* после второго этапа ПЦР имеет размер 175 н.п.

Отрицательный контроль: полоса на уровне положительного контроля должна отсутствовать; наличие полосы свидетельствует о контаминации компонентов тест-системы.

Наличие полос, располагающихся выше или ниже контрольной, является неспецифичным ответом и во внимание не принимается.

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

Для определения видовой принадлежности выделенных штаммов бруцелл используют ПЦР с видоспецифичными праймерами. Для выявления и дифференциации штаммов возбудителя бруцеллёза методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени могут быть использованы зарегистрированные в установленном порядке тест-системы, например, «Бру-Диф-РГФ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), «ОМ-скрин-Бруцеллез-РВ» (ООО «Синтол»).

## 10. Определение чувствительности бруцелл (*Brucella* spp.) к антибактериальным препаратам

### 10.1. Контрольные штаммы.

В качестве контрольных для определения антибиотикочувствительности бруцелл предлагается использовать штамм *Escherichia coli* ATCC 25922 и вакцинный штамм *B. abortus* 19 BA (для контроля качества питательных сред, качества дисков, стандартизации определения антибиотикограммы). Диапазоны значений минимальной подавляющей концентрации (МПК) и зон подавления роста для контрольных штаммов представлены в таблицах 9 и 10.

### 10.2. Питательные среды.

В качестве оптимальных питательных сред для выращивания и определения антибиотикочувствительности штаммов возбудителя бруцеллёза трех видов (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*) предлагается использовать:

1. Агар Мюллера-Хинтона (рН  $7,3 \pm 0,2$ ).
2. Агар Мюллера-Хинтона с добавлением следующих ростовых компонентов (г/л среды):  $MgSO_4 - 0,05$ ;  $FeSO_4 - 0,1$ ; L-цистеин – 0,6; лимоннокислый натрий – 1,2; KCl – 2;  $K_2HPO_4 - 4$ ; глюкоза – 15. Стерильные (кипячение 20 мин) ростовые добавки вносят в растопленный и остуженный агар перед разливанием его в чашки Петри.
3. Эритрит агар.
4. Эритрит агар с добавлением вышеперечисленных ростовых компонентов.
5. Агар LB (г/л): триптон Васто – 10; дрожжевой экстракт Васто – 5; NaCl – 10 с добавлением ростовых добавок (п. 2).

Использование среды Мюллера-Хинтона и эритрит агара без ростовых добавок позволяет проводить учет результатов через 48 ч; добавление в перечисленные среды ростовых добавок сокращает срок учета до 24 ч.

Целесообразность включения в работу разнообразных питательных сред определяется различными техническими и материальными возможностями лабораторий, допущенных к исследованию возбудителя бруцеллёза.

Перед использованием питательных сред для контроля их качества и используемых дисков необходимо провести определение соответствия значений МПК и диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов микроорганизмов (табл. 9 и 10).

### **10.3. Антибактериальные препараты.**

Для определения чувствительности/устойчивости возбудителя бруцеллёза используют антибактериальные препараты, применяемые для профилактики и лечения бруцеллёза.

Препараты первого ряда – основные препараты, к которым проводят определение чувствительности бактерий: гентамицин, стрептомицин, доксициклин, рифампицин, цiproфлоксацин (офлоксацин, пефлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин).

Препараты второго ряда, чувствительность/устойчивость к которым может определяться для дополнительного выбора средств этиотропной терапии и эпидемиологического надзора за антибиотикочувствительностью/устойчивостью: амикацин, канамицин, тетрациклин, налидиксовая кислота.

Для метода серийных разведений (МСП) в плотной питательной среде готовят серии двукратно увеличивающихся концентраций антибактериальных препаратов, ориентируясь на пограничные значения МПК для чувствительных и устойчивых штаммов бруцелл на рекомендуемых питательных средах.

#### *Препараты первого ряда:*

Гентамицин, стрептомицин 4 – 8 – 16 – 32 мг/л.

Цiproфлоксацин 2 – 4 – 8 – 16 мг/л (или офлоксацин, пефлоксацин, ломефлоксацин 4 – 8 – 16 – 32 мг/л; или левофлоксацин 1 – 2 – 4 – 8 мг/л).

