

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
БРУЦЕЛЛЕЗА И ГЕНОМНЫЙ МОНИТОРИНГ БРУЦЕЛЛ**

Методические указания
МУ 3.1/4.2. 4145 -25

Москва 2025

Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика бруцеллеза и геномный мониторинг бруцелл. МУ 3.1/4.2. 4145-25

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Ежлова Е.Б., Очкасова Ю.В., Игонина Е.П., Иришкова И.Е., Скударева О.Н.); ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Ковалев Д.А., Кондратьева Ю.В., Хачатурова А.А., Жаринова И.В., Костюченко М.В., Кузнецова И.В., Писаренко С.В., Курноскина М.М., Курилова А.А.); ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Кутырев В.В., Абдрашитова А.С., Шарова И.Н., Осина Н.А., Сеничкина А.М., Билько Е.А., Портенко С.А., Дмитриева Л.Н., Щербакова С.А.); ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Балахонов С.В., Дугаржапова З.Ф., Таликина Т.О., Толмачева М.И., Вишняков В.А.); ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (Транквилевский Д.В.).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой «11» апреля 2025 г.

3. МУ 3.1/4.2. 4145 -25 введены взамен МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 10.11.2016; МУК 4.2.3010-12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 29.03.2012; пункта 6.4 МУК 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 17.08.2006; главы 10 МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 01.04.2009.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации



А.Ю. Попова

«11» апреля 2025 г.

Дата введения «11» ноября 2025 г.

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
БРУЦЕЛЛЕЗА И ГЕНОМНЫЙ МОНИТОРИНГ БРУЦЕЛЛ**

Методические указания
МУ 3.1/4.2. 4145-25

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУ) описывают алгоритм организации эпидемиологического надзора в отношении бруцеллеза, а также организационные и методологические принципы лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней.

1.2. Настоящие МУ предназначены для специалистов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, а также могут быть использованы специалистами органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации в сфере охраны здоровья и медицинских организаций (далее – МО), осуществляющих лабораторную диагностику бруцеллеза, независимо от их организационно-правовой формы и формы собственности.

II. Общие положения

2.1. Характеристика болезни и возбудителя бруцеллеза.

2.1.1. Бруцеллез (лат. *brucellosis*) – инфекционно-аллергическое заболевание, характеризующееся множественными механизмами передачи возбудителя, формированием антропоургических очагов, волнообразным рецидивирующим течением инфекционного процесса, склонностью к хронизации, протекающее с преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата, сердечно-сосудистой, нервной и половой систем. Восприимчивость человека к бруцеллезу высокая. Заболевание начинается, как правило, с острой лихорадки (характерны подъемы температуры в вечерние и ночные часы) в течение 7 – 10 дней и более, иногда температура держится до 2 – 3 месяцев. Лихорадка сопровождается ознобами, обильной потливостью и общими симптомами недомогания. Для бруцеллеза характерно относительно удовлетворительное самочувствие больного на фоне высокой температуры. Позже проявляются симптомы поражения опорно-двигательного аппарата, сердечно-сосудистой, нервной и других систем организма. Хроническое течение инфекции может приводить к инвалидизации больного.

Инкубационный период заболевания у человека составляет 1 – 4 недели, при латентной инфекции – до 2 – 3 месяцев.

Бруцеллез человека распространен во всем мире, наиболее широко – в странах Восточного Средиземноморья и Африки, Центральной и Юго-Восточной Азии.

Синонимы: мальтийская лихорадка, волнообразная лихорадка, ундулирующая лихорадка, средиземноморская лихорадка, лихорадка Кипра, лихорадка Гибралтара, септицемия Брюса, болезнь Банга.

2.1.2. В соответствии с Международной статистической классификацией болезней, бруцеллез (A23) относится к подклассу «Некоторые бактериальные зоонозы» (A20-A28) класса I «Некоторые инфекционные и паразитарные заболевания» (A00-B99)¹. Различают следующие формы:

- A23.0 Бруцеллез, вызванный *Brucella melitensis*;
- A23.1 Бруцеллез, вызванный *Brucella abortus*;
- A23.2 Бруцеллез, вызванный *Brucella suis*;
- A23.3 Бруцеллез, вызванный *Brucella canis*;
- A23.8 Другие формы бруцеллеза;
- A23.9 Бруцеллез неуточненный.

2.1.3. Согласно данным Международного комитета по систематике прокариот², бруцеллы относятся к домену Бактерии (*Bacteria*), типу – Протеобактерии (*Proteobacteria*), классу – Альфа-протеобактерии (*Alphaproteobacteria*), порядку – Ризобиевые (*Rhizobiales*), семейству – *Brucellaceae*, роду – *Brucella* (*B.*). Бруцеллы относятся к микроорганизмам II группы

¹ Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем (10-й пересмотр) (МКБ-10): mkb-10.com/index.php?pid=140 (в свободном доступе).

² Официальный сайт Международного комитета по систематике прокариот (англ. International Committee on Systematics of Prokaryotes, далее – ICSP): the-icsp.org (в свободном доступе).

патогенности³.

Род *Brucella* насчитывает более 25 видов⁴, различающихся по генетическим, биохимическим, антигенным и вирулентным характеристикам. Эпизоотологическое значение имеют: *Brucella melitensis* (далее – *B. melitensis*) (представлен 3 биоварами, основной хозяин – мелкий рогатый скот (козы и овцы), *Brucella abortus* (далее – *B. abortus*) (7 биоварами, основной хозяин – крупный рогатый скот), *Brucella suis* (далее – *B. suis*) (представлен 5 биоварами, носители – свиньи (1, 2, 3 биовары), зайцы (2 биовар), северные олени (4 биовар), мелкие млекопитающие, в основном грызуны (5 биовар), *Brucella neotomae* (далее – *B. neotomae*) (пустынные кустарниковые крысы), *Brucella ovis* (далее – *B. ovis*) (бараны), *Brucella canis* (далее – *B. canis*) (собаки), *Brucella ceti* (далее – *B. ceti*) (китообразные), *Brucella pinnipedialis* (далее – *B. pinnipedialis*) (ластоногие), *Brucella microti* (далее – *B. microti*) (серые полевки), *Brucella inopinata* (далее – *B. inopinata*) (основной хозяин не установлен), *Brucella papionis* (далее – *B. papionis*) (бабуины *Papio* spp.), *Brucella vulpis* (далее – *B. vulpis*) (обыкновенная лисица *Vulpes vulpes*).

2.1.4. К патогенным для человека бруцеллам, способным вызывать заболевание, относятся возбудители бруцеллеза: *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* биовары 1 – 4, реже – *B. canis*, *B. suis* биовар 5, *B. neotomae*, *B. ceti* и *B. pinnipedialis*, *B. inopinata*.

2.1.5. Бруцеллы не образуют спор и капсул, обладают высокой инвазивностью, способны проникать в организм через неповрежденные слизистые оболочки и микротравмы на коже. Возбудители бруцеллеза не проявляют «прямой» агрессии в отношении клеток хозяина – не синтезируют экзотоксины, экзопротеазы, цитолизины или другие агрессивные для макроорганизма субстанции. У бруцелл выделено более 250 белковых детерминант патогенности, обеспечивающих реализацию стратегии «скрытого» проникновения в макроорганизм, ингибирования факторов естественной резистентности и уклонения от адаптивного иммунитета: например, система секреции IV типа (*T4SS*), сенсорно-регуляторная система адаптации (*BvrS/BvrR*), периплазматический циклический β -1,2-глюкан (*C β G*), периплазматические белки *EipA*, *EipB*, липополисахарид, белки *VtpA/Vtp1/TcpB*, модифицированный флагеллин, уреаза, каталаза, Cu-Zn-SOD (супероксиддисмутаза), мембранные белки (*Omp*).

2.1.6. Бруцеллы всех видов мало отличаются друг от друга по морфологическим признакам. В мазках, окрашенных по Граму, бруцеллы представляют собой грамотрицательные полиморфные бактерии шаровидной, овоидной или палочковидной формы, расположенные одиночно, парами, короткими цепочками, небольшими скоплениями. Размеры микробной клетки в среднем составляют 0,3 – 0,6 мкм для кокковых и 0,5 – 0,7 × 0,6 – 1,5 мкм – для палочковидных форм.

³ Пункт 1166 СанПиН 3.3686-21.

⁴ База данных наименований и таксономии прокариот (англ. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, LPSN): https://lpsn-dsmz-de.translate.goog/genus/brucella?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=ru&_x (в свободном доступе).

У бруцелл описаны и L-формы, которые в ряде случаев выделяются из крови больных, прошедших курс лечения антибактериальными препаратами (далее – АБП), через 1 месяц и спустя 4–6 месяцев после окончания курса лечения АБП, а также больных хронической формой бруцеллеза в период обострения (особенно при субфебрилитете) перед началом лечения.

2.1.7. Бруцеллы – аэробы или микроаэрофилы, в анаэробных условиях не растут. Они относятся к гетеротрофным микроорганизмам и способны расти на многих питательных средах. Для культивирования возбудителя бруцеллеза необходимо наличие α -аланина, α -лизина, α -гистидина, α -метионина, α -цистеина. Особыми питательными потребностями обладают культуры вида *B. ovis*, для успешного культивирования которых обязательно внесение в состав среды 10 % нормальной кроличьей сыворотки или аминокептида.

2.1.8. Температурный оптимум для роста составляет $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$; pH 7,0–7,2; хорошо растут на питательных средах с добавлением сыворотки или крови. Особенностью *B. abortus* и *B. ovis* является потребность в повышенном содержании углекислого газа (далее – CO_2) 5–10 % в атмосфере культивирования.

Для бруцелл характерен медленный рост, особенно в первых генерациях. На плотных питательных средах колонии бруцелл мелкие, круглые, выпуклые, гомогенные, в падающем свете белесоватые, в проходящем – прозрачные с янтарным оттенком, иногда с нежной зернистостью в центре, с гладкой поверхностью (S-формы) или шероховатые (R-формы). С возрастом нежные и прозрачные вначале колонии мутнеют, в бульонных средах образуют равномерное помутнение.

2.1.9. Возбудитель бруцеллеза обладает устойчивостью к воздействию окружающей среды, характерной для неспорообразующих бактерий, способен длительное время сохраняться в различных субстратах. Во влажной среде при температуре плюс 55°C возбудитель бруцеллеза погибает через 60 мин, при температуре плюс 60°C – через 30 мин, при температуре плюс 70°C – через 10 мин, при кипячении – моментально. Сухой жар (температура плюс 90 – 95°C) убивает бруцелл в течение часа. Под действием солнечного света бруцеллы погибают в сроки от нескольких минут до 7–8 дней в зависимости от интенсивности инсоляции и атмосферных условий. В естественных условиях во влажной почве и в навозе бруцеллы могут сохранять жизнеспособность свыше 2 месяцев. В условиях заморозки возбудитель остается жизнеспособным в течение всего срока хранения.

2.1.10. В молочных продуктах, хранящихся в условиях холодильника, бруцеллы сохраняют свою жизнеспособность: в сыром молоке – до 10 дней, сливочном масле – более 4 недель, домашнем сыре – до 3 недель, брынзе – до 45 дней; простокваше, сметане – до 8–15 дней, кумысе, шубате (сброженное верблюжье молоко) – до 3 суток. В мясе возбудитель бруцеллеза сохраняется до 12 дней; во внутренних органах, костях и лимфатических узлах инфицированных туш – в течение 1 месяца и более; в овечьей шерсти, смушках – до 4 месяцев. Бактерии остаются жизнеспособными длительное время в условиях засолки – до 130 дней. В замороженных инфицированных мясных и молочных продуктах

бруцеллы остаются жизнеспособными в течение всего срока хранения.

2.1.11. Возбудитель бруцеллеза чувствителен к различным дезинфицирующим средствам (далее – ДС). Выраженной бактерицидной активностью по отношению к бруцеллам обладают: 0,5 – 3,0 % раствор хлорамина, 3 % раствор перекиси водорода и 1,0 – 4,0 % формалина, 0,02 – 0,3 % (по сумме активных дезинфицирующих веществ (ДВ) растворы ДС на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), триамина и полигексаметиленгуанидина (ПГМГ).

Режимы обеззараживания материала, содержащего возбудитель бруцеллеза, определены санитарно-эпидемиологическими требованиями⁵.

2.2. Эпидемиологические особенности бруцеллеза.

2.2.1. Основными источниками бруцеллезной инфекции для человека являются больные бруцеллезом животные: овцы, козы, крупный рогатый скот, свиньи. Заражение людей бруцеллезом также возможно от северных оленей, собак, лошадей, верблюдов, яков, кошек, пушных животных в звероводческих хозяйствах и других животных. Наибольшую опасность больные животные представляют во время абортотв и в период родов, когда с плацентой, околоплодными водами, отделяемым родовых путей и плодов во внешнюю среду выделяется огромное количество возбудителя. Микробы выделяются во внешнюю среду не только во время родов, но и с молоком, мочой, испражнениями в течение длительного времени.

2.2.2. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют неблагополучные по бруцеллезу овцеводческие и козоводческие хозяйства с циркуляцией высокопатогенного для человека возбудителя вида *B. melitensis* и хозяйства по разведению крупного рогатого скота (основной хозяин вида *B. abortus*). Заражение человека возможно на свиноводческих фермах, на которых регистрируется, как правило, спорадическая заболеваемость. Установлена возможность миграции бруцелл с одного вида животных на другой (особенно опасна миграция *B. melitensis* на крупный рогатый скот).

2.2.3. Передача бруцеллезной инфекции от человека к человеку эпидемиологического значения практически не имеет, однако отмечены единичные случаи внутриутробного инфицирования плода (трансплацентарный путь), передачи инфекции от больной бруцеллезом матери ребенку во время родов, при кормлении новорожденных грудью, при переливании крови, трансплантации костного мозга, половым путем и нозокомиальное заражение медицинского персонала.

2.2.4. Основные механизмы и пути передачи возбудителя бруцеллеза человеку: контактный (при прямом попадании возбудителя на поврежденные кожные покровы и неповрежденные слизистые оболочки), фекально-оральный (алиментарный и контактно-бытовой пути) и аэрозольно-аспирационный (воздушно-пылевой, воздушно-капельный пути).

Заражение контактным механизмом передачи происходит при уходе за больными бруцеллезом животными, во время оказания им помощи при родах,

⁵ Таблица 6 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

абортах, задержке последа, когда проводят ручное отделение плаценты, при работе с продуктами и сырьем животного происхождения (шерсть, смушки и кожа), кормлении. В таких случаях инфицирование людей происходит через микротравмы на кожных покровах и контактно-бытовым путем (через загрязненные руки, предметы обихода). Проникновение бруцелл может произойти через слизистые глаз, носа, ротовой полости при несоблюдении мер личной профилактики.

Инфицирование людей возбудителем бруцеллеза алиментарным путем происходит при употреблении молока, кисломолочных продуктов, мяса и мясных продуктов, полученных от больных бруцеллезом животных и не прошедших достаточную термическую обработку. Высокую опасность представляют сырое молоко и молочные продукты из сырого молока (например, брынза, сливки, сметана, кумыс), которые являются причиной инфицирования людей, профессионально не связанных с животноводством (особенно жителей городов).

Воздушно-пылевой путь заражения реализуется при ингаляции воздушно-пылевой смеси, содержащей контаминированные бруцеллами фрагменты шерсти, навоза, земли, подстилки при стрижке шерсти, сборе пуха, уборке скотных дворов, обработке шкур, убое скота и других производственных процессах, связанных с уходом за больными животными, или при обработке продуктов и сырья, полученных от них.

Инфицирование людей возбудителем бруцеллеза воздушно-капельным путем может происходить при образовании мелкокапельной водной дисперсии в воздухе при использовании автоматических моек высокого давления во время мытья загонов, раскола, станков для фиксации животных и мест для содержания скота, а также транспорта, перевозившего больных бруцеллезом животных.

Лабораторное заражение людей возможно воздушно-капельным путем при манипуляциях с патогенными штаммами бруцелл (центрифугирование, пересевы, биологические аварии с разбрызгиванием), когда образуется аэрозоль, контаминированный возбудителем и контактным путем при нарушениях требований биологической безопасности при работе с возбудителями I – II групп патогенности⁶.

2.2.5. Для заболевания людей, вызванного *B. melitensis*, характерна весенне-летняя сезонность, что связано с инфицированием в сезон окота овец, коз и уходом за животными в послеродовой период. Кроме того, увеличение количества случаев заболевания может регистрироваться в осенне-зимний период, что связано с участием заболевших в работах по массовому убою мелкого рогатого скота (овец) и первичной переработке животноводческого сырья. При заражении людей возбудителем вида *B. abortus* сезонность менее выражена из-за длительного периода лактации коров (факторы передачи – молоко и молочные продукты) и наличия первично-хронических форм бруцеллеза (зачастую начало заболевания установить не удается). Случаи заболевания могут выявляться в течение всего года.

2.2.6. Для бруцеллеза, вызванного бруцеллами вида *B. abortus* (основной

⁶ Главы IV и XIII СанПиН 3.3686-21.

хозяин – крупный рогатый скот) характерно более мягкое, малосимптомное клиническое течение на ранних сроках заболевания, возможно латентное течение инфекции и удлинение сероконверсии до 2 – 3 месяцев после инфицирования. Эту особенность необходимо учитывать при планировании динамического обследования на бруцеллез контактных лиц в эпизоотических очагах бруцеллеза крупного рогатого скота.

2.2.7. После перенесенного заболевания в сыворотке крови в течение двух и более лет могут сохраняться антитела к антигенам возбудителя бруцеллеза и другие иммунологические маркеры инфекции (иммунологическая реактивность, сенсбилизация). Приобретенный после перенесенного заболевания иммунитет не предотвращает повторного заболевания. Применение вакцины бруцеллезной живой сухой из штамма *B. abortus* 19 ВА создает иммунитет продолжительностью до 8 – 10 месяцев⁷ против видов бруцелл, имеющих наибольшее эпидемиологическое значение: *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*.

2.2.8. Бруцеллез поражает население всех возрастных групп, однако преимущественно болеют лица трудоспособного возраста. Заболеваемость бруцеллезом часто носит профессиональный характер и регистрируется среди лиц, имеющих контакт с больными животными или сырьем животного происхождения. К группам профессионального риска относятся работники животноводческих (звероводческих) хозяйств (ферм), мясо-, молокоперерабатывающих и других предприятий по переработке продуктов и сырья животного происхождения, убойных пунктов, пунктов стрижки, купки овец; чабаны, пастухи, доярки, зооинженеры и специалисты в области ветеринарии, персонал бактериологических лабораторий, работающих с живыми культурами бруцелл и лабораторными животными, зараженными возбудителем бруцеллеза.

2.2.9. Повышенный риск инфицирования возбудителем бруцеллеза имеется у населения, проживающего на энзоотичной по бруцеллезу территории: у владельцев сельскохозяйственных животных и лиц, занятых уходом за животными; лиц, употребляющих пищевые продукты животного происхождения без ветеринарных сопроводительных документов, приобретенные с рук, на стихийных точках торговли и рынках, а также полученные от зараженных бруцеллезом животных: сырое молоко, кисломолочные продукты (брынза, сливки, сметана, кумыс и другие), термически необработанное и недостаточно обработанное мясо и мясопродукты.

III. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом

3.1. В рамках эпидемиологического надзора за бруцеллезом проводится непрерывное наблюдение за динамикой эпидемических проявлений инфекции и эпизоотологической ситуацией, а также за факторами и условиями, способствующими циркуляции возбудителя с целью своевременной разработки комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий и принятия управленческих решений.

⁷ Инструкция по применению Вакцины бруцеллезной живой сухой.

3.2. При осуществлении федерального государственного санитарно-эпидемиологического контроля (надзора) проводится⁸:

– мониторинг заболеваемости людей бруцеллезом, ее территориального распространения и заболеваемости отдельных групп населения (сельского, городского, по возрастным и профессиональным группам), с учетом клинических форм болезни, регистрации вспышек, состояния иммунопрофилактики среди контингентов риска;

– контроль за активным выявлением медицинскими организациями больных бруцеллезом из числа больных, с диагнозами, не исключающими заболевание бруцеллезом или сопоставимыми с этой инфекцией, лабораторным обследованием на бруцеллез, в т. ч. для выделения гемокультур бруцелл (по показаниям) от лихорадящих больных, в т. ч. длительно (более 5 дней);

– анализ эпизоотологической ситуации по бруцеллезу по материалам организаций, входящих в Государственную ветеринарную службу Российской Федерации (далее – организации ветеринарной службы), включая анализ комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на ограничение распространения инфекции и предупреждение заражения здоровых животных (наличие и количество неблагополучных по бруцеллезу пунктов, обследование поголовья на бруцеллез, состояние вакцинопрофилактики бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных);

– определение контингентов населения, имеющих наибольший риск инфицирования на энзоотичных по бруцеллезу территориях, а также профессионально связанных с риском заражения бруцеллезом;

– контроль выполнения на животноводческих предприятиях (общественный сектор), в хозяйствах по разведению скота (крестьянско-фермерские хозяйства (КФХ), индивидуальные предприниматели (ИП), мясо- и молокоперерабатывающих предприятиях, убойных пунктах (площадках), частных предприятиях по переработке сырья и продуктов животноводства при фермерских хозяйствах, комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий⁹;

– слежение за динамикой эпидемиологически значимых социальных явлений (например, миграция населения и сельскохозяйственных животных, характер хозяйственной деятельности, санитарно-гигиенические условия работы в сельскохозяйственном производстве и на предприятиях по переработке продуктов животноводства и сырья, уровень медицинского обслуживания);

– геномный мониторинг за циркулирующими бруцеллами, вызывающими эпизоотические вспышки и случаи заболеваний людей;

– разработка тактики специфической профилактики бруцеллеза;

– оценка качества, своевременности и эффективности осуществляемых противоэпидемических (профилактических) мероприятий с целью их оптимальной корректировки;

– эпидемиологическое районирование субъектов Российской Федерации по степени риска инфицирования людей возбудителем бруцеллеза (см. главу V);

⁸ Пункт 1204 СанПиН 3.3686-21.

⁹ Глава XIII СанПиН 3.3686-21.

– разработка прогнозов эпидемиологической ситуации.

3.3. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом проводится органами и организациями, осуществляющими федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор) и основывается на данных эпизоотолого-эпидемиологической ситуации, клинических проявлений, результатах лабораторной диагностики и исследования штаммов бруцелл¹⁰.

3.3.1. Эпидемиологическая диагностика бруцеллеза.

3.3.1.1. Эпидемиологический анализ подразделяется на ретроспективный и оперативный.

3.3.1.2. Ретроспективный эпидемиологический анализ проводится специалистами органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор) и включает изучение многолетней и помесечной динамики заболеваемости населения, анализ эпизоотологической ситуации на конкретной территории с определением факторов риска и причинно-следственных связей.

Ретроспективный анализ ситуации предусматривает:

– характеристику многолетней динамики заболеваемости с определением тенденций (рост, снижение, стабилизация) и темпов роста (прироста) или снижения;

– анализ годового и помесечного уровней заболеваемости бруцеллезом;

– изучение заболеваемости по отдельным регионам, территориям, населенным пунктам;

– изучение заболеваемости по возрасту, полу, профессии, месту жительства, субъектам хозяйственной деятельности;

– распределение заболеваемости по характеру клинических проявлений и тяжести клинического течения;

– анализ многолетних данных о циркуляции возбудителей бруцеллеза по результатам лабораторных исследований материала от людей и животных (данные организаций ветеринарной службы);

– изучение особенностей возбудителей (виды, биовары, генотипы, структура генома);

– анализ факторов риска, включая сведения об эпизоотическом состоянии по бруцеллезу административной территории, населенного пункта.

3.3.1.3. Оперативный эпидемиологический анализ проводится за определенный текущий промежуток времени на конкретной территории с целью оценки эпидемиологической обстановки, постановки эпидемиологического диагноза, разработки адекватных противоэпидемических (профилактических) мероприятий и составления прогноза развития эпидемиологической ситуации.

Оперативный анализ заболеваемости бруцеллезом основывается на данных регистрации первичных диагнозов и позволяет своевременно установить изменения эпидемиологической ситуации и их причины. Основной задачей ретроспективного и оперативного анализов является своевременное выявление предпосылок и причин осложнения эпидемиологической ситуации.

¹⁰ Глава XIII СанПиН 3.3686-21.

3.3.1.4. В качестве предпосылок, способных обусловить возникновение заболевания бруцеллезом, могут являться:

- возникновение новых неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного, мелкого рогатого скота и других животных на административной территории;
- увеличение заболеваемости бруцеллезом на соседних территориях;
- увеличение количества сельскохозяйственных животных эпидемиологически значимых видов, заболевших бруцеллезом;
- завоз сельскохозяйственных животных эпидемиологически значимых видов из неблагополучных по бруцеллезу хозяйств, других территорий;
- регистрация случаев заболевания бруцеллезом среди диких и синантропных животных.

3.3.1.5. К предвестникам активизации эпидемического процесса относятся:

- регистрация случаев заболевания людей бруцеллезом, число которых превышает среднеголетний уровень для конкретной административной территории;
- регистрация случаев заболевания людей бруцеллезом в общественном секторе – среди работников животноводческих хозяйств, предприятий, агрокомплексов;
- регистрация эпидемических очагов бруцеллеза с групповой заболеваемостью (при регистрации 3 и более эпидемиологически взаимосвязанных случаев заболеваний) на территории с неблагополучными по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота пунктами;

– установление факта заражения крупного рогатого скота наиболее патогенным для человека возбудителем бруцеллеза козье-овечьего вида *B. melitensis*, основной хозяин которого – мелкий рогатый скот (козы и овцы).

3.3.1.6. При регистрации впервые выявленных заболеваний бруцеллезом проводится эпидемиологическое расследование, осуществляемое в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями по профилактике бруцеллеза¹¹.

IV. Диагностика бруцеллезной инфекции

4.1. Диагноз «бруцеллез» устанавливается на основании клинических, эпидемиологических данных и результатов лабораторных исследований по подтверждению этиологии заболевания (обнаружение маркеров возбудителя бруцеллеза с использованием методов и диагностических препаратов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке¹²).

4.2. Окончательный диагноз включает: клиническую форму заболевания, тяжесть течения, осложнение (при наличии) и результаты лабораторных исследований.

¹¹ Пункты 1198 – 1203 СанПиН 3.3686-21.

¹² Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (далее – Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ); постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий» (далее – постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684).

4.3. Госпитализация, регистрация, учет и статистическое наблюдение случаев заболевания людей бруцеллезом, вакцинопрофилактика осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹³, а также приказом Минздрава России¹⁴.

V. Эпидемиологическое районирование субъекта Российской Федерации

5.1. Районирование территории по показателю эпидемической опасности (далее – ПЭО) инфицирования людей возбудителем бруцеллеза используется для осуществления дифференцированного подхода при проведении эпидемиологического надзора, планирования и осуществления санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий в субъекте Российской Федерации.

5.2. Эпидемиологическое районирование по ПЭО базируется на анализе статистических данных о заболеваемости людей и животных в муниципальных районах субъекта Российской Федерации за определенный период времени.

5.3. При проведении эпидемиологического районирования территории субъекта Российской Федерации по ПЭО учитываются показатели заболеваемости населения и частота эпидемических проявлений бруцеллеза в разрезе административных районов субъекта Российской Федерации, что позволяет объединить их в группы по степени эпидемической опасности и составить шкалу картограмм для эпидемиологического районирования.

5.4. Результаты эпидемиологического районирования территории субъекта Российской Федерации по уровню ПЭО представляются в виде картограммы, которая выполняется в автоматическом режиме с применением географических информационных систем (далее – ГИС).

5.5. Данные по районированию административных территорий субъектов Российской Федерации по ПЭО, полученные в результате анализа многолетней заболеваемости, используются для оценки эпидемиологической обстановки по бруцеллезу при проведении эпидемиологического анализа и планировании комплекса противобруцеллезных санитарно-противоэпидемических (профилактически) мероприятий.

5.6. Методики проведения эпидемиологического районирования субъекта Российской Федерации по показателю эпидемической опасности представлены в приложении 1 к настоящим МУ.

VI. Эпидемиологический прогноз

6.1. Результаты оперативного, ретроспективного анализов заболеваемости бруцеллезом, районирования административной территории по ПЭО позволяют обосновать прогноз развития эпидемиологической ситуации на краткосрочную

¹³ Пункты 1183 – 1185, 1196 СанПиН 3.3686-21.

¹⁴ Приказ Минздрава России от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок» (зарегистрирован Минюстом России 20.12.2021, регистрационный № 66435).

(до 1 месяца) и среднесрочную (до 1 года) перспективу.

Точность эпидемиологического прогноза при бруцеллезе зависит от правильности постановки эпидемиологического диагноза и оценки факторов, обуславливающих возможность активной реализации механизмов передачи возбудителя, адекватности (полноты) санитарно-противоэпидемических (профилактически) мероприятий, проводимых в отношении источников инфекции, прерывания путей распространения инфекции и защиты угрожаемого контингента населения.

VII. Организация лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней

7.1. Организация лабораторных исследований биоматериала, секционного материала и объектов окружающей среды, биоматериала от животных, сырья животного происхождения (шерсть, кожа), продуктов животноводства (мясо и мясные продукты, молоко и молочные продукты) при подозрении на бруцеллез осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹⁵.

Диагностические иммунологические (серологические) исследования по обнаружению в крови людей антигенов возбудителей бруцеллеза (без накопления возбудителя) и (или) антител к ним, исследования полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР-исследования) (без накопления возбудителя) для выявления в биологическом материале дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее – ДНК) возбудителей бруцеллеза, клеточные антигенспецифические тесты (далее – КАСТ-тесты) в т.ч. аллергологический тест *in vitro* (цитометрический тест активации базофилов), реакция лизиса лейкоцитов (далее – РЛЛ), тест *in vitro* активации лимфоцитов с определением в плазме крови методом иммуноферментного анализа (далее – ИФА), концентрации стимулированного антигенами бруцелл гамма интерферона (далее – БриФ-тест), тесты антигенспецифической *in vitro* активации лимфоцитов с учетом реакции в цитометрическом формате, представленные в пунктах 8.7.1.5, 8.15.6, 8.16.2, 8.16.3, 8.16.4.1, 8.20, 8.21, могут проводить лаборатории, имеющие санитарно-эпидемиологическое заключение на соответствие санитарно-эпидемиологическим требованиям условий проведения работ с микроорганизмами III – IV групп патогенности¹⁶.

7.2. Отбор биологического материала от больных бруцеллезом (с подозрением на заболевание) и трупов может проводить сотрудник МО независимо от их организационно-правовой формы и формы собственности.

Отбор проб объектов окружающей среды (например, почвы, травы, фуража, подстилки, воды, смывов), продуктов животноводства (мясо и мясные продукты, молоко и молочные продукты) осуществляется по эпидемическим показаниям специалистами центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской

¹⁵ Пункт 1186 СанПиН 3.3686-21.

¹⁶ Пункт 1187 СанПиН 3.3686-21.

Федерации и противочумных станций Роспотребнадзора¹⁷.

Отбор проб биоматериала от животных, сырья животного происхождения (шерсть, кожа), проводится специалистами организаций ветеринарной службы¹⁸.

7.3. Лабораторные исследования на бруцеллез проводятся (приложение 2 к настоящему МУ):

– на территориальном уровне – лабораториями МО и центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации и его филиалов;

– на региональном уровне – лабораториями Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности (далее – Центры индикации), созданными на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора (далее – ПЧУ), опорных баз Центров индикации, организованных в центрах гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, научно-методическими центрами по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II – IV групп патогенности (далее – Научно-методические центры), созданными на базе научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора;

– на федеральном уровне – лабораторией на базе Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора¹⁹ (далее – Референс-центр по мониторингу за возбудителем бруцеллеза), лабораториями Центров верификации диагностической деятельности, осуществляющих функции государственной коллекции Роспотребнадзора (далее – Центры верификации)²⁰.

7.4. Лабораторные исследования на бруцеллез выполняются специалистами в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями²¹, методическими документами и инструкциями к тест-системам.

7.5. Биоматериал для исследования: например, кровь, сыворотка крови, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость (при артритах), моча, желчь, гной (при абсцессах), пунктаты костного мозга и лимфатических узлов, кал. Исследования проводятся иммунологическими (реакции агглютинации (далее – РА) пластинчатая (далее – реакция Хеддльсона) и пробирочная (далее – реакция Райта), ИФА, внутрикожная проба Бюрне, КАСТ-тесты), бактериоскопическим (световая и люминесцентная микроскопия), бактериологическим (выделение чистой культуры, ее идентификация и межвидовая дифференциация штаммов),

¹⁷ Пункт 1 статьи 50 Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

¹⁸ Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов бруцеллеза (включая инфекционный эпидидимит баранов), утвержденные приказом Минсельхоза России от 22.11.2024 № 703 (зарегистрирован Минюстом России 29.11.2024, регистрационный № 80415).

¹⁹ Приложение 2 приказа Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» (далее – приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116).

²⁰ Пункт 1191 СанПиН 3.3686-21.

²¹ Пункт 149 СанПиН 3.3686-21.

биологическим (заражение биопробных животных), молекулярно-биологическими (полимеразная цепная реакция (далее – ПЦР), изотермическая амплификация (методы амплификации нуклеиновых кислот, далее – МАНК), секвенирование, времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией (ионизацией) (англ. matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, далее – MALDI-TOF MS) методами в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями²², а также пунктами 8.5 – 8.11, 8.15.2 – 8.15.3, 8.15.6, 8.16, 8.20 – 8.22.

7.6. На территориальном уровне в лабораториях учреждений Роспотребнадзора и МО диагностические исследования биологического материала от больных с подозрением на бруцеллез с применением биологического и бактериологического методов не проводятся, за исключением лабораторий особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации. На территориальном уровне выполняются ПЦР и (или) МАНК для определения наличия в исследуемом материале ДНК бруцелл, иммунологические исследования по выявлению антигенов бруцеллезного микроба и (или) антител к ним, наличия специфической сенсибилизации организма (аллергологические исследования) к возбудителю бруцеллеза, КАСТ-тесты (без накопления возбудителя). Постановка пробы Бюрне осуществляется в МО, осуществляющих оказание медицинской помощи в стационарных условиях (отделения, больницы) или в специализированном противобруцеллезном отделении МО. В лабораториях особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации проводятся исследования объектов окружающей среды по эпидемическим показаниям, диагностические исследования биологического материала от больных проводятся иммунологическими, молекулярно-биологическими, бактериологическим и биологическим методами (выделение чистой культуры и ее идентификация до вида).

На региональном и федеральном уровнях: в Центрах индикации, Опорных базах Центров индикации, Референс-центре по мониторингу за возбудителем бруцеллеза, Центрах верификации – материал на бруцеллез исследуется методами, предусмотренными приказом Роспотребнадзора²³. По эпидемическим показаниям для установления причинно-следственных связей при эпидемиологическом расследовании случаев заболевания людей бруцеллезом проводятся исследования: биоматериала от животных, сырья животного происхождения (шерсть, кожа), продуктов животноводства (мясо и мясные продукты, молоко и молочные продукты), проб из объектов окружающей среды (например, почва, трава, фураж, подстилка, вода, смывы). Исследования проводятся бактериологическим, биологическим, иммунологическими и молекулярно-биологическими методами²⁴.

7.7. Расширенная идентификация выделенных культур, их молекулярно-генетическое типирование, секвенирование проводятся в Референс-центре по

²² Глава XIII СанПиН 3.3686-21.

²³ Приложение 9 приказа Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

²⁴ Пункт 1188 СанПиН 3.3686-21.

мониторингу за возбудителем бруцеллеза и Центрах верификации.

7.8. Выделенные штаммы возбудителя бруцеллеза передаются в установленном порядке²⁵ в Референс-центр по мониторингу за возбудителем бруцеллеза и (или) Центры верификации (по согласованию) для проведения окончательной идентификации, генетического типирования штаммов возбудителя бруцеллеза и пополнения национального коллекционного фонда штаммов возбудителей бруцеллеза.

7.9. Учет, хранение, передача и транспортирование патогенного биологического агента (далее – ПБА) осуществляются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями²⁶.

7.10. Обращение с лабораторными отходами осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями²⁷, а также методическими документами²⁸.

VIII. Лабораторная диагностика бруцеллеза

8.1. Для лабораторной диагностики бруцеллеза у людей применяются методы:

- бактериологический – позволяющий выявить возбудителя заболевания и его растворимые антигены;
- иммунологический – для определения антигенов бруцелл и специфических антител к ним;
- молекулярно-биологический – для выявления и изучения ДНК возбудителя;
- аллергодиагностика – тесты, свидетельствующие о сенсибилизации и иммунологической реактивности организма.

²⁵ Приложение 10 приказа Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

²⁶ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

²⁷ Глава X СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 3 (зарегистрировано Минюстом России 29.01.2021, регистрационный № 62297), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 26.06.2021 № 16 (зарегистрировано Минюстом России 07.07.2021, регистрационный № 64146); от 14.12.2021 № 37 (зарегистрировано Минюстом России 30.12.2021, регистрационный № 66692); 14.02.2022 № 6 (зарегистрировано Минюстом России 17.02.2022, регистрационный № 67331); от 15.11.2024 № 11 (зарегистрировано Минюстом России 27.12.2024, регистрационный № 80808).

²⁸ МР 2.1.0246-21 «Методические рекомендации по обеспечению санитарно-эпидемиологических требований к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий», утвержденные руководителями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 17.05.2021.

При выделении культуры возбудителя бруцеллеза определяется ее чувствительность к АБП, проводится генотипирование.

Молекулярное типирование штаммов возбудителя бруцеллеза осуществляется с целью уточнения таксономической принадлежности (виды, биовары), определения молекулярных профилей патогена для решения задач молекулярно-генетического мониторинга бруцелл, изучения генетического разнообразия штаммов патогенов и эволюции *Brucella* spp.

Отбор, транспортирование материала и подготовка проб для исследования

8.2. Отбор и транспортирование проб биологического материала.

Отбор проб биологического материала для исследования, их упаковка и транспортирование осуществляется медицинским персоналом в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями²⁹, устанавливающими требования к порядку передачи и транспортирования (в части безопасной упаковки, маркировки и оформления документации) биологического материала, подозрительного на наличие ПБА I – IV группы, и приложением 3 к настоящим МУ.