Доксициклин 2 – 4 – 8 – 16 – 32 мг/л.

Рифампицин 2 – 4 – 8 – 16 мг/л.

#### *Препараты второго ряда:*

Амикацин, канамицин 8 – 16 – 32 – 64 мг/л.

Тетрациклин 2 – 4 – 8 – 16 мг/л.

Налидиксовая кислота 16 – 32 – 64 – 128 мг/л.

С целью экономии времени и средств для проведения исследования могут применяться штампы-репликаторы, позволяющие проводить изучение 25–50 штаммов одновременно с включением контрольного антибиотикочувствительного штамма. При определении антибиотикограмм бактерий диско-диффузионным методом (ДДМ) используют проверенные коммерческие диски с определенными концентрациями антибактериальных препаратов.



#### 10.4. Посевная доза, инокуляция, инкубация.

При определении чувствительности с помощью ДДМ используют суспензию микробных клеток в 0,85%-м растворе хлорида натрия, приготовленную из 24 ч агаровой культуры возбудителя. Суспензию стандартизируют по стандартному образцу мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России 5 единиц (ОСО соответствующего года выпуска). ( $\sim n \times 10^8$  КОЕ/мл). Суспензию наносят на поверхность агара в объеме 0,3 мл ( $n \times 10^7$  КОЕ), равномерно распределяют шпателем и выдерживают до полного впитывания в агар. После этого накладывают диски (не более 6 на чашку диаметром 100 мм). Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24–48 ч. Результаты учитывают только в случае появления сливного роста на контрольных чашках (без дисков). Диаметр зон задержки роста бактерий вокруг дисков (включая диаметр самого диска) измеряют с точностью до 1 мм линейкой-лекалом или штангенциркулем.

Для МСР используют суспензию той же концентрации м.к./мл, которую наносят небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки (посевная доза  $n \times 10^5$ – $10^6$  КОЕ) на чашки с питательной средой, содержащей различные концентрации антибактериальных препаратов, начиная с чашки с минимальным содержанием антибиотика. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24–48 ч. Использование среды Мюллера-Хинтона и эритрит агара без ростовых добавок позволяет проводить учет результатов через 48 ч; добавление в перечисленные среды ростовых добавок сокращает срок учета до 24 ч. Учет результатов проводят при наличии роста культуры на контрольных чашках (без антибиотика). Чувствительность/устойчивость культур оценивают по минимальной концентрации препарата, подавляющей рост микробов (МПК, мг/л).

#### 10.5. Критерии оценки чувствительности/устойчивости возбудителя бруцеллёза к антибактериальным препаратам.

Интерпретацию оценки определения чувствительности штаммов *Brucella* проводят в соответствии с пограничными значениями МПК и диаметрами зон задержки роста для чувствительных и устойчивых культур (табл. 11), адаптированными именно для этого вида микробов, на конкретной питательной среде с учетом диапазона значений для 20 штаммов бруцелл (табл. 12).

Увеличение значений МПК препаратов или же уменьшение диаметров зон подавления роста изучаемых штаммов возбудителя бруцеллёза по сравнению с этими показателями для контрольных штаммов (табл. 9, 10) может свидетельствовать о тенденции к нарастанию устойчивости микроорганизмов и требует использования максимальных терапевтических доз и удлинения сроков их применения.



Таблица 9

**Допустимые колебания значений МПК антибактериальных препаратов  
для контрольных штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922  
и *Brucella abortus* 19 VA**

Антибактериальный препарат	Диапазон значений МПК, мг/мл					
	Агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками (или без них) рН 7,3 ± 0,2		Агар LB с ростовыми добавками рН 7,1 ± 0,1		Эритрит-агар с ростовыми добавками (или без них) рН 7,2 ± 0,2	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 VA	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 VA	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 VA
Гентамицин	2–4	1–2	2–4	1–2	2–4	2–4
Амикацин	4–8	2–4	4–8	2–4	4–8	4–8
Канамицин	4–8	2–4	4–8	2–4	4–8	4–8
Стрептомицин	4–8	2–4	4–8	1–2	4–8	2–4
Доксициклин	0,5–2,0	1–2	1–4	2–4	1–4	1–2
Тетрациклин	0,5–2,0	1–2	1–4	1–2	1–4	1–2
Налидиксовая кислота	1–4	8–16	1–4	8–16	1–4	8–16
Ципрофлоксацин	0,016–0,032	0,05–1,0	0,016–0,032	1–2	0,016–0,032	1–2
Офлоксацин	0,06–0,12	1–2	0,06–0,12	1–2	0,06–0,12	2–4
Пефлоксацин	0,06–0,12	2–4	0,06–0,12	2–4	0,06–0,12	2–4
Ломефлоксацин	0,12–0,5	2–4	0,12–0,5	2–4	0,12–0,5	2–4
Левифлоксацин	0,012–0,03	0,5–1,0	0,012–0,03	0,25–0,5	0,012–0,03	0,5–1,0
Рифампицин	4–16	1–2	4–16	1–2	4–16	2–4

Таблица 10

**Допустимые колебания значений диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Brucella abortus* 19 VA**

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		Агар Мюллера-Хинтона с ростовыми добавками (или без них) рН 7,3 ± 0,1		Агар LB с ростовыми добавками рН 7,1±0,1		Эритрит агар с ростовыми добавками (или без них) рН 7,2±0,1	
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 VA	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 VA	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 VA
Гентамицин	10	15–25	20–25	15–25	20–25	15–25	20–25
Амикацин	30	15–25	20–25	15–25	20–25	15–25	20–25
Канамицин	30	15–25	20–25	15–25	20–25	15–25	20–25
Стрептомицин	30	15–25	20–25	15–25	20–25	15–25	20–25
Доксициклин	10	16–20	20–25	16–20	20–25	16–20	20–25
Тетрациклин	30	16–20	25–30	16–20	25–30	16–20	25–30
Налидиксовая кислота	30	22–28	15–20	22–28	15–20	22–28	15–20
Ципрофлоксацин	5	30–35	25–30	30–35	25–30	30–35	25–30
Офлоксацин	5	25–30	25–30	25–30	25–30	25–30	25–30
Перфлоксацин	10	25–30	25–30	25–30	25–30	25–30	25–30
Ломефлоксацин	10	25–30	25–30	25–30	25–30	25–30	25–30
Левифлоксацин	5	25–30	25–30	25–30	25–30	25–30	25–30
Рифампицин	5	8–10	20–25	8–10	20–25	8–10	20–25

Таблица 11

**Критерии интерпретации результатов определения чувствительности штаммов *Brucella spp.*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и величин МПК (мг/л) антибактериальных препаратов**

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
Гентамицин	10	≥ 20	≤ 15	≤ 8	≥ 32
Амикацин	30	≥ 20	≤ 15	≤ 16	≥ 64
Канамицин	30	≥ 20	≤ 15	≤ 16	≥ 64
Стрептомицин	30	≥ 20	≤ 15	≤ 8	≥ 32
Доксициклин	10	≥ 20	≤ 15	≤ 4	≥ 32
Тетрациклин	30	≥ 25	≤ 20	≤ 4	≥ 16
Налидиксовая кислота	30	≥ 15	≤ 10	≤ 32	≥ 128
Ципрофлоксацин	5	≥ 30	≤ 25	≤ 4	≥ 16
Офлоксацин	5	≥ 25	≤ 20	≤ 8	≥ 32
Пефлоксацин	10	≥ 25	≤ 20	≤ 8	≥ 32
Ломефлоксацин	10	≥ 25	≤ 20	≤ 8	≥ 32
Левифлоксацин	5	≥ 30	≤ 25	≤ 2	≥ 4
Рифампицин	5	≥ 15	≤ 10	≤ 8	≥ 16