Биологическим материалом для отбора проб, предназначенных для исследования на бруцеллез, от лиц с подозрением на бруцеллез, больных людей в зависимости от клинической формы болезни являются: цельная кровь, лейкоцитарная фракция крови, сыворотка крови, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость (при артритах), моча, желчь, гной (при абсцессах), кал, пунктаты костного мозга и лимфатических узлов, секционный и биопсийный материал (селезенка, печень, регионарные лимфатические узлы, ткани с признаками воспаления, характерных патологических изменений).

Материал от больных людей и лиц с подозрением на бруцеллез отбирается при поступлении больного в МО до начала антибактериальной терапии, а также в течение всего периода клинических проявлений.

Кровь у больного берется натощак из локтевой вены в количестве 10 – 15 мл, соблюдая правила асептики, шприцем или с использованием вакуумной системы: с активатором сыворотки – для иммунологических исследований, с гепарином – для постановки КАСТ-тестов, с цитратом натрия или этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) – для ПЦР. При взятии крови шприцем она переносится в стерильную пробирку. Для получения сыворотки и предотвращения гемолиза пробирка с кровью оставляется при комнатной температуре в скошенном положении до образования сгустка. Полученная сыворотка отбирается в пластиковую пробирку, герметично закрывается и направляется в лабораторию для исследования на наличие специфических антител к возбудителю бруцеллеза.

Для проведения бактериологических исследований кровь вносится иглой через предварительно обработанную 70 % этиловым спиртом резиновую пробку во флаконы с жидкой питательной средой для транспортирования материала и

²⁹ Пункты 512 – 520, 524, 530, приложение 8 СанПиН 3.3686-21.

накопления бруцелл, использование которой позволяет совместить этапы транспортирования материала в лабораторию и накопления бруцелл.

При отсутствии транспортной среды для доставки пробы в лабораторию для выделения гемокультуры кровь отбирается в две пробирки по 4–5 мл с антикоагулянтом для последующего бактериологического исследования.

Костный мозг забирается путем пункции грудины шприцем. Полученный костный мозг (в количестве нескольких капель) засеивается в пробирку на питательные среды или в транспортную среду и направляется в лабораторию для исследования.

Спинномозговая жидкость отбирается методом люмбальной пункции и засеивается в лаборатории на питательные среды в количестве 0,1 – 0,3 мл.

Пунктат из лимфатических узлов, материал, отобранный из полости сустава (синовиальная жидкость), гной (при абсцессах) после взятия вносится иглой через предварительно обработанную 70 % этиловым спиртом резиновую пробку во флаконы с жидкой питательной средой для транспортирования материала и накопления бруцелл или в стерильную одноразовую пробирку.

При исследовании мочи собирается ее средняя порция (10–20 мл) в одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой.

Пробы желчи (средние порции) собираются при дуоденальном зондировании в процедурном кабинете. Над пламенем спиртовки открывается пробирка для сбора материала, полученная желчь (10–12 мл) помещается в одноразовую стерильную пробирку с завинчивающейся крышкой. При использовании пробирки с газопроницаемой пробкой проба доставляется в лабораторию в строго вертикальном положении, чтобы не замочить пробку желчью.

Отобранный биологический материал засеивается на питательные среды по методу Кастанеда или на питательную среду для накопления бруцелл. Используются питательные среды, зарегистрированные³⁰ и не зарегистрированные, но разрешенные к применению в установленном порядке³¹ (приложения 5, 6 к настоящим МУ), внесенные в Государственный реестр медицинских изделий³² и прошедшие контроль качества по биологическим показателям после приготовления (приложение 7 к настоящим МУ). Допускается использование сред лабораторного приготовления.

При обследовании больных, прошедших курс лечения антибиотиками, через 1 месяц и спустя 4–6 месяцев после окончания курса антибактериальной терапии, а также больных хронической формой бруцеллеза в период обострения перед началом лечения, рекомендуется проводить посевы крови, пунктатов

³⁰ Пункты 4 и 5 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684; постановление Правительства Российской Федерации от 24.11.2021 № 2026 «О незарегистрированных медицинских изделиях для диагностики *in vitro*» (далее – постановление Правительства Российской Федерации от 24.11.2021 № 2026).

³¹ Часть 11.1 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ.

³² Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий: roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch (в свободном доступе).

костного мозга и лимфатических узлов на питательную среду для выделения L-форм бруцелл (приложение 5 к настоящим МУ).

Материалом для исследования методом ПЦР являются: цельная кровь, сыворотка крови, пунктаты костного мозга и лимфатических узлов, синовиальная жидкость, секционный и биопсийный материал (селезенка, печень, регионарные лимфатические узлы, ткани с признаками воспаления и других характерных патологических изменений). Забор, транспортирование и хранение биологического материала для проведения ПЦР осуществляются в соответствии с методическими указаниями³³.

8.3. Отбор и транспортирование проб сырья животного происхождения, продуктов животноводства и объектов окружающей среды.

Отбор проб сырья животного происхождения, продуктов животноводства и объектов окружающей среды проводится при эпидемиологическом расследовании очагов инфекции с целью установления источника, факторов и путей передачи возбудителя, условий, способствующих заражению, а также для организации и проведения мероприятий по локализации и ликвидации очага бруцеллеза.

Отбор проб биоматериала от животных, продуктов, сырья животного происхождения и объектов окружающей среды, их упаковка и транспортирование осуществляются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями³⁴, приложениями 3 – 4 к настоящим МУ, а также документами по стандартизации в зависимости от вида продукции.

8.4. Упаковка проб.

Емкости с пробами маркируются, обрабатываются снаружи дезинфицирующим раствором. Пробы упаковываются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями с соблюдением принципа тройной упаковки³⁵, который предусматривает наличие не менее трех защитных слоев:

– первичная упаковка (емкость) – полностью герметичная емкость, непосредственно содержащая образец для исследования. Эта емкость упаковывается в достаточное количество абсорбирующего материала, чтобы в случае повреждения или протечки емкости абсорбирующий материал мог впитать всю жидкость;

– вторичная упаковка – прочная водонепроницаемая, герметичная тара для помещения и защиты первичных емкостей. В одну вторичную тару помещается несколько обернутых первичных емкостей. При этом используется достаточное количество абсорбирующего материала, чтобы поглотить всю жидкость в случае повреждения или протечки. Первичная емкость и вторичная тара образуют внутреннюю тару;

³³ МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 22.12.2009 (далее – МУ 1.3.2569-09).

³⁴ Пункты 512 – 520, 524, 526 – 527, 530, приложение 8 СанПиН 3.3686-21.

³⁵ Пункт 524 СанПиН 3.3686-21.

– наружная тара (транспортировочный контейнер (бикс) или термоконтейнер), в которую помещается вторичная упаковка с достаточным количеством амортизирующего материала. Наружная тара во время транспортировки защищает содержимое от неблагоприятных внешних воздействий. При необходимости в нее вкладываются хладоэлементы.

Минимальные размеры наружной тары не менее чем 10 × 10 см, маркируется необходимое положение груза стрелками или надписью: «Верх, осторожно!».

На доставляемые в лабораторию пробы заполняется направление в 2 экземплярах. Одно (или копия) – вкладывается в транспортировочный контейнер, второе передается с нарочным.

Материал с направлением доставляется в специализированную лабораторию выделенным транспортом в сопровождении работника направляющей организации (нарочный) или при помощи специализированной транспортной организации. Пробы биологического материала (от человека и животных) транспортируются с соблюдением «холодовой цепи» в термоконтейнере с охлаждающими элементами. Замораживание образцов цельной крови не проводится. Транспортировка проб из объектов окружающей среды производится при температуре окружающей среды.

Методы выделения возбудителя и выявления его растворимых антигенов

8.5. Бактериологический метод.

8.5.1. Работа по выделению бруцелл из исследуемого материала и их дифференциации проводится в условиях, исключающих возможность инфицирования персонала и обсеменения возбудителем объектов окружающей среды, в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями³⁶.

Характерной особенностью представителей рода *Brucella* является медленный рост на питательных средах, особенно в первых генерациях. При посевах крови, костного мозга и мочи культуры бруцелл обнаруживаются через 5–10 дней, а иногда через 20–30 дней после посева. При этом первые генерации культур *B. abortus* и *B. ovis* способны расти только при наличии в атмосфере повышенного содержания CO₂ (5–10%). *B. abortus* 5 и 6 биофаров могут расти в аэробных условиях.

Для выделения культур бруцелл рекомендуются следующие среды: эритрит агар, бруцеллагар, сывороточно-декстрозный агар, агар из картофельного настоя с добавлением сыворотки и кровяной агар (5 % овечьей крови в среде), Альбими-агар, среда «Д», печеночные и мясопептонные агары и бульоны (водородный показатель (далее – рН) сред 6,8–7,2). Рецепты приготовления и контроль питательных сред по биологическим показателям приведены в приложениях 5–7 к настоящему МУ. Посевы производятся на предварительно проверенные питательные среды.

Питательная среда эритрит агар является высокоэффективной для

³⁶ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

выделения первой генерации возбудителя, при последующих пересевах на этом агаре изучаемая культура бруцелл может диссоциировать.

8.5.2. Исследование крови.

Посевы крови рекомендуется делать во время лихорадочного состояния больного, так как в этот период наиболее вероятно выделение возбудителя бруцеллеза. Не исключена возможность получения гемокультуры и при нормальной температуре у больного. Кровь для посева берется до лечения АБП. Для посева крови используются флаконы емкостью 100 – 200 мл с 30 – 50 мл питательного агара. После стерилизации флаконы укладываются так, чтобы агар застыл на одной из сторон флакона. Затем в каждый флакон стерильно добавляется по 25 – 30 мл предварительно простерилизованного бульона. Флаконы с бифазной средой выдерживаются в термостате при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение 2 – 3 суток для контроля стерильности. Агар с бульоном может быть использован не позднее 5 – 7 дней.

Кровь в количестве не менее 10 мл, стерильно отобранная из локтевой вены, засеивается по 5 мл в два флакона. Один из флаконов инкубируется при повышенном содержании CO_2 (5 – 10 %), а другой – в обычных условиях. Начиная с четвертого дня после посева, флаконы просматриваются и при отсутствии роста культуры поверхность агара орошается бульоном. При положительном результате на поверхности агара появляются колонии бруцелл. Если в течение месяца бруцеллы не обнаруживаются, то в этом случае делается контрольный высеv из бульона на твердую питательную среду, которая выдерживается в термостате при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение 7 суток.

Исследуемая кровь в количестве 5 мл, может забираться в транспортную среду (питательная среда жидкая для транспортирования биоматериала и накопления бруцелл) или в пробирки с антикоагулянтом. При использовании транспортной среды взятая шприцем стерильно из локтевой вены кровь, вносится той же иглой во флаконы со средой через предварительно обработанную 70 % этиловым спиртом резиновую пробку. Хранятся засеянные флаконы до отправки в течение 2 недель в зависимости от конкретных условий: в термостате (при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С), при комнатной температуре (плюс $(18-22 \pm 0,5)$ °С), или в холодильнике (плюс $(4-8 \pm 0,5)$ °С). В бактериологической лаборатории содержимое флакона высеивается на плотные питательные среды или во флаконы для выращивания по методу Кастанеда, после чего один флакон помещается в термостат при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С до 30 суток в условиях избыточного содержания CO_2 , а другой – при обычных условиях. При появлении на поверхности агара колоний бруцелл, последние снимаются петлей и пересеиваются на плотные питательные среды для дальнейшего изучения. Если в течение месяца бруцеллы не обнаруживаются, то в этом случае делается контрольный высеv из бульона на плотную питательную среду, которая выдерживается в термостате при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение 7 суток.

Описанные методики для получения гемокультур применимы при исследовании объектов, не контаминированных посторонней микрофлорой

(например, кровь, спинномозговая жидкость, костный мозг).

При бактериологическом обследовании больных, прошедших курс лечения АБП, через 1 месяц и спустя 4–6 месяцев после окончания курса антибактериальной терапии, а также больных хронической формой бруцеллеза в период обострения (особенно при субфебрильной температуре) перед началом лечения рекомендуется проводить посевы крови, пунктатов костного мозга и лимфатических узлов на питательные среды для выделения бруцелл в L-форме (приложение 5 к настоящим МУ).

Способ бактериологического посева материала для выделения L-культур идентичен методу выделения бактериальных гемокультур. Посевы выдерживаются в термостате не менее 35 – 40 дней.

8.5.3. Исследование мочи.

При бактериологическом исследовании мочи производится предварительная концентрация бруцелл путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 2 ч или фильтрации через стерилизующие фильтры. После центрифугирования верхний слой мочи аккуратно отбирается пипеткой, в пробирке оставляется 1 мл мочи с осадком. Осадок ресуспендируется и в объеме 0,1 – 0,3 мл высевается на жидкие и плотные питательные среды. Одновременно осуществляется посев на агар с ингибиторами посторонней микрофлоры.

8.5.4. Исследование костного мозга, спинномозговой жидкости, экссудата из бурситов, грудного молока, желчи, мокроты, трупного материала.

Посевы производятся на твердые и жидкие питательные среды. В случаях исследования загрязненного материала используются питательные среды с ингибиторами посторонней микрофлоры.

8.5.5. Исследование материала (по эпидемическим показаниям) из объектов окружающей среды, продовольственного сырья, продуктов животного происхождения.

При бактериологическом методе исследований материала из объектов окружающей среды, продовольственного сырья, продуктов животного происхождения выполняются:

- перевод сухих проб в жидкую фазу (почва, пищевые продукты). Суспендирование в 0,9 % растворе натрия хлорида или бульоне: пробы в количестве 10 г помещаются в стерильную ступку, добавляется стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:10 и содержимое растирается до гомогенного состояния. Пробы отстаиваются и через стерильный ватный тампон отбирается надосадочная жидкость;

- концентрирование жидких проб путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 2 ч. Вместо концентрирования возбудителя в исследуемом материале путем центрифугирования можно использовать фильтрацию или добавление к исследуемому материалу специфической бруцеллезной агглютинирующей сыворотки в соотношении 1:100;

- посев на плотные питательные среды с ингибиторами посторонней микрофлоры (приложения 5, 6 к настоящим МУ).

8.5.6. Исследование воды.

Исследуются стерильно отобранные пробы воды (объединенная проба воды –

не менее 1500 мл). Искомые микроорганизмы концентрируются из заданного объема воды на мембранные фильтры с последующим помещением фильтров на твердую питательную среду и инкубацией посевов. Используются стерильные фильтрующие материалы (мембранные фильтры, аналитические трековые мембраны и другие фильтрующие материалы) с размером диска 35 мм, 37 мм или 47 мм и диаметром пор 0,22 мкм.

Для фильтрования используется оборудование для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35, 37, 47 мм и устройства для создания разрежения 0,5 – 1,0 атм. Воронка и столик фильтровального аппарата фламбируются пламенем. На столик фильтровального аппарата кладется стерильным пинцетом стерильный мембранный фильтр. После окончания фильтрования и осушения фильтра отключается вакуум, воронка снимается, фильтр осторожно поднимается за край стерильным пинцетом и переносится, не переворачивая, на поверхность твердой питательной среды, разлитой в чашки Петри, избегая пузырьков воздуха между средой и фильтром. Поверхность фильтра с осевшими на ней бактериями должна быть обращена вверх. В случаях исследования загрязненного материала используются питательные среды с ингибиторами посторонней микрофлоры. Посевы на плотных питательных средах культивируются при температуре плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 30 суток.

При посеве нескольких объемов одной пробы через один фильтровальный аппарат без фламбирования сначала фильтруются меньшие, а затем большие объемы воды, меняя каждый раз фильтры. Перед фильтрованием новой пробы воронка и столик фильтровального аппарата обеззараживаются фламбированием. Анализ начинается с фильтрования проб обеззараженной воды или тех проб, которые предположительно не загрязнены, а затем фильтруются загрязненные пробы.

Под каждым фильтром на дне чашки делается надпись с указанием объема профильтрованной воды, номера пробы и даты посева.

8.5.7. Исследование молока.

Стерильно отобранное цельное молоко (объединенная проба – 500 мл) оставляется на 2 – 3 ч в холодильнике при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ для отстоя сливок. Пробы молока центрифугируются в течение 30 мин при 3000 об/мин. Верхний слой (сливки) и осадок набираются пастеровскими или автоматическими пипетками и делается посев по 0,1 – 0,2 мл на три – четыре чашки Петри со средами, содержащими ингибиторы посторонней микрофлоры.

8.5.8. Исследование пищевых продуктов.

Из пищевых продуктов наиболее часто могут быть контаминированы возбудителем бруцеллеза молочные и мясные, приготовленные из термически необеззараженного пищевого сырья.

Для твердых образцов пищевых продуктов требуются гомогенизация и разведение: навеска образца (кусочки проб молочных, мясных продуктов) 10 г помещается в стерильную фарфоровую ступку, измельчается ножницами или пестиком, под прикрытием крышки от чашки Петри, или измельчителями, обеспечивающими герметичность (лопаточным блендером, гомогенизатором перистальтическим), затем суспендируется стерильным 0,9 % раствором натрия

хлорида в соотношении 1:10. Для последующего посева на питательные среды суспензия набирается в шприц или пипетку через марлевый тампон.

Концентрирование жидких проб пищевых продуктов осуществляется путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 2 ч. Вместо концентрирования возбудителя в исследуемом материале путем центрифугирования можно использовать фильтрацию или добавление к исследуемому материалу специфической бруцеллезной агглютинирующей сыворотки в соотношении 1:100.

Пробы масла из коровьего молока, масляной пасты, молочного жира, топленых смесей, высокожирных сливок перед испытанием расплавляются в закрытой стерильной емкости на водяной бане при температуре плюс 40 – 45 °С и перемешиваются до получения однородной эмульсии.

При бактериологическом исследовании пищевых продуктов применяется прямой посев материала на плотные питательные среды, в том числе с ингибиторами посторонней микрофлоры.

8.5.9. Исследование патологического материала от животных.

Лимфатические узлы, очищенные от жира и соединительной ткани, кусочки печени, селезенки размером 2,0×1,5×2,5 см погружаются в 95 – 96 % этиловый спирт на 1 – 2 с и обжигаются, проводя над пламенем спиртовки (газовой горелки). После обработки от материала стерильными ножницами отрезаются кусочки размером 1 – 2 см. Подготовленный материал помещается в пакет для гомогенизации с фильтром, добавляется 4 – 5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и гомогенизируется с использованием гомогенизатора или растирается в стерильной ступке (под прикрытием крышки от чашки Петри) с добавлением 0,9 % раствора натрия хлорида до получения однородной гомогенной суспензии. Полученная суспензия высевается пипеткой по 0,2 – 0,3 мл на поверхность предварительно подсушенных плотных питательных сред в пробирки и на чашки Петри.

Можно проводить посев непосредственно кусочком органа (лимфатический узел, паренхиматозные органы) путем нанесения отпечатков образца на поверхность питательной среды. Кусочки органов, размером 2,0×1,5×2,5 см погружаются в 96 % этиловый спирт на 1 – 2 с и обжигаются, проводя над пламенем горелки. После этого стерильными ножницами отрезается часть кусочка и срезом делаются несколько отпечатков на поверхности агара в чашке Петри.