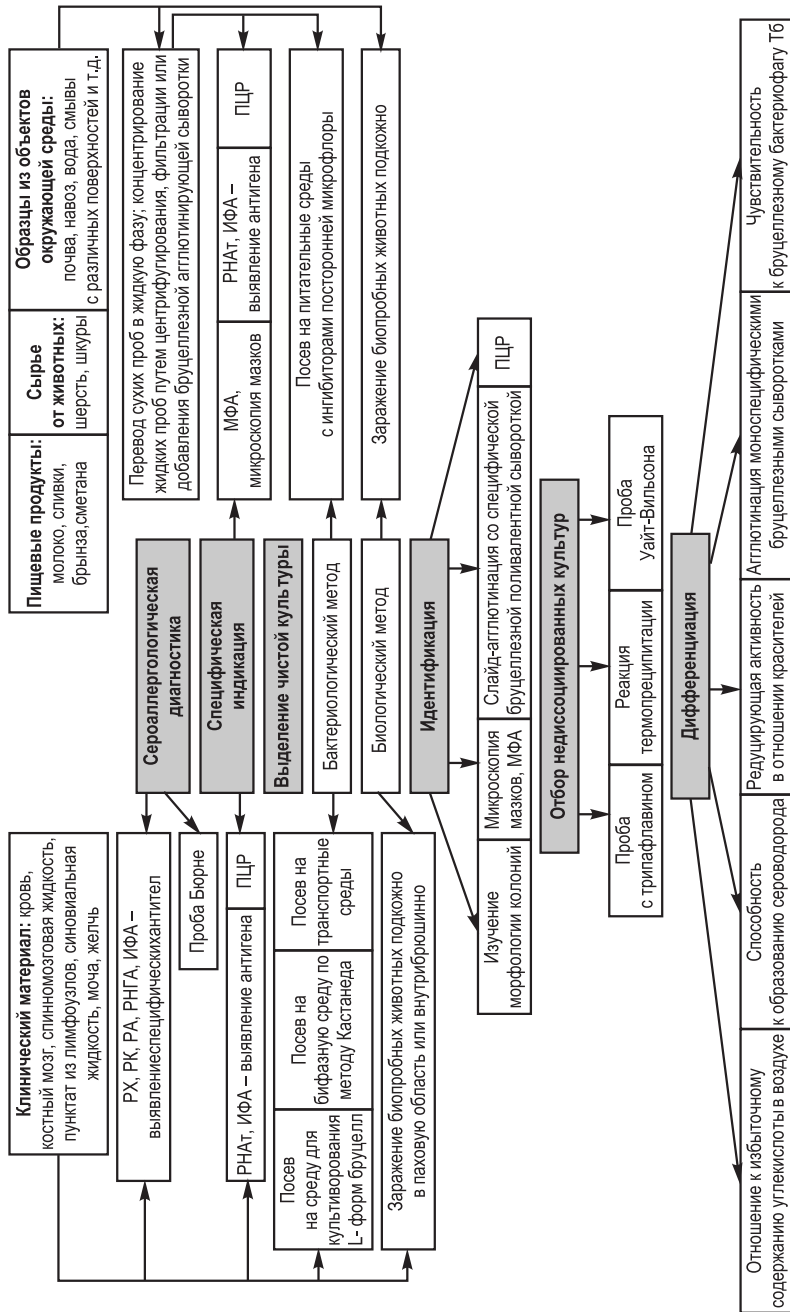
**Примечание:** S\* – чувствительный; R\* – устойчивый; значения МПК для штаммов с промежуточной устойчивостью находятся между значениями для S и R культур.

Таблица 12

**Диапазон значений МПК антибактериальных препаратов и диаметров зон подавления роста для 20 антибиотикочувствительных штаммов *Brucella spp.***

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			Значение МПК, мг/л		
		Агар Мюллера–Хинтона с ростовыми добавками (или без них) рН 7,3 ± 0,2	Агар LB с ростовыми добавками (или без них) рН 7,1 ± 0,1	Эритрит-агар с ростовыми добавками (или без них) рН 7,2 ± 0,2	Агар Мюллера–Хинтона с ростовыми добавками (или без них) рН 7,3 ± 0,2	Агар LB с ростовыми добавками (или без них) рН 7,1 ± 0,1	Эритрит агар с ростовыми добавками (или без них) рН 7,2 ± 0,2
Гентамицин	10	20–30	20–30	20–30	1–4	1–2	1–4
Амикацин	30	20–30	20–30	20–30	2–4	2–4	4–8
Канамицин	30	20–30	20–30	20–30	2–4	2–4	4–8
Стрептомицин	30	20–25	20–25	20–25	1–4	0,5–2,0	2–4
Доксициклин	10	20–30	20–30	20–30	0,5–2,0	0,5–4,0	0,5–2,0
Тетрациклин	30	25–30	25–30	25–30	0,5–2,0	0,5–2,0	1–2
Налидиксовая кислота	30	15–20	15–20	15–20	8–16	15–20	15–20
Ципрофлоксацин	5	30–35	30–35	28–35	0,25–1,0	0,5–2,0	0,5–2,0
Офлоксацин	5	30–35	30–35	27–35	0,5–2,0	1–2	1–2
Перфлоксацин	10	30–35	30–35	27–35	1–4	1–4	2–4
Ломефлоксацин	10	25–35	25–35	25–35	2–8	2–8	2–8
Левифлоксацин	5	30–35	30–35	30–35	0,5–1,0	0,25–0,5	0,5–1,0
Рифампицин	5	15–25	15–25	15–25	1–2	1–2	2–4