Допускается высев материала пастеровской пипеткой непосредственно из лимфатических узлов и органов. Для этого место прокола пастеровской пипеткой предварительно прижигается шпателем, нагретым над пламенем спиртовки. В глубь исследуемого органа вводится стерильная пипетка. Движениями от себя и к себе разрушается ткань органа после чего она набирается в пипетку. Из каждого органа проводится посев в одну бактериологическую пробирку с бульоном и после перемешивания полученная взвесь по 1,0 – 1,5 мл переносится на скошенную плотную питательную среду в две пробирки или проводится посев в бульон бифазной среды в 2 флакона.

Из плодных оболочек вырезаются кусочки тканей с утолщенными ворсинками и стенками, наличием на поверхности фибрина или гнойного

экссудата (выбираются менее загрязненные участки и без некротических изменений).

Материалом при исследовании абортированных плодов являются содержимое желудка, кусочки печени, селезенки, лимфатические узлы. Более высокая концентрация бруцелл обнаруживается в содержимом желудка. Не каждый абортированный плод от больных бруцеллезом животных инфицирован бруцеллами.

Посевы инкубируют при температуре плюс ($37 \pm 0,5$) °С в течение 30 суток. При исследовании материала от крупного рогатого скота засеянный материал культивируется при повышенном содержании CO_2 (5 – 10 %). Просмотр посевов в пробирках с плотными и жидкими питательными средами проводится каждые 3 – 4 дня, из помутневших бульонов делаются высевы в пробирки со скошенным агаром (посевы из бульона культивируются не менее 14 суток).

При исследовании загрязненного материала для задержки роста посторонней микрофлоры к среде добавляется генцианвиолет из расчета 1:200000. С этой целью также добавляются различные АБП: например, полимиксин – 3 мкг/мл и амфоглюкамин – 3 мкг/мл.

Также используется пропись для подавления роста посторонней микрофлоры: полимиксин В – 6 мг/л; бацитрацин – 25 мг/л; амфотерицин В – 1 мг/л; циклогексимид – 100 мг/л; Д-циклосерин – 100 мг/л; налидиксовая кислота – 5 мг/л; ванкомицин – 20 мг/л.

Для подавления роста посторонней микрофлоры также рекомендуется селективная добавка, содержащая: полимиксин В – 2500 МЕ/л; бацитрацин – 12500 МЕ/л; циклогексимид – 50,0 МЕ/л; нистатин – 50000 МЕ/л; натамицин – 50,0 мг/л; налидиксовая кислота – 2,5 мг/л; ванкомицин – 10,0 мг/л.

8.6. Биологический метод.

8.6.1. Для выделения бруцелл из материала, загрязненного посторонней микрофлорой, и при малой концентрации бруцелл в исследуемом материале используются биопробные животные – морские свинки (массой 300 – 350 г) или белые мыши (массой 17 – 20 г). Исследуемый материал вводится подкожно в паховую область в дозах не более 0,5 мл для мышей и 1 мл для морских свинок.

При исследовании крови или другого материала, не содержащего посторонней микрофлоры, заражение биопробных животных производится внутрибрюшинно.

Вскрытие белых мышей проводится через 20 – 25 дней, морских свинок – через 30 – 35 дней после введения исследуемого материала.

Для посевов у морских свинок берутся лимфатические узлы (регионарные к месту введения исследуемого материала – паховый, подчелюстной, шейный, парааортальный), кусочки селезенки, печени, костный мозг, кровь, моча; у белых мышей – лимфатические узлы (паховый, аксиллярный, парааортальный, подчелюстной), кусочки селезенки и печени.

Лимфатические узлы, кусочки печени и селезенки помещаются в стерильную чашку. Костный мозг для посева забирается пипеткой из рассеченной бедренной кости. Посевы крови из сердца, а также мочи и костного мозга проводятся стерильной пипеткой непосредственно на питательные среды

(плотные и жидкие). Лимфатические узлы животных перед посевом рекомендуется надсекать ножницами. После этого каждый лимфатический узел и кусочки органов берутся «уколом» стерильной деревянной палочки длиной 25 – 30 см, диаметром 4 – 5 мм с гладкой поверхностью и несколько заостренным концом и вносятся первоначально в пробирку с плотной питательной средой, где той же палочкой материал раздавливается и тщательно втирается в поверхность питательной среды. Затем остатки посевного материала переносятся в пробирку с жидкой питательной средой. Посевы выдерживаются в термостате при температуре плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 20 – 25 дней.

Просмотр посевов в пробирках с плотными и жидкими питательными средами проводятся каждые 3 – 4 дня, из помутневших бульонов делаются высевы в пробирки со скошенным агаром (посевы из бульона культивируются не менее 14 суток).

Результат исследования оценивается положительно при выделении хотя бы одной колонии бруцелл из организма животного.

Для выделения бруцелл в L-форме морских свинок рекомендуется вскрывать на 7, 14 и 30 сутки после введения исследуемого материала, так как вероятность получения изолятов в L-форме на 7, 14 сутки выше, чем на 30 сутки.

8.7. Методы определения принадлежности к *Brucella* spp.

8.7.1. Для определения принадлежности выделенных культур к роду *Brucella* используются следующие методы: изучение морфологии колоний бактериологическим методом, микроскопия окрашенных препаратов по Граму или Козловскому, люминесцентная микроскопия и проба со специфической сывороткой в РА на стекле, выявление родоспецифичных локусов методами ПЦР и МАНК, выявление антигенов бруцелл методами ИФА и MALDI-TOF MS.

8.7.1.1. Морфология колоний.

Колонии бруцелл на агаре бесцветны, выпуклы (холмиком) с гладкой поверхностью, гомогенны, иногда с нежной зернистостью в центре колонии. С возрастом нежные и прозрачные колонии постепенно мутнеют. В падающем свете беловатые, в проходящем – янтарно-желтого цвета.

Размер колоний может быть различным. Наряду с крупными, достигающими в диаметре 3–4 мм и больше, могут быть очень мелкие – точечные колонии диаметром 0,05 – 0,1 мм. Различные факторы (например, рН питательной среды, влажность, наличие бактериофага в культуре), влияющие на биологию культуры, могут привести также к изменению внешнего вида колоний (например, встречаются зернистые, стекловидные колонии, растущие в толще агара, эрозированные, сухие, слизистые, радиально исчерченные).

Для изучения структуры колоний целесообразно использовать стереоскопическую лупу, обычный световой микроскоп с объективом наименьшего увеличения.

8.7.1.2. Микроскопия окрашенных препаратов.

При окраске по Граму бруцеллы окрашиваются в красный цвет (грамотрицательные). Окрашивание препаратов по способу Козловского: фиксированные препараты окрашиваются 0,5 % водным раствором сафранина при подогревании до появления пузырьков, промывают дистиллированной водой и

докрашивают 0,5 % водным раствором малахитовой или бриллиантовой зелени в течение 40 – 50 с. Бруцеллы сохраняют красную окраску сафранина. Другие бактерии окрашиваются в зеленый цвет.

8.7.1.3. Проба со специфической сывороткой.

Для предварительной, быстрой идентификации культуры проводится РА на стекле. На предметное стекло наносится капля бруцеллезной поливалентной сыворотки, разведенной 1:25 0,9 % раствором натрия хлорида, в которой эмульгируется одна петля исследуемой культуры. В положительных случаях быстро (в течение 1 мин) наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев, в отрицательных – суспензия остается гомогенной (мутной). Для контроля исследуемая культура эмульгируется в капле нормальной кроличьей сыворотки или 0,9 % растворе натрия хлорида.

8.7.1.4. Люминесцентная микроскопия.

Для определения принадлежности выделенных культур к *Brucella* spp. используются иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные, разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке. Исследования проводятся в соответствии с инструкциями к препаратам.

8.7.1.5. ИФА.

Для определения принадлежности выделенных культур к *Brucella* spp. используются ИФА-тест-системы, направленные на выявление родоспецифичного бруцеллезного антигена, разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке³⁷. Исследования проводятся в соответствии с инструкциями по применению.

8.7.1.6. Молекулярно-биологические методы.

Подтверждение принадлежности выделенных культур к *Brucella* spp. без определения их видовой принадлежности проводится с использованием соответствующих зарегистрированных в установленном порядке³⁸ тест-систем в соответствии с инструкциями по применению. Для подтверждения принадлежности выделенных культур к *Brucella* spp. может быть использовано секвенирование родоспецифичных фрагментов генома (например, гена *bcspr 31*).

8.8. Методы идентификации L-форм бруцелл.

Для определения принадлежности выделенных L-культур к роду *Brucella* используются следующие методы: изучение характера роста и морфологии колоний, микроскопия нативных препаратов, проба со специфической сывороткой в реакциях слайд-агглютинации и объемной РА, а также ПЦР-анализ.

8.8.1. Характер роста и морфология L-форм бруцелл.

Бруцеллы в L-форме могут быть изолированными или в виде нежного сплошного налета. На плотных питательных средах формируются колонии различного размера: мелкие 0,5 – 2 мм и крупные до 5 мм, круглые, янтарно-желтого цвета в проходящем и серо-голубоватого в падающем свете, имеют,

³⁷ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

³⁸ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

слизистую или крошковатую консистенцию, часто вырастают в агар, плохо снимаются петлей. При просмотре через стереоскопическую лупу L-колонии могут иметь вид «яичницы» – плотный центр и ажурные светлые края.

Начальному росту L-форм бруцелл сопутствуют частичный распад клеток и агрегация освободившегося при этом внутриклеточного вещества. При культивировании на питательных средах отмечаются клетки с утонченной стенкой, представляющиеся в виде «теней» или «чехлов» клеток.

8.8.2. Микроскопия нативных препаратов.

Для изучения морфологии L-клеток отбираются характерные колонии и готовятся нативные препараты: на предметное стекло наносится капля 0,9 % раствора натрия хлорида, в которой эмульгируется одна петля исследуемой культуры. Капля накрывается покровным стеклом, края заливаются парафином. Препарат просматривается в световом микроскопе в фазовом контрасте с иммерсией.

По морфологии L-формы бруцелл представляют собой полиморфные клетки в виде шаров, грушевидных и неправильной формы тел 1 – 6 мкм с цитоплазмой разной оптической плотности с вакуолями и зернистостью. Зерна-гранулы могут располагаться внутри крупных клеток, или находиться в виде свободных зернистых масс. В препарате могут находиться гетероморфные клетки 0,2 – 0,5 мкм или близкие по морфологии к S-формам бруцелл.

8.8.3. Проба со специфической сывороткой.

L-культуры бруцелл сохраняют антигенное родство с исходными штаммами бруцелл. Для предварительной быстрой идентификации L-культур бруцелл ставится РА на стекле со специфической агглютинирующей поливалентной сывороткой в разведении 1:25. Необходимо учитывать, что L-культуры бруцелл плохо эмульгируются, что затрудняет учет реакции. Рекомендуется сначала петлю культуры тщательно растереть стеклянной палочкой в небольшом количестве 0,9 % раствора натрия хлорида и затем каплю данной эмульсии внести в каплю специфической сыворотки на предметном стекле и параллельно в каплю нормальной кроличьей сыворотки или 0,9 % раствора натрия хлорида в качестве контроля соответственно.

Для дальнейшего изучения бруцелл в L-форме необходимо проводить их реверсию на питательных средах без трансформирующего агента или на лабораторных животных.

8.9. Методы дифференциации видов и биоваров бруцелл. Для проведения дифференциации бруцелл на первом этапе культуры бруцелл проверяются на диссоциацию с применением следующих тестов: проба с трипафлавином, реакция термоагглютинации (проба с нагреванием), проба Уайт-Вильсона. Дифференциации подлежат культуры бруцелл, находящиеся только в S-форме.

8.9.1. Проба с раствором трипафлавина. На предметное стекло наносится капля солевого (0,85 %) раствора трипафлавина 1:500, в котором эмульгируется испытуемая культура. У диссоциированных культур через 1 – 2 мин наступает агглютинация с образованием хлопьев. Взвесь из культур в S-форме остается гомогенной.

8.9.2. Реакция термоагглютинации.

Двухсуточная культура бруцелл в 0,9 % растворе натрия хлорида в количестве 2 – 3 мл с концентрацией $1,0 \times 10^9$ м.к./мл прогревается в пробирке на водяной бане при температуре плюс 90 °С в течение 30 мин. Результаты учитываются через 30 мин, 1 ч и окончательно через $(24 \pm 0,5)$ ч пребывания при комнатной температуре плюс (21 ± 1) °С. В эти сроки при наличии диссоциации наступает ясно выраженная агглютинация клеток бруцелл, тогда как суспензия недиссоциированных (S) штаммов остается гомогенной.

8.9.3. Проба Уайт-Вильсона.

Проба основана на способности диссоциированных колоний окрашиваться красителем кристаллическим фиолетовым. Для постановки пробы на агаровую пластинку со средой Альбими проводится посев взвеси исследуемой культуры в концентрации, позволяющей получить изолированные колонии. Посевы инкубируются при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение 2 – 4 суток. Когда сформируются колонии, на поверхность агара наливается раствор кристаллического фиолетового в разведении 1:2000 (водный раствор) и выдерживается в течение 5 мин, после чего краска отбирается при помощи пипетки. Колонии культур после окрашивания просматриваются с помощью лупы или стереоскопического микроскопа. При этом S-колонии остаются неокрашенными, а диссоциированные принимают окраску красителя: от темно-фиолетового до светло-синего.

8.10. Для определения видов и биоваров бруцелл исследуется способность бруцелл к росту в присутствии повышенного содержания CO_2 , образование сероводорода (далее – H_2S), устойчивость к красителям – фуксину и тионину, способность агглютинироваться бруцеллезными моноспецифическими сыворотками (анти-M, анти-A), отношение к бруцеллезным бактериофагам – бруцеллезный диагностический Тбилиси (далее – Тб), Weybridge (далее – Wb), Firenze (далее – Fi), Berkley (далее – Bk2), наличие специфичных генетических маркеров с помощью молекулярно-генетических методов.

Дифференциация культур возбудителя бруцеллеза с помощью фенотипических признаков проводится одновременно с референтными штаммами бруцелл 1 биовара трех видов: *B. melitensis* 16М, *B. abortus* 544 и *B. suis* 1330.

8.10.1. Отношение к избыточному содержанию CO_2 .

Культуры *B. suis* и *B. melitensis* растут в аэробных условиях, тогда как *B. abortus*, *B. ovis* и *B. pinnipedialis* удается выделить лишь в присутствии повышенного содержания CO_2 (5 – 10 %). При последующих пересевах культуры *B. abortus* утрачивают способность (потребность) расти при повышенном содержании CO_2 и растут в обычных условиях. Биовары 5, 6, и 9 *B. abortus* не требуют для своего роста повышенной концентрации CO_2 в атмосфере культивирования.

8.10.2. Дифференциация по способности образования сероводорода.

В качестве реактива для постановки теста применяется водный раствор уксуснокислого свинца, которым пропитываются полоски фильтровальной бумаги размером 1×8 см. Затем полоски просушиваются. Заготовленные впрок сухие полоски фильтровальной бумаги хранятся в емкости из темного стекла с притертой пробкой не более 2 месяцев.

Взвесь испытуемой культуры в 0,9 % растворе натрия хлорида (в концентрации $1,7 \times 10^9$ м.к./мл) засеивается петлей (2 мм) на скошенную поверхность агара (рН 6,8–7,2). Затем полоска фильтровальной бумаги, импрегнированная уксуснокислым свинцом, зажимается между пробиркой и ватной пробкой так, чтобы нижний ее конец свободно свисал над верхним краем посева и не касался агаровой среды. Ватная пробка должна быть рыхлой, не задерживать выхода газа из пробирки. Пробирки с посевами инкубируются в термостате при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С.

Показателем интенсивности образования сероводорода является почернение нижнего, свисающего над посевом, конца полоски фильтровальной бумаги. Почернение полоски фильтровальной бумаги измеряется в миллиметрах.

Результаты учитываются через каждые 2 дня в течение 6 дней (2, 4, 6-й дни исследования). При каждом учете потемневшая полоска фильтровальной бумаги заменяется новой. Для окончательной оценки способности культуры к образованию сероводорода все показатели суммируются.

Наиболее выраженной способностью к образованию сероводорода обладают *B. suis* (биовар 1), в меньшей степени – *B. abortus* (биовары 1 – 4, 9), *B. inopinata* и *B. neotomae*. Отдельные штаммы *B. abortus* (биовар 6) способны к продукции H_2S . Штаммы *B. melitensis* (биовар 1) не образуют сероводород или вызывает только легкое потемнение свинцовой бумажки. Культуры *B. abortus* (биовар 5), *B. ovis*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. papionis*, *B. vulpis* – сероводород не образуют.

Оценка результатов дифференциальных признаков представлена в приложении 9 к настоящему МУ.

8.10.3. Дифференциация по редуцирующей активности в отношении красок.

К одному из основных признаков, отличающих друг от друга отдельные виды и биовары бруцелл можно отнести показатели устойчивости штаммов к воздействию на их агаровые культуры растворов красителей – основного фуксина и тионина. Этот признак лег в основу бактериостатической типизации бруцелл.

Для постановки теста рекомендуется применять твердые питательные среды (например, агар Альбими, Бруцеллагар, мясопептонный агар) и краски – основной фуксин и тионин, предварительно оттитрованные по отношению к референтным штаммам бруцелл трех основных видов (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*). Концентрация фуксина – 1:50000, тионина – 1:50000.

При отсутствии стандартных оттитрованных красок их рабочие дозы можно оттитровать с использованием референтных штаммов бруцелл. Для этого испытуемые краски добавляют к среде в различных концентрациях. Концентрация красок в среде, с которой получается четкая дифференциация референтных штаммов бруцелл (*B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330), и является рабочей дозой данной краски. Основные растворы фуксина и тионина готовятся в концентрации 1:1000 (0,1 г краски, 20 мл 95 – 96 % этилового спирта и 80 мл дистиллированной воды). Флаконы с краской хранятся в темном месте в течение 6 – 10 месяцев. Готовится питательная среда с краской следующим образом: к 100 мл охлажденного до температуры плюс 45 – 50 °С агара стерильно добавляется 2 мл основного раствора краски для получения концентрации

1:50000.

Питательная среда с краской разливается по 20 – 25 мл в каждую чашку Петри. Затем среда подсушивается, не открывая чашки. Среды с красками пригодны для работы в течение 10 – 15 дней при хранении в холодильнике при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Обесцвеченные среды не применяются. Взвесь бруцелл готовится из двухсуточной агаровой культуры. Посевы референтных и испытуемых штаммов проводятся петлей диаметром 2 мм из взвеси, содержащей в 1 мл 1,7 млрд микробных клеток по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ)³⁹ (далее – ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85)). Одна петля такой взвеси засеивается штрихом на поверхность агара. На чашку можно одновременно засеивать 4 – 6 культур, предварительно разделив чашку Петри на 4 – 6 секторов. Посевы помещаются в термостат и инкубируются при температуре плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Учет результатов осуществляется через трое суток инкубации.

Схема учета проводится по четырехкрестовой системе:

- четыре креста (++++) (далее – 4+) – интенсивный рост по всему штриху;
- три креста (+++) (далее – 3+) – интенсивный рост в начале и более слабый в конце;
- два креста (++) (далее – 2+) – менее интенсивный в начале или слабый рост по всему штриху;
- один крест (+) (далее – 1+) – очень слабый рост по ходу штриха или отдельные колонии.
- отрицательный результат (–) – рост отсутствует.