### 11. Схема лабораторной диагностики бруцеллёза



## ЛИТЕРАТУРА

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
2. Белозеров Е.С. Бруцеллез. – М.: Медицина, 1985. – 183 с.
3. Бруцеллез / Под ред. П.А. Вершиловой. – М., 1972. – 439 с.
4. Вейде А.А., Швецова Р.И., Татарина В.К., Константинова М.А. и др. Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике бруцеллёза. – Иркутск, 1988. – 52 с.
5. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология. – М.: ИЦ Академия, 2006. – 464 с.
6. Губина Е.А., Толмачева Т.А. Испытание различных питательных сред при изучении антибиотикочувствительности бруцелл // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1985. – Т. 11. – С. 839–842.
7. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации особо опасных инфекций бактериальной природы. – М.: [б.и.], 2012. – 415 с.
8. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. академика РАМН профессора Г.Г. Онищенко, акад. РАМН В.В. Кутырева. – 2013. – 560 с.
9. Лабораторная диагностика инфекционных болезней: справочник / Под ред. В.И. Покровского, М.Г. Твороговой, Г.А. Шипулина. – М.: «Изд-во БИНОМ», 2016. – 648 с.
10. МУК 4.2.3010-12. «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллёза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».
11. МУК 3.1.7.1189-03. «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллёза людей».
12. МУК 3.1.7.3402-16. «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллёза».
13. МУК 4.2.2495-09. «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллёз, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам».
14. МУК 3.3.2.2124-06. «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллёза, легионеллеза».

15. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Пономаренко Д.Г. и др. Бруцеллез. Современное состояние проблемы / Под ред. акад. РАН Г.Г. Онищенко, акад РАН А.Н. Куличенко. – Ставрополь: ООО «Губерния», 2019. – 336 с.

16. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – 4-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.

17. Руководство по медицинской микробиологии / В 2-х т. под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Володиной. – М.: Изд-во БИНОМ, 2008 (2010).

18. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: Медицина, 2005. – 600 с.

19. Чернышева М.И. Использование кислого антигена роз-бенгал в пластинчатой реакции агглютинации при бруцеллёзе у людей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1980. – № 6. – С. 84–88.

**РУКОВОДСТВО  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА**

**Учебное пособие  
для врачей-бактериологов**

Корректор *Булкина С.В.*  
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*  
Художник *Фалеев К.А.*

---

Сдано в набор 02.06.2022. Подписано в печать 28.06.2022. Бумага офсетная.  
Формат 60x84<sup>1/16</sup>. Гарнитура Cambria.  
Усл. печ. л. 4,3. Тираж 130 экз. Заказ № 027-22.

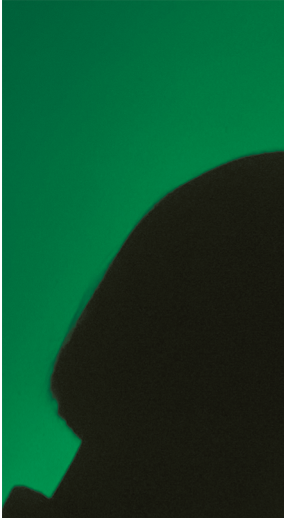
---

ИНЦХТ  
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.  
E-mail: arleon58@gmail.com





УЧЕБНЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ



ISBN 978-5-98277-365-4



9 785982 773654