Оценка результатов дифференциальных признаков представлена в приложении 9 к настоящему МУ.

Слабый рост (1+) на среде считается положительным результатом. Культуры *B. abortus* 1 биовара растут на средах с фуксином, на средах с тионином рост отсутствует. Культуры *B. suis* 1 биовара растут на средах с тионином при отсутствии роста на средах с фуксином. Культуры *B. melitensis* растут на средах, содержащих оба красителя.

8.10.4. РА с бруцеллезными моноспецифическими сыворотками (анти-М, анти-А). Моноспецифическая сыворотка последовательно разводится до ее предельного титра (например, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 в объеме 0,5 мл). В качестве антигена применяется суспензия двухсуточной агаровой культуры изучаемого штамма в разведении до $1,7 \times 10^9$ м.к./мл по ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ) в 0,9 % растворе натрия хлорида. Для разведения сыворотки и антигена применяется 0,9 % раствор натрия хлорида, рН 7,0. Антиген добавляется по 0,5 мл во все пробирки. Разведение сыворотки удваивается (например, 1:10, 1:20).

Реакция ставится с двумя контролями:

- а) контроль с референтным штаммом *B. melitensis* 16 М;
- б) контроль с референтным штаммом *B. abortus* 544.

Пробирки со смесью сыворотки и антигена выдерживаются в термостате

³⁹ Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания.

при температуре плюс ($37 \pm 0,5$) °С 18 – 20 ч, а затем в течение 2 ч при комнатной температуре плюс (21 ± 1) °С. После этого проводится учет реакции.

В положительных случаях в пробирке со смесью сыворотки и антигена наступает агглютинация с образованием крупных или мелких хлопьев, в отрицательных – суспензия остается гомогенной. Реакция считается положительной, начиная с разведения сыворотки 1:20, но не менее чем на два креста.

Агглютинация культур бруцелл моноспецифическими сыворотками *anti-melitensis* (М), *anti-abortus* (А) зависит от их биовара.

Для культур бруцелл видов *B. ovis* и *B. canis*, а также для культур других видов и биоваров бруцелл, находящихся в R-форме, для РА используется моноспецифическая *anti-R* сыворотка, разведенная 1:10 0,9 % раствором натрия хлорида. Постановка реакции аналогична РА на стекле. В положительных случаях в течение 3 мин наступает агглютинация с образованием выраженных хлопьев, в отрицательных – суспензия остается гомогенной.

Техника постановки пробирочной РА аналогична вышеописанной, при этом начальное разведение моноспецифической *anti-R* сыворотки – 1:10.

8.10.5. Определение чувствительности культур бруцелл к бактериофагу. Для постановки теста используется бактериофаг Тб в диагностическом рабочем титре (далее – ДРТ). Для посева применяется 2-суточная взвесь агаровой культуры в 0,9 % растворе натрия хлорида с концентрацией $1,7 \times 10^9$ м.к./мл. Концентрацию бруцеллезного микроба определяют по ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ), эквивалентному $1,7 \times 10^9$ м.к. бруцелл/мл.

На предварительно подсушенные пластины агара в чашках Петри наносится 0,2 мл взвеси исследуемого штамма и шпателем равномерно распределяется по поверхности агара. Засеянные чашки подсушиваются в течение 1 ч, после чего бактериологической петлей диаметром 2 мм (по одной петле) или пастеровской пипеткой (по одной капле) наносится на газон бактериофаг в ДРТ. Чашки быстро наклоняются и капли бактериофага стекают по дорожке. Места нанесения капель и путь стекания капли можно заранее расчертить маркером на внешней стороне дна чашки. Необходимым условием успешной постановки пробы с бактериофагом является подсушивание посева культуры до нанесения бактериофага.

После подсыхания нанесенных капель бактериофага чашки переворачиваются и инкубируются в течение (48 ± 2) ч при температуре плюс ($37 \pm 0,5$) °С.

Учет результатов:

– регистрация результатов проводится по выраженности лизиса в месте нанесения бактериофага;

– лизис оценивается по четырехкрестовой системе:

- (4+) – сливной (полный) лизис культур с прозрачным дном литического пятна;

- (3+) – прозрачное пятно с единичными колониями вторичного роста или множество изолированных литических пятен;

- (2+) – прозрачное пятно лизиса со значительным вторичным ростом или

единичные изолированные литические пятна;

- (1+) – полупрозрачное слабо заметное литическое пятно;
- (-) – отсутствие литического пятна.

Оценка результатов:

- положительной считается проба при лизисе не менее чем на (2+).

В качестве контролей рекомендуются референтные штаммы *B. melitensis* 16М, *B. abortus* 544 и *B. suis* 1330.

Для постановки данного теста может быть рекомендовано применение набора бруцеллезных диагностических бактериофагов: Тб, Wb, Fi, Bk2, проявляющих различную степень литической активности в отношении штаммов бруцелл различных видов.

Оценка результатов чувствительности бруцелл к бактериофагам представлена в приложении 9 к настоящим МУ. При этом бруцеллы вида *B. abortus* и *B. vulpis* лизируются всеми четырьмя бактериофагами; *B. melitensis* – только бактериофагом Bk2; *B. suis* – Wb и Fi, лизис бактериофагом Bk2 наблюдается лишь у некоторых штаммов; *B. neotomae* лизируется бактериофагами Wb, Fi и Bk2, а некоторые штаммы – Тб; *B. pinnipedialis* и *B. ceti* – Wb, Fi, Bk2; *B. microti* – Тб и Wb; *B. inopinata* – Wb, Fi и Bk2 и частично Тб; *B. papionis* – Wb и частично Тб. Культуры *B. ovis* и *B. canis* фагами не лизируются.

Для ускорения анализа можно использовать диски фильтровальной бумаги, импрегнированные бактериофагами, которые помещаются на газон исследуемой культуры на плотной питательной среде.

8.11. Упрощенная схема видовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*.

Для видовой дифференциации штаммов бруцелл *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, имеющих наибольшее эпидемиологическое значение, необходимо использовать два теста – с бактериофагом Тб и определение адениндезаминазной активности возбудителя.

8.11.1. Определение адениндезаминазной активности бруцелл основано на качественном определении аммиака, образующегося в результате дезаминирования аденина до гипоксантина клетками бруцелл.

Готовится взвесь 2 суточной агаровой культуры исследуемых штаммов в 1 мл фосфатного буфера до конечной концентрации 3×10^9 м.к./мл. С целью приготовления взвеси культуры используется денситометр для определения мутности бактериальной суспензии. Проба делится пополам. В опытную – добавляется 1 мл 1 % раствора аденина, в контрольную – 1 мл дистиллированной воды. После этого пробирки инкубируются в термостате при температуре плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение $(24 \pm 0,5)$ ч и затем в каждую из них добавляется по 0,2 мл реактива Несслера.

Учет результатов производится визуально по изменению окраски содержимого пробирок непосредственно после добавления реактива Несслера. Если исследуемая культура не обладает дезаминазной активностью в отношении аденина (отрицательная проба) – раствор обесцвечен или слегка окрашен в желтовато-зеленый цвет, как и в контроле. При наличии дезаминазной активности (положительная проба) наблюдается ярко-красное окрашивание, возможно

появление оранжевой окраски взвеси и последующее ее выпадение в осадок.

Культуры бруцелл видов *B. abortus* и *B. melitensis* не обладают дезаминазной активностью, *B. suis* – обладает. На основании этих критериев предложена упрощенная схема видовой дифференциации культур рода *Brucella* (таблица 1).

Таблица 1

Упрощенная схема видовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза

Тесты	Видовая принадлежность культур		
	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>
Чувствительность к бактериофагу Тб в ДТР	+	–	–
Адениндезаминазная активность	–	–	+

Предлагаемые тесты для видовой дифференциации возбудителя бруцеллеза используются для предварительной дифференциации.

8.12. Для расширенной (штаммовой) дифференциации бруцелл рекомендуется расширенная схема исследования, включающая изучение способности бруцелл к росту в присутствии повышенного содержания CO₂, образованию H₂S, устойчивости к красителям – фуксину и тионину, способности агглютинироваться бруцеллезными моноспецифическими сыворотками (анти-*M*, анти-*A*) и отношение к бруцеллезным бактериофагам Тб, а также Wb, Fi, Bk2 (приложение 9 к настоящим МУ).

8.13. Выявление видо- и биоварспецифичных генетических маркеров с помощью молекулярно-биологических методов. Для определения видовой и биоварной принадлежности бруцелл используются соответствующие тест-системы в соответствии с инструкциями по применению, а также протоколы Bruce-Ladder, AMOS в модификациях, Suis-Ladder и другие в соответствии с методическими документами⁴⁰.

Для подтверждения видовой и биоварной принадлежности выделенных культур бруцелл может использоваться секвенирование отдельных фрагментов генома, содержащих видо- и биоварспецифичные мутации (например, *omp25*, *omp2a*), а также получение нуклеотидной последовательности полных геномов. Полногеномное секвенирование осуществляется в соответствии с инструкцией производителя.

Иммунологические тесты для выявления антител и иммунологической реактивности к возбудителю бруцеллеза и его антигенам

8.14. Для диагностики бруцеллеза и минимизации риска диагностических ошибок при лабораторном обследовании людей, рекомендуется применять комплекс иммунологических методов из не менее 3 – 4 тестов.

⁴⁰ МР 3.1.0288-22 «Идентификация и типирование штаммов бруцелл с использованием молекулярно-биологических методов», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 30.05.2022 (далее – МР 3.1.0288-22).

При проведении эпидемиологического расследования в очагах бруцеллеза для обследования населения используются⁴¹: реакции Хеддльсона и Райта, реакция непрямой гемагглютинации (далее – РНГА) или реакция агглютинации латекса (далее – РАЛ), ИФА, кожно-аллергическая проба Бюрне, КАСТ-тесты, РЛЛ.

При обследовании населения (профессионального контингента) перед профилактической вакцинацией используются: реакции Хеддльсона и Райта, РНГА или РАЛ, ИФА и кожно-аллергическая проба Бюрне, аллерготест *in vitro* или БриФ-тест⁴².

Для диагностики острого и подострого бруцеллеза проводятся бактериологические и иммунологические исследования (реакции Хеддльсона и Райта, РНГА или РАЛ, ИФА), КАСТ-тесты (аллерготест *in vitro*, БриФ-тест).

Для диагностики хронического бруцеллеза используется весь комплекс иммунологических реакций. К наиболее информативным можно отнести ИФА на наличие иммуноглобулинов М, G и А, кожно-аллергическую пробу Бюрне и БриФ-тест.

Наибольшая диагностическая информативность иммунологических исследований на бруцеллез достигается при применении комплекса методов. Иммунологические реакции, аллергологические и КАСТ-тесты по своему диагностическому значению (чувствительности) в различные периоды заболевания не равноценны (таблица 2).

Таблица 2

Сроки наиболее вероятного получения положительных (отрицательных) результатов иммунологических тестов у больных бруцеллезом в ходе развития инфекционного процесса

Реакции	Сроки исследования после заболевания, сутки					
	10	30	60	120	180	360
Реакция Хеддльсона	+	+	+	+	+	+
Реакция Райта	±/+	+	+	±	–	–
РНГА	±	+	+	+	+	+
ИФА	IgM	+	+	+	±/+	–/±
	IgG	±	+	+	+	+
	IgA	±	+	+	+	+
Проба Бюрне	–	+	+	+	+	+
Цитометрический тест активации базофилов (аллерготест <i>in vitro</i>)	+	+	+	+	–/±	–/±
БриФ-тест	±/+	+	+	+	+	+
Примечание: «+» – реакция положительная; «–» – реакция отрицательная; «±» – реакция сомнительная. – при латентном течении инфекции и удлинении сероконверсии сроки регистрации положительных иммунологических реакций могут изменяться (чаще увеличиваться); – при обострении инфекционного процесса, а также при суперинфекции и повторном заболевании утраченная иммунологическая реакция может восстановиться.						

⁴¹ Пункты 1187–1188, 1202 СанПиН 3.3686-21.

⁴² Пункт 1234 СанПиН 3.3686-21.

8.15. Методы выявления специфических антител.

8.15.1. Наивысшая чувствительность методов выявления специфических антител отмечается в ранние сроки от начала заболевания (первые 6 месяцев). Серологические реакции в этот период оказываются положительными почти в 98 % случаев. По мере удлинения срока заболевания процент положительных серологических реакций (РА, РНГА, РАЛ) уменьшается. В поздние периоды заболевания из тестов направленных на выявление специфических антител наибольшую диагностическую ценность имеет ИФА на наличие *IgG* и *IgA*.

При проведении обследования учитывается следующая особенность: выявление антител в низких титрах или их полное отсутствие не исключают возможности заболевания. В связи с этим рекомендуется проводить повторные исследования с интервалом 1 – 2 недели, особенно при подозрении на острую форму бруцеллеза.

Кроме того, при инфицировании людей бруцеллами вида *B. abortus* возможно формирование латентной формы течения инфекции и удлинение сероконверсии до 2 – 3 месяцев. Учитывая возможность продолжительной серонегативности, в очагах бруцеллеза крупного рогатого скота рекомендуется проведение повторного обследования на бруцеллез (не менее 2 – 3 раз в течение двух месяцев от первичного обследования) подвергшихся риску заражения лиц, у которых ранее были получены отрицательные результаты диагностических исследований.

Положительную РА с бруцеллезным антигеном могут давать также сыворотки, содержащие антитела к микроорганизмам, имеющим общие антигенные детерминанты с бруцеллами (*Escherichia coli* (далее – *E. coli*), *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*).

РА – это слипание и выпадение в осадок корпускулярных антигенов под действием специфических антител в присутствии электролита (изотонического раствора хлорида натрия). Образовавшийся в результате РА осадок называется агглютинатом.

8.15.2. Пластинчатая РА (реакция Хеддльсона).

Реакция Хеддльсона является методом ускоренной серологической диагностики бруцеллеза. Преимуществами этой реакции являются ее доступность, быстрота получения результата, возможность использования в лабораториях любого уровня и экспедиционных условиях, а также применение в качестве скрининговых тестов на энзоотичных (эндемичных) по бруцеллезу территориях и при массовых эпидемиологических обследованиях. В качестве антигена для постановки реакции применяют единый бруцеллезный диагностикум.

Реакция ставится на обычном, 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 (пробы), в последующие квадраты слева направо разливается (микропипеткой градуированной или автоматической пипеткой объемом 1 мл) испытуемая сыворотка в следующих дозах: 0,04, 0,02, 0,01 и 0,03 мл (контроль сыворотки). К первым трем дозам сыворотки добавляется по

0,03 мл антигена. К последней дозе сыворотки (0,03 мл) добавляется 0,03 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Сыворотка осторожно смешивается с антигеном стеклянной палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. Для контроля антигена к 0,03 мл 0,9 % раствора натрия хлорида добавляется 0,03 мл антигена. Затем стекло слегка подогревается над пламенем горелки так, чтобы происходило равномерное нагревание всей поверхности стекла.

В случае положительной реакции в первые же минуты в каплях сыворотки с антигеном появляются хлопья агглютината. Максимальный срок наблюдения 8 мин. Контроль сыворотки ставится с каждой испытуемой сывороткой для исключения спонтанной агглютинации. Контроль антигена ставится один (при любом числе испытуемых сывороток) для исключения спонтанной агглютинации применяемого антигена.

Регистрация результатов реакции проводится визуально по следующей системе:

- (4+) – полное просветление жидкости с крупными и (или) мелкими хлопьями (100 % агглютинации);
- (3+) – почти полное просветление жидкости с ясно заметными хлопьями (75 % агглютинации);
- (2+) – незначительное просветление жидкости с заметными хлопьями (50 % агглютинации);
- (1+) – мутная жидкость с едва заметной зернистостью (25 % агглютинации);
- (–) – равномерная мутная жидкость (отсутствие агглютинации).

Для оценки результатов рекомендуется следующая схема:

- агглютинация на 4+ во всех дозах сыворотки – результат «резко положительный»;
- агглютинация не менее 2+ во всех дозах сыворотки – результат «положительный»;
- агглютинация только в первой или в первой и второй дозах сыворотки – результат «сомнительный»;
- отсутствие агглютинации во всех дозах сыворотки – реакция «отрицательная».

Для диагностики бруцеллеза имеет значение только положительный результат реакции Хеддльсона. Реакция Хеддльсона – это скрининговый (ориентировочный) тест. При сомнительном или отрицательном результатах реакции и наличии эпидемических показаний, а также в стационаре и при обследовании доноров, когда необходимо определение титров агглютининов и их динамики, следует применять реакции Райта, РНГА или РАЛ и ИФА.

8.15.3. Пробирочная РА (реакция Райта).

РА Райта до настоящего времени остается одной из основных диагностических реакций для выявления антител к возбудителю бруцеллеза ввиду простоты ее постановки и относительной надежности для диагностики острого бруцеллеза. У людей реакция часто бывает положительной уже с первого дня лихорадочного состояния. Выраженное колебание титров может наблюдаться даже в течение суток. Существует прямая зависимость между накоплением агглютининов в крови и степенью антигенного раздражения, поэтому наиболее

высокие титры агглютининов наблюдаются при бактериемии.

Наиболее высокие титры РА наблюдаются обычно через 1 – 2 месяца после начала заболевания в фазе генерализации инфекции (в 80 % и более), а затем они начинают достаточно быстро снижаться. Через 7 – 8 месяцев от начала заболевания при отсутствии рецидивов инфекции РА становится отрицательной примерно у 50 % больных, а к концу года – у большинства заболевших. Слабо положительная (сомнительная) реакция Райта в разведениях 1:50 может наблюдаться и у здоровых женщин в последние месяцы беременности.

В пробирку разливается 0,9 % раствор натрия хлорида: во вторую – 2,4 мл, в остальные по 0,5 мл. Во вторую пробирку добавляется 0,1 мл исследуемой сыворотки, компоненты перемешиваются, 0,5 мл переносится в третью и последующие пробирки. Из последней пробирки 0,5 мл смеси удаляется, в результате в каждой пробирке получается по 0,5 мл следующих разведений 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. Из второй пробирки 0,5 мл исследуемой сыворотки, переносится в первую пробирку (контроль сыворотки в разведении 1:50), а 1,0 мл удаляется в дезинфицирующий раствор, во второй пробирке остается 0,5 мл исследуемой сыворотки.

Диагностикум разводится 0,9 % раствором натрия хлорида в соответствии с прилагаемой к нему инструкции по применению и добавляется по 0,5 мл во все пробирки, кроме контроля. После добавления диагностикума разведение сыворотки соответственно удваивается, т.е. получается 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800. Сыворотки с антигеном смешиваются путем встряхивания и помещаются в термостат при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С на 18 – 20 ч. После инкубации пробирки выдерживаются 1 – 2 ч при комнатной температуре и проводится учет реакции по стандарту мутности в зависимости от степени осаждения агглютината и просветления жидкости.

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

Дальнейшее разведение антигена 0,9 % раствором натрия хлорида проводится в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3

Разведение антигена 0,9 % раствором натрия хлорида

Компонент реакции	Степень агглютинации				
	4+	3+	2+	1+	–
Антиген, разведенный 1:2	0	0,25	0,5	0,75	1,0
0,9 % раствор натрия хлорида	1,0	0,75	0,5	0,25	0
% просветления	100	75	50	25	0

Стандарт мутности готовится каждый раз при постановке РА и ставится в термостат одновременно с основной реакцией.

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

Учет реакции развернутой агглютинации производится, оценивая последовательно каждую пробирку, начиная с контрольных, при осторожном встряхивании. В контрольных пробирках агглютинации не должно быть.

Интенсивность РА оценивается следующим образом:

- (4+) – полная агглютинация (хлопья агглютината в абсолютной прозрачной жидкости);
- (3+) – неполная агглютинация (хлопья в слабоопалесцирующей жидкости);
- (2+) – частичная агглютинация (хлопья различимы, жидкость слегка мутная);
- (–) – отсутствие агглютинации (жидкость равномерно мутная, хлопья отсутствуют).

Диагностическим титром считается РА не менее, чем (2+) при разведении сыворотки 1:100 и выше. Титр в РА 1:50 – реакция сомнительная.

При диагностической оценке РА рекомендуется следующая схема:

- титр сыворотки 1:50 (50 международных единиц антител, далее – МЕ/мл) – результат сомнительный;
- 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) и выше – результат резко положительный.

При применении стандартизованного диагностикума титры исследуемых сывороток соответствуют количеству МЕ/мл. Так, например, титры 1:50, 1:100, 1:200 соответственно равны 50, 100, 200 МЕ/мл.

Положительную РА с бруцеллезным антигеном могут давать также сыворотки, содержащие антитела к микроорганизмам, имеющим общие антигенные детерминанты с бруцеллами, перечисленные в пункте 8.15.1. Инактивация сыворотки при температуре плюс 56 °С в течение 30 мин исключает неспецифические результаты реакции агглютинации.

8.15.4. РНГА.

РНГА является специфичным и высокочувствительным методом выявления бруцеллезных антител в сыворотке крови человека. Гемагглютинины часто выявляются в сыворотке больных в тех случаях, когда все остальные реакции дают отрицательный или сомнительный результат. Чувствительность реакции при остром и подостром бруцеллезе составляет более 91 %, при хроническом бруцеллезе 55 – 70 %.

Для постановки РНГА используются:

- бруцеллезный эритроцитарный антигенный диагностикум;
- контрольные (несенсибилизированные) эритроциты;
- разводящая жидкость (нормальная сыворотка кролика, твин);
- бруцеллезная сыворотка.

Для титрования испытуемых сывороток нормальная сыворотка кролика инактивируется при температуре плюс 56 °С в течение 30 мин и разводится 0,9 % раствором натрия хлорида 1:100.

Испытуемая сыворотка разводится 0,9 % раствором натрия хлорида 1:25 (0,1 мл сыворотки + 2,4 мл 0,9 % раствора натрия хлорида) и инактивируется в течение 30 мин при температуре плюс 56 °С. Перед исследованием сыворотка адсорбируется 50 % взвесью контрольных эритроцитов. К 1,2 мл инактивированной сыворотки добавляется 0,2 мл 50 % эритроцитов, смесь

встряхивается и оставляется на 30 мин при комнатной температуре. Затем смесь центрифугируется при 1 000 об/мин в течение 2 мин.

Можно оставить сыворотки с эритроцитами на 8 – 12 ч в холодильнике при температуре плюс (4 ± 2) °С, в этом случае исключается этап центрифугирования.

Эритроцитарный диагностикум перед применением разводится 0,9 % раствором натрия хлорида (рН 7,0 – 7,2) согласно инструкции по применению, получается 2,5 % взвесь, которая применяется в РНГА.

Контрольные (несенсибилизированные) эритроциты также разводятся в соответствии с инструкцией. Полученная 2,5 % взвесь применяется для контроля сывороток.

Реакция ставится в прозрачных полистироловых пластинках с лунками. Каждая сыворотка исследуется не менее чем в 6 – 8 разведениях, начиная с 1:50. Разведенная 1:100 инактивированная сыворотка кролика разливается во все лунки по 0,5 мл. Затем в первую лунку (контроль сыворотки) вносится 0,5 мл испытуемой сыворотки, предварительно инактивированной и разведенной 1:25, перемешивается и 0,5 мл удаляется. Во вторую лунку также добавляется 0,5 мл испытуемой сыворотки (1:25), перемешивается, переносится 0,5 мл в третью лунку, и сыворотка титруется до конца ряда. Из последней лунки 0,5 мл удаляются. Таким образом, получается ряд последовательных двукратных разведений испытуемой сыворотки, начиная с 1:50, в объеме 0,5 мл.

В первые лунки (контроль сыворотки) добавляются микропипеткой (автоматической пипеткой) по 0,05 мл контрольных эритроцитов. Затем в каждую лунку, начиная со второй, с помощью микропипетки (автоматической пипетки) добавляется по 0,05 мл диагностикума. Пластины осторожно встряхиваются до полного перемешивания содержимого лунки, следя, чтобы не было разбрызгивания жидкости, и оставляются при комнатной температуре. Учет реакции проводится через 2 – 3 ч.

При постановке РНГА предусматриваются следующие контроли:

– контроль разводящей жидкости (контроль качества нормальной сыворотки кролика (1:100) проводится в двух лунках. К 0,5 мл сыворотки добавляются в первую лунку 0,05 мл 2,5 % взвеси диагностикума, во вторую – 0,05 мл контрольных эритроцитов;

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

Реакция считается специфической, если в контролях исследуемых и контрольной сывороток отсутствует гемагглютинация, а титр специфической сыворотки в реакции будет соответствовать титру, указанному в инструкции по применению эритроцитарного диагностикума.

Оценка реакции проводится по следующей схеме:

– (4+) – эритроциты покрывают все дно лунки равномерным слоем, иногда в виде зонтика;

– (3+) – эритроциты покрывают 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;
- (–) – осадок эритроцитов на дне лунки в виде пуговки или маленького кольца (отрицательная реакция).

За титр сыворотки принимается ее последнее разведение с оценкой реакции не менее чем (3+). Оценка результатов исследования сывороток на бруцеллез в РНГА у людей: титр 1:50 – реакция сомнительная, титр 1:100 и выше – реакция положительная.

РНГА может быть выполнена микрометодом, титрование проводится в объемах 25 и 50 мкл. Техника постановки реакции, последовательность всех операций такая же, как и при использовании макрометода. В лунки после титрования добавляется 25 мкл эритроцитарного диагностикума, разведенного 1:10, пластины слегка встряхиваются до получения гомогенной взвеси. Учет проводится через 2 – 3 ч по аналогичной схеме, как и при использовании макрометода.

Следует учитывать то, что чувствительность микрометода обычно на одно разведение ниже, чем макрометода.

8.15.5. РАЛ.

РАЛ является вариантом РНГА, в которой полимерные микросферы (латексные частицы) с адсорбированными на них молекулами антигенов вступают в реакцию и агглютинируют с комплементарными антителами.

Диагностическая специфичность метода РАЛ до 94 %, чувствительность – 77,5 – 80 %. Эта реакция может быть рекомендована как дополнительный тест для экспрессной иммунологической диагностики бруцеллеза и осуществляется в соответствии с инструкцией по применению препарата.

Для постановки РАЛ используются следующие реактивы:

- бруцеллезный латексный антигенный диагностикум 2 %;
- положительный контрольный образец (К+) сухой;
- 0,9 % натрия хлорид, рН ($7,2 \pm 0,1$);
- дистиллированная вода.

Материалом для исследований является сыворотка крови человека. Исследуемая сыворотка разводится 0,9 % раствором натрия хлорида 1:25 (0,1 мл сыворотки + 2,4 мл 0,9 % раствора натрия хлорида) и инактивируется в течение 30 мин при температуре плюс 56 °С.

Образцы сыворотки крови допустимо хранить при температуре плюс (4 ± 2) °С не более 5 суток или при температуре минус (20 ± 2) °С – до 3 месяцев. После размораживания образец тщательно перемешивается.

Подготовка компонентов перед началом проведения исследования.

Перед постановкой реакции все реактивы выдерживают при температуре плюс 18 – 26 °С не менее 30 мин.

Подготовка диагностикума латексного бруцеллезного антигенного 2 %. Содержимое одной ампулы ресуспендируется в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для получения 2 % концентрации диагностикума. Затем дополнительно разводится 0,9 % раствором натрия хлорида в 5 раз для получения 0,4 % концентрации препарата. Перед проведением реакций диагностикум тщательно

перемешивается.

Подготовка положительного контрольного образца (К+) сухого. Содержимое ампулы растворяется в 2,0 мл дистиллированной воды, получая разведение 1:10. Затем разводится в 2,5 раза 0,9 % раствором натрия хлорида для получения разведения 1:25.

Техника постановки реакции.

Реакция проводится в лунках планшета полимерного круглодонного для иммунологических реакций (объем лунок 0,4 мл) микрометодом. Каждая сыворотка исследуется не менее чем в 7 разведениях, начиная с 1:50.

В девять лунок каждого ряда планшета дозатором механическим вносится по 25 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. В первые лунки рядов дозатором механическим одноканальным вносится по 25 мкл исследуемых инактивированных сывороток в разведении 1:25. Делаются последовательные двукратные разведения переносом по 25 мкл из одной лунки в другую до седьмых лунок включительно, из последних лунок 25 мкл удаляется. Получаются конечные разведения исследуемых сывороток от 1:50 до 1:3200.

В восьмую лунку вносится 25 мкл подготовленного положительного контрольного образца (К+). Последняя лунка ряда используется для контроля диагностикума (К-).

После титрации во все лунки добавляется по 20 мкл диагностикума латексного бруцеллезного антигенного 0,4 % концентрации.

Содержимое лунок осторожно перемешивается покачиванием планшета и оставляется при температуре плюс (21 ± 1) °С на ровной неподвижной поверхности.

Порядок внесения сывороток и контролей в планшет представлен на рисунке 1.

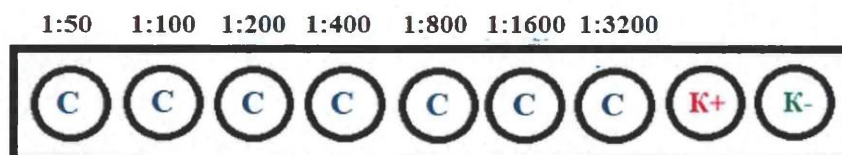


Рисунок 1. Порядок внесения сывороток и контролей в планшет. Примечание: С – исследуемая сыворотка; К+ – положительный контрольный образец; К- – контроль диагностикума

Учет и интерпретация результатов.

Учет результатов проводится через $(3,5 \pm 0,5)$ ч визуально без использования оборудования.

Оценка реакции проводится по следующей схеме:

- (4+) – диагностикум покрывает все дно лунки равномерным слоем, иногда в виде зонтика;
- (3+) – диагностикум покрывает все дно лунки тонким равномерным слоем, занимающий не менее 2/3 диаметра сферической поверхности лунки;
- (2+) – агглютинат небольшой, расположен в центре лунки;
- (1+) – осадок диагностикума на дне лунки в виде пуговки (отрицательная реакция).

Распределение диагностикума на поверхности дна лунок планшета

представлено на рисунке 2.

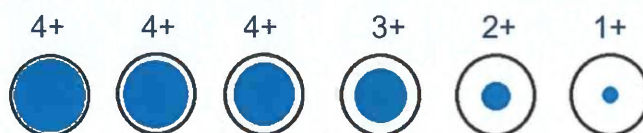


Рисунок 2. Распределение диагностикума на поверхности дна лунок планшета в зависимости от степени агглютинации

Оценка результатов.

За титр сыворотки принимается ее последнее разведение с оценкой реакции не менее чем (3+). Диагностическим является титр сыворотки 1:100 и выше.

8.15.6. ИФА.

Метод ИФА имеет высокую информативность для диагностики всех форм бруцеллеза, при обследовании людей перед вакцинацией. К основным преимуществам ИФА относится возможность ранней диагностики заболевания, наблюдение за динамикой инфекционного процесса, быстрота и удобство постановки реакции, возможность количественного определения антител разных классов IgM, IgG, IgA.

В острой фазе заболевания в крови пациентов регистрируются иммуноглобулины класса М (IgM), концентрация которых достигает максимальных значений в течение первых недель заболевания и начинает снижаться через 3 – 6 месяцев после заболевания. Чувствительность ИФА на наличие специфических IgM составляет 67 – 95 %, в зависимости от используемых тест-систем. Циркуляция IgM и IgG характерна для острой/подострой форм, тогда как IgG преобладают при хроническом бруцеллезе. При хронической форме заболевания возможна совместная циркуляция IgG и IgA и отдельно иммуноглобулинов этих классов.

Постановка и учет ИФА осуществляются в соответствии с инструкцией к диагностическому препарату. Для постановки ИФА используются зарегистрированные в установленном порядке⁴³ тест-системы (приложение 6 к настоящим МУ).

8.16. Тесты, выявляющие специфическую иммунологическую реактивность организма к бруцеллезным антигенам.

Для выявления иммунологической реактивности организма используется комплекс методов, включающий кожно-аллергическую пробу с бруцеллином (проба Бюрне) и КАСТ-тесты: цитометрический тест активации базофилов (аллерготест *in vitro*), РЛЛ, БрИФ-тест и тест *in vitro* активации лимфоцитов с учетом реакции в цитометрическом формате.

8.16.1. Кожно-аллергическая проба Бюрне.

Внутрикожная аллергическая проба основана на способности организма, сенсibilизированного бруцеллезным антигеном, специфически отвечать местной реакцией (отек, болезненность) на внутрикожное введение аллергена бруцеллезного жидкого – бруцеллина (приложение 6 к настоящим МУ).

⁴³ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

Бруцеллин представляет собой фильтрат убитой нагреванием бульонной культуры бруцелл. Внутрикожная аллергическая проба становится положительной к концу первого месяца (через 20 – 30 суток) заболевания в 70 – 85 % случаев, но бывают случаи и более раннего ее появления – на 7 – 8 день болезни. Положительная проба Бюрне регистрируется в острой фазе болезни у 55 % больных, подострой – у 80,3 %. У больных с хронической формой бруцеллеза положительная кожная реакция выявляется в 90 – 95 % случаев. Кожная реакция сохраняется долго (иногда годами и пожизненно), после исчезновения клинических симптомов. Аллергическая реакция может быть положительной и в случаях бессимптомной инфекции. Кожная проба становится положительной и спустя 1 – 1,5 месяца после вакцинации людей живой бруцеллезной вакциной. Реакция бывает выраженной в период от 2 – 3 до 12 – 13 месяцев и постепенно угасает.

Техника постановки пробы в соответствии с инструкцией по применению.

Бруцеллезный аллерген вводится внутрикожно в количестве 0,1 мл. Инъекция делается с соблюдением правил асептики на ладонной поверхности предплечья шприцем с тонкой иглой. Учет реакции проводится через 24 – 48 ч. после введения аллергена путем осмотра и ощупывания кожи. В некоторых случаях аллергическая реакция становится положительной к 72 ч.

При положительной реакции на месте введения аллергена появляется красноватая или бледная болезненная отечность удлиненной или овальной формы. Отек может быть хорошо контурирован с ясным возвышением над уровнем кожи. При слабо выраженной реакции отек распознается только при ощупывании (сравнить с аналогичным участком кожи на другой руке). Гиперемию кожи при отсутствии отека принимают за отрицательный результат. При учете реакции отмечается размер отека в сантиметрах (длина и ширина), степень болезненности через 24 и 48 ч. При отрицательном результате следует учитывать реакцию и через 72 ч.

Учет результатов реакции.

Наличие выраженного отека кожи на месте введения аллергена считается положительной аллергической реакцией. Отсутствие болезненности и гиперемии при наличии отека не исключает положительной оценки пробы.

Реакция, появившаяся и исчезнувшая ранее 6 ч после введения аллергена, считается неспецифической.

У людей, сенсibilизированных бруцеллезным антигеном, возможна общая реакция организма на введение бруцеллина с повышением температуры, ознобом, головной болью и недомоганием и местная реакция, проявляющаяся выраженным воспалением, серозным отеком в месте введения, лимфангитом и лимфаденитом регионарных лимфатических узлов.

Оценка результатов реакции:

- «слабо положительная» – слабо выраженный отек не более 2 см в диаметре;
- «положительная» – отек размером от 2 до 6 см в диаметре;
- «резко положительная» – отек свыше 6 см, иногда сопровождающийся выраженным воспалением в месте введения аллергена, лимфангитом, лимфаденитом и общей реакцией организма.

8.16.2. РЛЛ.

РЛЛ основана на учете разрушения лейкоцитов сенсibilизированного организма под влиянием специфического антигена, регистрируемого методом *in vitro*. РЛЛ дает возможность количественного учета степени сенсibilизации организма, позволяет получить ответ через 3 – 4 ч после взятия крови.

Специфический лизис лейкоцитов может наступать на 15 сутки после заражения, достигая максимума к 2 – 3 месяцам. Отмечается определенная корреляция между степенью лизиса лейкоцитов и активностью инфекционного процесса.

РЛЛ проводится в пробирках из химически чистого стекла. В качестве антигена используется взвесь убитой нагреванием культуры вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА в концентрации $1,0 \times 10^7$ м.к./мл.

Кровь для исследования берется в количестве 1 мл и вносится в микропробирку с гепарином из расчета 75 – 80 МЕ гепарина на 1 мл крови. По 0,4 мл гепаринизированной крови помещается в две микропробирки. В первую пробирку добавляется 0,1 мл бруцеллезного антигена (опытная пробирка), во вторую – 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для установления неспецифического лизиса лейкоцитов (контрольная пробирка). Пробирки встряхиваются в течение 2 – 3 мин, после чего проводится подсчет лейкоцитов в камере Горяева по принятому в гематологии методу. Затем пробирки помещаются в термостат на 2 ч при температуре плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Содержимое пробирок периодически перемешивается автоматическим дозатором в течение 1 мин через каждые 15 – 20 мин. После инкубации содержимое пробирок повторно перемешивается автоматическим дозатором в течение 1 мин и проводится подсчет лейкоцитов.

Учет результатов реакции.

Процент лейкоцитов после инкубации в опытной и контрольной пробирках определяется отношением количества лейкоцитов после инкубации к количеству лейкоцитов до инкубации.

Показатель специфического лизиса (далее – ПСЛ) лейкоцитов подсчитывается путем определения разницы – процент уменьшения лейкоцитов в опытной пробирке минус процент уменьшения лейкоцитов в контроле. Подсчет проводится не менее 2 – 3 раз для каждой пробирки, а затем выводится среднее их количество.

ПСЛ выражается отрицательной величиной и колеблется в пределах от 10 до 30 % и более. Показатель ПСЛ меньше 10 % свидетельствует о неспецифическом лизисе лейкоцитов.

8.16.3. Цитометрический тест активации базофилов (аллерготест *in vitro*).

Определение аллергической перестройки организма проводится в условиях *in vitro* с помощью диагностических наборов для постановки тестов активации базофилов, с учетом реакции в цитометрическом формате, разрешенных к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке⁴⁴. Тест используется для определения экспрессии CD63 (CD203) на поверхности

⁴⁴ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

базофилов цельной крови методом проточной цитофлуориметрии после антигенной стимуляции. В качестве антигена используется аллерген бруцеллезный жидкий – бруцеллин (приложение 6 к настоящим МУ).

Принцип метода.

При взаимодействии *in vitro* аллергена (бруцеллина) с аллергенспецифическими молекулами IgE на поверхности базофилов происходит каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции (активации) и высвобождению медиаторов из гранул (гепарин, гистамин). В качестве маркера (индикатора) клеточной перестройки базофилов детектируется CD63 (gp53). Для выявления маркера активации базофилов используется реагент для окраски (Staining Reagent) состоящий из смеси моноклональных антител к поверхностным маркерам CD63 (CD203) человека, конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианитом (анти-CD63-FITC) и к хемокиновому рецептору (далее – CCR), меченому фикоэритрином (анти-CCR3-PE). CCR3 конститутивно экспрессируется на базофилах. При проведении реакции используют два независимых позитивных контроля: антитела к высокоафинному рецептору IgE (англ. fragment crystallizable region epsilon receptor-1, далее – FcεR1) или пептид хемотаксический (англ. N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, далее – fMLP) – триплед, вызывающий спонтанную активацию базофилов неиммунологическим путем. Если хотя бы в одном из контролей наблюдается более 10 % активированных базофилов, то образец считается подходящим для исследования.

1. Подготавливаются и маркируются три пробирки для проточного цитометра:

– фоновая проба – вносится 50 мкл стимулирующего буфера;

– положительный контроль – вносится по 50 мкл положительного контроля FcεR1 или fMLP;

– проба с аллергеном – вносится 50 мкл коммерческого бруцеллина (100 мкл аллергена содержит от 3,8 до 5,4 мкг белка).

2. Непосредственно перед исследованием стабилизированная антикоагулянтном кровь перемешивается легким покачиванием в течение 2 мин (приблизительно 30 покачиваний/мин) или с помощью перемешивающего устройства на малых оборотах.

3. Во все три пробирки добавляется по 100 мкл стимулирующего буфера.

4. Добавляется 50 мкл исследуемой крови.

5. Смесь перемешивается с помощью перемешивающего устройства.

6. Во все пробирки добавляется по 20 мкл окрашивающего реагента, содержащего конъюгаты моноклональных антител к поверхностным маркерам активации базофилов человека (CD63) и CCR.

7. Смесь перемешивается пипетированием с помощью дозатора и инкубируется 15 мин на водяной бане при температуре плюс $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

8. Для лизиса эритроцитов во все пробирки вносится по 2,0 мл предварительно прогретого до плюс 18 – 25 °C лизирующего раствора в рабочем разведении 1:10. Инкубируется 5 – 10 мин при температуре плюс 18 – 25 °C.

9. Центрифугируется в течение 5 мин при 1000 об/мин и удаляется супернатант (надосадочная жидкость).

10. Вносится в каждую пробирку по 450 мкл отмывочного буфера.

11. Смесь перемешивается с помощью перемешивающего устройства в течение 10 с.

12. Анализируется проба с помощью проточного цитометра (в течение 2 – 3 ч) с использованием программы для учета результатов цитометрического исследования.

13. Учет результатов.

Результатом является разница процентного содержания базофилов, экспрессирующих рецепторы к CD63, в пробе с аллергеном и в фоновой (без аллергена) пробе.

14. Оценка результатов:

– значения от 0 до 5 % – отрицательная реакция;

– значения более 5 % – положительная реакция.

Увеличение количества активированных базофилов ($CCR3^+CD63^+ > 5\%$) свидетельствует о наличии в организме специфической IgE-опосредованной сенсибилизации к антигенам бруцелл, которая возникает при инфекционном процессе или формировании поствакцинального иммунитета.

8.16.4. Тесты *in vitro* активации лимфоцитов.

Изучение реакции Т-лимфоцитов в ответ на антигенную стимуляцию является наиболее информативным (маркерным) и объективным методом при оценке иммунологической перестройки организма при болезни или вакцинации.

Для антигенной активации лимфоцитов используется «Антигенный белково-полисахаридный комплекс из штамма *B. abortus* 19 ВА лиофилизированный для клеточных тестов *in vitro*» (далее – АБПК). Проведение реакций, метод получения и контроль бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro* изложены в методических документах⁴⁵.

8.16.4.1. БриФ-тест применяется как дополнительный метод для подтверждения бруцеллезной инфекции, в т.ч. при слабо выраженной сероконверсии, а также при комплексном иммунологическом обследовании лиц перед вакцинацией против бруцеллеза. Тест рекомендуется в качестве альтернативы кожно-аллергической пробе Бюрне. Метод дает возможность количественного учета степени иммунологической реактивности (гиперчувствительности) к возбудителю бруцеллеза (к антигенам бруцелл) и оценки формирования специфического клеточного иммунитета.

Значения результатов БриФ-теста выше по мере развития у заболевших бруцеллезной инфекции. У больных бруцеллезом с острым течением инфекции значения БриФ-теста коррелируют с результатами реакции Хеддльсона. По мере развития бруцеллезной инфекции степень корреляции теста с результатами серологических реакций снижается. Тест становится положительным на 10 – 14 день после заболевания у 70 – 80 % заболевших, по мере развития и хронизации инфекции положительный БриФ-тест выявляется в 90 % и более случаев. БриФ-тест дает положительный результат через 14 – 30 дней после

⁴⁵ МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 19.08.2020 (далее – МР 3.1.0207-20).

вакцинации людей живой бруцеллезной вакциной. Через 10 – 12 месяцев положительная реакция сохраняется у менее 30 % привитых. У лиц, многократно ревакцинированных против бруцеллеза, БриФ-тест может быть положительным длительное время (несколько лет).

Принцип метода.

Метод основан на способности сенсibilизированных (праймированных) Т-лимфоцитов в условиях *in vitro* продуцировать гамма интерферон при контакте с бруцеллезным антигеном в крови людей, иммунных к возбудителю бруцеллеза.

Постановка реакции проводится в соответствии с инструкцией к используемой ИФА-тест-системе по выявлению в плазме крови интерферона гамма.

Образцы цельной гепаринизированной крови инкубируются с АБПК в течение ($24 \pm 0,5$) ч при температуре плюс ($37 \pm 0,5$) °С. После инкубации проб отбирается надосадочная жидкость (плазма), в которой с помощью твердофазного ИФА определяется концентрация гамма интерферона. Образцы крови, инкубированные с 0,9 % раствором натрия хлорида, являются контролем.

Метод определения гамма интерферона основывается на трехстадийном «сендвич»-варианте твердофазного ИФА с использованием моно- и поликлональных антител к гамма интерферону человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируются в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами. Имеющийся в образцах гамма интерферон связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся гамма интерферон на второй стадии взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 1 (биотинилированные поликлональные антитела к гамма интерферону человека). На третьей стадии связавшийся конъюгат № 1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 2 (стрептавидин с пероксидазой хрена).

Количество связавшегося конъюгата № 2 определяется цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена (тетраметилбензидина). Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации содержащегося в образце гамма интерферона.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация гамма интерферона в исследуемых образцах. Уровень антигениндуцированной продукции Т-лимфоцитами гамма интерферона определяется по разнице показателей между опытным и контрольным образцами.

Техника постановки реакции⁴⁶.

1. Готовятся и маркируются две пластиковые круглодонные пробирки объемом 5 мл:

– фоновая проба (контрольная проба) – вносится 50 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия и 500 мкл гепаринизированной крови;

– проба с антигеном (опытная проба) – 50 мкл рабочего разведения АБПК

⁴⁶ Примечание: техника постановки реакции может быть изменена в соответствии с инструкцией к используемой ИФА тест-системе по выявлению в плазме крови интерферона гамма.

1:200 и 500 мкл гепаринизированной крови.

2. Перемешивается с помощью перемешивающего устройства в течение 5 с и плотно закрывается крышкой пробирки. Пробы инкубируются при температуре плюс $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ в течение $(24 \pm 0,5)$ ч.

3. После инкубации пробирки центрифугируются 10 мин при 2000 об/мин.

4. Из контрольной и опытной проб отбирается надосадочная жидкость в отдельные пробирки.

5. Вносятся во все лунки стрипов по 100 мкл раствора для разведения образцов (РРО).

6. В лунки А-1, В-1, С-1, D-1, Е-1, F-1, G-1 вносится по 100 мкл калибровочных и контрольного образцов, в остальные – по 100 мкл исследуемых проб.

7. Вносятся образцы в течение не более 15 мин.

Стрипы закрываются пленкой, помещаются в шейкер. Инкубируются 120 мин при температуре плюс $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ при 700 об/мин.

8. По окончании инкубации снимается липкая пленка и помещается в сосуд с дезинфицирующим раствором⁴⁷. Содержимое лунок удаляется в сосуд с дезинфицирующим раствором, а лунки планшета промываются 5 раз промывочным раствором. При этом в каждую лунку вносится 350 мкл промывочного раствора в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. После каждого цикла отмывки полное опорожнение лунок. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляются, постукиванием перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

9. Внесение раствора конъюгата № 1, инкубация:

– в каждую лунку стрипов вносится по 100 мкл раствора конъюгата № 1.

Стрипы закрываются пленкой, помещаются в шейкер. Инкубируются 60 мин при температуре плюс $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ при 700 об/мин;

– по окончании инкубации лунки стрипов промываются 5 раз промывочным раствором как описано выше.

10. Внесение раствора конъюгата № 2, инкубация:

– в каждую лунку стрипов вносится по 100 мкл раствора конъюгата № 2.

Стрипы закрываются пленкой, помещаются в шейкер. Инкубируются 30 мин при температуре плюс $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ при 700 об/мин;

– по окончании инкубации лунки стрипов промываются 5 раз промывочным раствором как описано выше.

11. Внесение раствора ТМБ, инкубация:

– вносятся в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубируются в темноте в течение 25 мин при температуре плюс $18 - 25 ^\circ\text{C}$;

– вносятся во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензида, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

Для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в

⁴⁷ Таблица 6 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

образцах плазмы крови используются соответствующие диагностические наборы, разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке⁴⁸ (Приложение 6 к настоящим МУ).

Учет результатов.

Результаты ИФА регистрируются с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620 – 650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

Определение значения оптической плотности для лунок, содержащих калибровочные, контрольные и анализируемые образцы. Определение концентрации гамма интерферона.

Построение калибровочного графика зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации гамма интерферона (ось абсцисс) в калибровочных образцах.

Для определения концентрации гамма интерферона в анализируемых пробах на оси ординат отмечается значение оптической плотности анализируемого образца. Проводится прямая до пересечения с калибровочной кривой. От полученной точки пересечения опускается перпендикуляр на ось абсцисс. Точка пересечения и является искомым значением концентрации гамма интерферона в образце. Результаты получают в пкг/мл.

Уровень антигениндуцированной продукции Т-лимфоцитами гамма интерферона в МЕ/мл рассчитывается по формуле (1):

$$x = \frac{(c-d) \times 0,35}{17,5}, \quad (1)$$

где: x – результата теста в МЕ/мл;

C – значения (в пкг/мл), полученные при анализе опытной пробы;

D – значения (в пкг/мл), полученные при анализе фоновой пробы.

Оценка результатов:

– значения от 0 до 0,90 МЕ/мл – отрицательный результат;

– значения от 0,91 до 1,00 МЕ/мл – сомнительный результат;

– значения более 1,00 МЕ/мл – положительный результат.

8.16.4.2. В тестах антигенспецифической *in vitro* активации лимфоцитов с учетом реакции в цитометрическом формате⁴⁹ в качестве диагностически информативных показателей специфической клеточной антигенреактивности выступают маркеры (рецепторы) активации лимфоцитов: CD25, CD69, CD71, антиген DR системы HLA, CD95, CD95L, BSL-2. При активации клетки, экспрессия перечисленных антигенов, как правило, происходит в следующем порядке: CD69, CD25, CD71, HLA-DR. В связи с этим CD69, CD25 и CD71 рассматривают как ранние активационные маркеры, а HLA-DR – как поздние

⁴⁸ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

⁴⁹ МР 3.1.0207-20.

активационные маркеры.

Увеличение количества активированных антигеном Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$ и (или) $CD3^+CD69^+$, $CD3^+CD71^+$) свидетельствует о наличии у обследуемого пула премированных лимфоцитов, несущих антигенспецифические рецепторы (рецепторы к антигенам бруцелл), которые образовались при взаимодействии антигенов бруцелл с иммунной системой хозяина в результате инфекционного процесса или формирования поствакцинального иммунитета.

Специфическая индикация бруцелл в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, патологическом и другом биологическом материале

8.17. Для быстрого обнаружения возбудителя бруцеллеза в первичных посевах, пищевых продуктах, воде и патологическом материале применяются следующие методы исследования: микроскопия препаратов, окрашенных по Граму или Козловскому, метод флуоресцирующих антител (далее – МФА), ИФА, МАНК, каждый из которых обладает определенным уровнем чувствительности и скоростью получения результатов (таблица 4).

Таблица 4

Сравнительные данные по чувствительности методов индикации бруцелл и срокам получения результатов

Метод исследования	Чувствительность метода	Сроки получения результата, ч
МФА	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл	1 – 2
ИФА	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ м.к./мл	4 – 5 (выявление антител)
	1 – 5 нг/мл растворимого антигена	8 – 10 (выявление антигена)
ПЦР	1×10^3 м.к./мл	5 – 6
МАНК	1×10^3 м.к./мл	2 – 3

8.18. Бактериоскопия мазков.

Бактериоскопия относится к экспресс-методам диагностики бруцеллеза и используется для обнаружения бруцелл в органах abortированного плода, в плаценте и выделениях из родовых путей abortировавших животных, в пищевых продуктах, воде и патологическом материале, а также на этапе идентификации штаммов-изолятов бруцелл.

Выявление бруцеллезного микроба проводится в мазках, окрашенных по Граму и по Козловскому. При окраске по Граму бруцеллы окрашиваются в красный цвет (грамотрицательны), при окраске препаратов по способу Козловского бруцеллы сохраняют красную окраску сафранина. Другие бактерии окрашиваются в зеленый цвет.

8.19. МФА.

МФА позволяет выявлять через 1 – 2 ч после начала исследования как

живые, так и нежизнеспособные бактерии по свечению в них специфического антигена. Данный метод чаще используется при исследовании фильтратов и центрифугатов проб воды, почвы и молока, а также на этапе идентификации выделенных культур бруцелл. Метод может применяться для исследования патологического материала от людей и животных.

Положительный результат может быть получен при наличии в исследуемом материале сравнительно высокой концентрации микроорганизмов (1×10^5 – 1×10^6 м.к./мл). Поэтому при исследовании нативного материала предварительно проводится концентрирование бактерий путем центрифугирования, вакуумной фильтрации через мембранные фильтры или агглютинации диагностической бруцеллезной поливалентной сывороткой.

В качестве препарата для окрашивания мазков используются иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные, разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке (приложение 6 к настоящим МУ). Постановка реакции осуществляется в соответствии с инструкцией к используемым иммуноглобулинам диагностическим флуоресцирующим бруцеллезным.

Положительный результат МФА при соответствующих клинических, патологоанатомических, эпидемиологических и эпизоотологических данных позволяет дать предварительный положительный ответ. Учитывая сравнительно низкую чувствительность метода, получение отрицательного результата не гарантирует отсутствие возбудителя в исследуемом материале.

8.20. ИФА.

Метод используется для выявления бруцеллезного антигена в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, биологическом материале и биоматериале от животных, а также для идентификации выделенных культур бруцелл.

Выявление бруцеллезного антигена в ИФА происходит за счет специфического взаимодействия бруцеллезных иммуноглобулинов, сорбированных на планшете, с бруцеллезным антигеном, содержащимся в исследуемом материале. Образовавшийся комплекс «антиген + антитело» выявляется с помощью конъюгата.

Постановка ИФА осуществляется в соответствии с инструкцией по применению иммуноферментной тест-системы для определения бруцеллезного антигена (приложение 6 к настоящим МУ).

8.21. ПЦР.

ПЦР используется для обнаружения ДНК бруцелл в биологическом материале от людей (кровь, сыворотка крови, пунктат из лимфоузлов, синовиальная жидкость), животных (кровь, молоко, плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных, материал от абортированного плода, содержимое бурс и гигром, лимфатические узлы, паренхиматозные органы, семенники), объектах окружающей среды (вода, почва, смывы) и пищевых продуктах (молоко, кисломолочные продукты). Выявление возбудителя может быть до уровня рода *Brucella* spp. или видов бруцелл.

Регламентированным методом выделения ДНК при подготовке проб к ПЦР-

анализу является метод нуклеосорбции или преципитации в присутствии высокомолярного гуанидинтиоцианата. Подготовка проб и обеззараживание биологического материала для ПЦР-исследования выполняется в соответствии с методическими документами⁵⁰. Для экстракции ДНК также используются методы преципитации, фенол-хлороформовой экстракции, нуклеосорбции ДНК в присутствии йодида натрия после обработки образца детергентом додецил сульфатом (англ. sodium dodecyl sulfate, SDS), щелочного метода, лизиса клеток раствором йодида натрия с последующей обработкой изопропанолом.

Для подготовки проб биоматериала от животных кусочки органов массой до 10 г растираются в стерильной ступке с добавлением 0,9 % стерильного раствора натрия хлористого в соотношении 1:5. Надосадочная жидкость отбирается через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируется в течение 15 мин при 12000 об/мин, осадок суспендируется в 0,2 – 0,5 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлористого и используется для выделения ДНК.

ПЦР-анализ проводится в соответствии с инструкцией по применению диагностических препаратов. В зависимости от назначения препарата в результате исследований определяется наличие ДНК бруцелл без определения их видовой принадлежности или ДНК отдельных видов патогена. При оценке результатов ПЦР следует учитывать, что праймеры, используемые в тест-системе, обеспечивают амплификацию специфичных фрагментов ДНК всех видов бруцелл, в т.ч. и вакцинных штаммов.

Алгоритм идентификации и типирования штаммов бруцелл с использованием современных молекулярно-биологических методов изложен в методических документах⁵¹.

8.22. MALDI-TOF MS.

В качестве дополнительного метода идентификации выделенных штаммов используется MALDI-TOF MS. Применение метода MALDI-TOF MS для идентификации возбудителя бруцеллеза включает получение белковых экстрактов бруцелл, регистрацию масс-спектров, идентификацию патогена с использованием базы данных.

Методика заключается в измерении отношения массы заряженной частицы (иона) к его заряду. Полученный результат представляет собой совокупность спектральных сигналов заряженных частиц – масс-спектр.

Подготовку проб для масс-спектрометрии, проведение, учет и интерпретацию результатов исследований осуществляют в соответствии с методическими документами⁵².

8.23. Определение чувствительности бруцелл к АБП.

⁵⁰ МУ 1.3.2569-09.

⁵¹ МР 3.1.0288-22.

⁵² МУК 4.2.3733-21 «Подготовка культур микроорганизмов I – II групп патогенности для анализа методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и формирование баз данных референсных масс-спектров для автоматической идентификации микроорганизмов», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28.12.2021.

Определение антибиотикочувствительности (устойчивости) бруцелл проводится методом диско-диффузии (далее – МДД) на плотных питательных средах. Результаты определения чувствительности выделенных штаммов оцениваются по величине диаметра зоны задержки роста, включая диаметр самого диска.

Более точную оценку активности АБП в отношении бруцелл дает метод серийных разведений (далее – МСР) в жидких и плотных питательных средах, позволяющий определить минимальные подавляющие концентрации (далее – МПК). Жидкие питательные среды используются при проверке отдельных штаммов, плотные – при одновременном изучении нескольких культур бруцелл.

Для определения чувствительности (устойчивости) возбудителя бруцеллеза используются АБП, применяемые для лечения бруцеллеза.

Исследуемые штаммы бруцелл в результате изучения их антибиотикограмм относятся к одной из трех категорий:

1) чувствительный – рост и размножение бактерий подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых дозах и схемах применения. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, обычно эффективно;

2) промежуточный – МПК АБП в отношении штаммов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достигаемых при максимально допустимых режимах дозирования. Лечение инфекции может быть эффективным при применении АБП в повышенных дозах, однако не исключен отбор вариантов возбудителя, характеризующегося более высоким значением МПК, сопровождающегося отсутствием эффекта антибактериальной терапии;

3) устойчивый – штамм не подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. АБП, к которому культура микроорганизмов устойчива, для лечения бруцеллеза не используются.

Основным количественным показателем, характеризующим микробиологическую активность АБП, является значение МПК, которое может быть получено при использовании МСР. Для определения МПК заданные концентрации АБП вносятся в питательную среду. Питательная среда с двукратно увеличивающимися концентрациями АБП засеивается исследуемой культурой, посеы инкубируются и затем оценивается наличие или отсутствие видимого роста.

Для получения антибиотикограммы микроорганизмов МДД используются стандартизированные условия (состав и количество среды, количество засеваемых микробных клеток, температура и сроки инкубирования, стандартные диски). В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК, т.к. существует линейная связь между логарифмом МПК, измеренной при использовании МСР, и диаметром зоны задержки роста при использовании МДД.

Для окончательной характеристики чувствительности/устойчивости культур используется МСР АБП в плотной питательной среде для получения наиболее

достоверных результатов и адекватного выбора средств специальной экстренной профилактики и этиотропной терапии эпидемически опасных инфекционных заболеваний бактериальной природы.

Определение антибиотикочувствительности бруцелл проводится в лабораториях особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, Центрах верификации диагностической деятельности, осуществляющих функцию государственной коллекции Роспотребнадзора, Научно-методических центрах по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней II – IV групп патогенности, Референс-центре по мониторингу за возбудителем бруцеллеза.

8.23.1. Метод серийных разведений в агаре.

Важным этапом МСР является приготовление растворов АБП. Растворы с высокими концентрациями препаратов (100000 – 10000 – 1000 мг/л) являются основными и хранятся при температуре плюс $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение недели. Исключением являются растворы тетрациклинов, сульфаниламидов, которые непосредственно после приготовления используются для внесения в питательные среды в необходимых концентрациях.

Для приготовления основных растворов используются субстанции АБП с известной активностью. При отсутствии субстанций в экстренных случаях допускается использование препаратов в виде мелкодисперсных порошков, инъекционных форм препаратов. АБП взвешивается на электронных лабораторных весах с точностью до 4 знака. Объем растворителя должен соответствовать количеству активного вещества в навеске. Расчет навески АБП для приготовления основного раствора проводится по формуле (2):

$$m_{\text{АБтеор.}} = \frac{C \times V_{\text{теор.}}}{A}, \quad (2)$$

где: $m_{\text{АБтеор.}}$ – расчетная (теоретическая) навеска АПБ, мг;

C – необходимая концентрация АПБ, мкг/мл;

$V_{\text{теор.}}$ – объем растворителя для растворения теоретической навески, мл;

A – активность АПБ (количество активного вещества, содержащегося в субстанции), мкг/мг.

Поскольку взвесить точно расчетное количество порошка практически невозможно, готовится близкая к расчетной навеска, а затем пересчитывается количество необходимого растворителя по формуле (3):

$$V_{\text{практ.}} = \frac{m_{\text{АБпракт.}} \times V_{\text{теор.}} (\text{мл})}{m_{\text{АБтеор.}} (\text{мг})}, \quad (3)$$

где: $V_{\text{практ.}}$ – объем растворителя для растворения практической навески, мл;

$m_{\text{АБпракт.}}$ – полученная навеска АПБ, мг;

$m_{\text{АБтеор.}}$ – расчетная (теоретическая) навеска АПБ, мг;

$V_{\text{теор.}}$ – объем растворителя для растворения теоретической навески, мл.

Различия в растворимости АБП определяет необходимость использования растворителей (солюбилизаторов) в минимальном объеме и необходимого

количества разбавителя (дистиллированная вода). Для растворения тетрациклинов, рифампицина используется димексид, левомицетин растворяется в 95 – 96 % этиловом спирте. Приготовление основных растворов фторхинолонов проводится в половине от необходимого объема дистиллированной воды добавлением по капле 0,1 М КОН до полного растворения препаратов с последующим доведением растворителя до расчетного объема. Растворителем и разбавителем для других АБП служит дистиллированная вода.

Для измерения объемов растворов АБП используются калиброванные дозаторы и пипетки.

Рабочие растворы АБП готовятся на дистиллированной воде в концентрациях, необходимых для внесения в расплавленный и остуженный (до плюс 48 – 50 °С) агар (20 мл на одну чашку Петри) для создания в нем двукратно увеличивающихся концентраций (например, 1 – 2 – 4 – 8 – 16 – 32 мг/л) препарата в соответствии с пограничными значениями МПК для чувствительных и устойчивых штаммов данного вида микроорганизма. В зависимости от необходимого количества чашек Петри с каждой из концентраций АБП используются мерные широкогорлые флаконы на 50 – 100 мл, в которые наливается агар в объеме, например, 20 – 40 мл и добавляется раствор АБП (начиная с наименьшей концентрации), интенсивно размешивается и выливается в чашки Петри, на которых указана концентрация АБП. Контролем служит агаровая чашка без АБП. После застывания агара в чашках и их подсушивания на дне чашки делаются надписи: дата посева, вид возбудителя, номер исследуемых культур.

Испытуемые суспензии культур наносятся на поверхность питательного агара без АБП (контроль) и с АБП (начиная с наименьшей концентрации) каплями легким касанием пипетки (~0,005 мл) или с помощью штамп-репликатора (~0,001 мл). Одновременно допускается изучение до 25 – 50 культур, обязательно включая контрольные референс-штаммы, что обеспечивает достоверность данных антибиотикограммы.

После полного впитывания капель суспензий в агар чашки переворачиваются вверх дном и инкубируются при температуре плюс (37 ± 0,5) °С в течение 24 – 48 ч. Учет результатов проводится после появления роста тестируемых культур на агаре без АБП и при условии, что значения МПК для контрольных штаммов укладываются в рекомендуемый диапазон значений этого показателя для испытуемых АБП. МПК – это концентрация АБП в агаре, которая полностью подавляет рост культуры. По значению МПК исследуемая культура может быть отнесена к чувствительной, промежуточной, устойчивой в соответствии с критериями для изучаемого вида возбудителя.

8.23.2. МДД.

Проверенный на пригодность с использованием эталонных антибиотикочувствительных штаммов питательный агар (приготовленный, расплавленный, остуженный, как указано ранее) разливается в чашки Петри, установленные на строго горизонтальной поверхности, в объеме 20 мл на чашку диаметром 90 мм, 25 мл – на чашку диаметром 100 мм, 60 мл – на чашку диаметром 150 мм. Толщина слоя агара составляет строго (4 ± 0,5) мм, т.к. зоны

ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

Перед использованием свежеприготовленных чашек или после хранения в холодильнике (7 – 10 суток в запаянных полиэтиленовых пакетах) чашки подсушиваются при температуре плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин.

При определении чувствительности культур микроорганизмов с помощью МДД используются только стандартизированные качественные диски производственного изготовления.

Каждая серия дисков с АБП контролируется с помощью референс-штаммов на соответствие заявленным концентрациям на питательной среде, прошедшей контроль качества по биологическим показателям (приложение 7 к настоящему МУ). Диски, дающие диаметры зон ингибиции роста большие, чем допустимый диапазон значений для референс-культуры, выбраковываются, т.к. их использование может привести к отнесению антибиотикорезистентных штаммов к разряду чувствительных.

Проверенные на пригодность серии дисков с АБП хранятся до истечения срока годности в герметичной упаковке при минус 18°C и ниже. Используемые в работе диски хранятся в холодильнике при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Флаконы с дисками (картриджи) извлекаются из холодильника за 1 ч до начала работы и открываются только по достижении ими комнатной температуры, предотвращая тем самым образование конденсата влаги на дисках после открывания картриджа. Не допускается попадание влаги в картриджи.

Бактериальная суспензия необходимой концентрации наносится на агаровую чашку Петри в объеме 0,2 – 0,3 мл и распределяется равномерно по поверхности с помощью стерильного шпателя. Приоткрытые чашки подсушиваются при комнатной температуре в течение 10 – 15 мин, и затем наносятся диски (не более 6 на чашку). Диски наносятся стерильным пинцетом и слегка придавливаются. Расстояние от диска до края чашки и между дисками составляет не менее 15 – 20 мм.

Чашки с посевом без дисков (контроль роста культуры) и с дисками инкубируются вверх дном 24 – 48 ч при температуре, оптимальной для роста изучаемого вида возбудителя плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Параллельно с тестируемыми культурами проводится внутренний контроль качества исследования – определение чувствительности референс-штамма к используемым АБП. Учет результатов проводится только при наличии сливного роста культуры на чашках без дисков и соответствия величин зон ингибиции роста контрольных штаммов значениям, приведенным в таблице 5. Измерение диаметров зон полного подавления видимого роста производится кронциркулем, штангенциркулем, с помощью линейки-лекала (с точностью до 1 мм) на чашках, помещенных кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом 45° .

Появление колоний в зоне задержки роста микроорганизмов может свидетельствовать или о загрязнении культуры посторонней микрофлорой или о гетерогенности тестируемой культуры по признаку чувствительности (устойчивости) к данному АБП. И в одном, и в другом случае исследование повторяется с изучением чувствительности к АБП культур из колоний (если это не загрязнение), выросших в пределах диаметра зоны ингибиции роста. Интерпретация результатов исследования проводится с использованием таблиц 5, 6, в которых

приведены пограничные значения диаметров зон ингибиции роста исследуемого микроорганизма конкретным АБП.

В паспорт каждой выделенной культуры вносятся не только значения МПК, диаметров зон задержки роста, но и интерпретацию результатов исследований: штамм чувствительный, промежуточный или устойчивый.

8.23.3. Контрольные штаммы.

В качестве контрольных для определения антибиотикочувствительности бруцелл предлагается использование штамма *E. coli* ATCC 25922 и вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА (для контроля качества питательных сред, качества дисков, стандартизации определения антибиотикограммы).

Диапазон значений МПК и зон подавления роста для контрольных штаммов представлены в таблицах 5, 6.

Таблица 5

Допустимые колебания значений минимальной подавляющей концентрации антибактериальных препаратов для контрольных штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Brucella abortus* 19ВА

АБП	Диапазон значений МПК, мг/л					
	агар Мюллера-Хинтон 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 ± 0,1)	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 ВА	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 ВА	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. abortus</i> 19 ВА
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
Ципрофлоксацин	0,016 – 0,032	0,5 – 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

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

АБП	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		агар Мюллера-Хинтон 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 ± 0,1)	
		<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
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
Пефлоксацин	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

8.23.4. Питательные среды.

Для оценки чувствительности микроорганизмов к АБП используются питательные среды, зарегистрированные⁵³ и не зарегистрированные, но разрешенные к применению в Российской Федерации⁵⁴ (приложение 6 к настоящим МУ).

Каждая партия питательных сред проверяется с использованием контрольного штамма на ростовые качества (рост при высеве на чашки с агаром – не менее 30 % КОЕ), а также на соответствие рекомендуемого рН с помощью рН-метра (приложение 7 к настоящим МУ).

Выбранная питательная среда промышленного производства готовится в колбах в строгом соответствии с инструкцией изготовителя, затем разливается в градуированные бутылки емкостью 250 мл и автоклавировается.

Остуженный до температуры плюс 48 – 50 °С агар разливается в чашки Петри. Агар разливается по 25 мл в чашки диаметром 100 мм и по 20 мл в чашки диаметром 90 мм с тем, чтобы толщина агара составляла (4 ± 0,5) мм. Чашки оставляются для застывания при комнатной температуре плюс (21 ± 1) °С. Для приготовления чашек с агаром требуется горизонтальная поверхность. Чашки после подсушивания при

⁵³ Пункты 4 и 5 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684; постановление Правительства Российской Федерации от 24.11.2021 № 2026.

⁵⁴ Часть 11.1 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ.

комнатной температуре используются немедленно, однако возможно их приготовление за 24 ч до использования при условии хранения при температуре плюс (4 ± 2) °С. Допускается подсушивание при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение 15 мин перевернутых вверх дном чашек в термостате, предварительно обработанном 70 % этиловым спиртом.

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

8.23.4.1. Агар Мюллера-Хинтон рН $(7,3 \pm 0,2)$.

8.23.4.2. Агар Мюллера-Хинтон рН $(7,3 \pm 0,2)$ с добавлением следующих ростовых компонентов (г/л среды): сульфат магния ($MgSO_4$) – 0,05; сульфат железа ($FeSO_4$) – 0,1; L-цистеин – 0,6; лимоннокислый натрий – 1,2; хлорид калия (KCl) – 2; гидроортофосфат калия (K_2HPO_4) – 4; глюкоза – 15. Стерильные (кипячение 20 мин) ростовые добавки вносятся в растопленный и остуженный агар перед разливанием его в чашки Петри.

8.23.4.3. Эритрит-агар рН $(7,2 \pm 0,1)$.

8.23.4.4. Эритрит-агар с добавлением вышеперечисленных ростовых компонентов рН $(7,2 \pm 0,1)$.

8.23.4.5. Агар LB рН $(7,1 \pm 0,1)$ (г/л): триптон Васто – 10; дрожжевой экстракт Васто – 5; NaCl – 10 с добавлением ростовых добавок, указанных в пункте 8.23.4.2.

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

Перед использованием питательных сред для контроля их качества и используемых дисков проводится определение соответствия значений МПК и диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов микроорганизмов.

8.23.5. АБП.

Для определения чувствительности (устойчивости) возбудителей бруцеллеза используются АБП, применяемые для лечения бруцеллеза.

Для этиотропной терапии бруцеллеза применяются тетрациклины, аминогликозиды, хинолоны, сульфаниламиды, рифамицины. Доказана восприимчивость бруцелл к большому количеству АБП (тетрациклину, доксициклину, гентамицину, стрептомицину, ципрофлоксацину, пефлоксацину, спарфлоксацину, ко-тримоксазолу, рифампицину).

Для МСР в плотной питательной среде готовятся серии двукратно увеличивающихся концентраций АБП, ориентируясь на пограничные значения МПК для чувствительных и устойчивых штаммов бруцелл на рекомендуемых питательных средах.

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

Ципрофлоксацин 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.

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

Тетрациклин 2 – 4 – 8 – 16 мг/л.

С целью экономии времени и средств для проведения исследования применяются штампы-репликаторы, позволяющие проводить изучение 25 – 50 штаммов одновременно с включением контрольного антибиотикочувствительного штамма. При определении антибиотикограмм бактерий МДД используются проверенные коммерческие диски с определенными концентрациями АБП.

8.23.6. Посевная доза, инокуляция, инкубация.

При определении чувствительности с помощью МДД используется суспензия микробных клеток в 0,9 % растворе хлорида натрия, приготовленная из 24 ч агаровой культуры возбудителя.

Суспензия стандартизируется по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00086 (ОСО 42-28-85) (5 МЕ)⁵⁵ (далее – ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (5 МЕ) на 5 ед. ($\sim n \times 10^8$ КОЕ/мл). Суспензия наносится на поверхность агара в объеме 0,3 мл ($n \times 10^7$ КОЕ), равномерно распределяется шпателем и выдерживается до полного впитывания в агар. После этого накладываются диски (не более 6 на чашку диаметром 100 мм). Посевы инкубируются при температуре плюс ($37 \pm 0,5$) °С в течение 24 – 48 ч. Результаты учитываются только в случае появления сливного роста на контрольных чашках (без дисков). Диаметр зон задержки роста бактерий вокруг дисков (включая диаметр самого диска) измеряются с точностью до 1 мм линейкой-лекалом или штангенциркулем.

Для МСР используется суспензия той же концентрации м.к./мл, которая наносится 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 АБП, начиная с чашки с минимальным содержанием АБП. Посевы инкубируются при температуре плюс ($37 \pm 0,5$) °С в течение 24 – 48 ч. Учет результатов проводится при наличии роста культуры на контрольных чашках (без АБП). Чувствительность (устойчивость) культур оценивается по МПК (мг/л).

8.23.7. Критерии оценки чувствительности (устойчивости) возбудителя бруцеллеза к АБП.

Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности микроорганизма к АБП заключается в отнесении его к одной из трех категорий: чувствительный, промежуточный, устойчивый. Интерпретация проводится путем сопоставления величин МПК и (или) диаметров зон ингибиции роста, полученных в результате исследования, с пограничными значениями этих параметров для чувствительных, промежуточных и устойчивых культур возбудителя, адаптированными именно для этого вида микробов на конкретной питательной среде (таблицы 7, 8).

⁵⁵ Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания.

Таблица 7

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

АБП	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
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 8

Диапазон значений минимальной подавляющей концентрации антибактериальных препаратов и диаметров зон подавления роста штаммов *Brucella* spp.

АБП	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			Значение МПК, мг/л		
		агар Мюллера-Хинтон 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 ± 0,1)	агар Мюллера-Хинтон 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 ± 0,1)
Гентамицин	10	20 – 30	20 – 30	20 – 30	1 – 4	1 – 2	2 – 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

АБП	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			Значение МПК, мг/л		
		агар Мюллера-Хинтон 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 ± 0,1)	агар Мюллера-Хинтон 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 ± 0,1)
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
Пефлоксацин	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

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

Алгоритм и сроки исследования биологического материала

8.24. I этап:

- прием, сортировка, регистрация и кодирование проб;
- первичная обработка проб и подготовка их к исследованию;
- ПЦР, изотермическая амплификация: родо- или видоспецифичная с пробами из нативного материала;
- постановка ИФА для выявления специфических антигенов;
- постановка РА Хеддльсона и Райта, ИФА для выявления специфических антител в крови (сыворотки крови) больного;
- постановка клеточных антигенспецифических КАСТ-тестов (в т.ч. аллерготест *in vitro*, «БрИФ-тест»);
- посев биологического материала на плотные и жидкие питательные среды;
- пересев биологического материала с питательной среды жидкой для транспортировки материала и накопления бруцелл;
- инкубация бифазной среды с посевом биологического материала при температуре плюс (37 ± 0,5) °С до 30 суток (35 суток – для выделения L-форм);
- заражение биопробных животных (морские свинки, белые мыши) подкожно в паховую область или внутрибрюшинно – при исследовании крови, спинномозговой жидкости, костного мозга.

8.25. II этап:

- 8 минут от начала исследования – учет результатов реакции Хеддльсона;
- 1 – 2 ч от начала исследования – учет результатов аллерготеста *in vitro*

(цитометрический тест активации базофилов);

- 3 – 5 ч от начала исследования – учет результатов ПЦР, изотермической амплификации;

- 4 – 5 ч от начала исследования – учет результатов ИФА на наличие антител к возбудителю;

- 8 – 10 ч от начала исследования – учет результатов ИФА на наличие антигенов бруцелл (время указано с учетом обеззараживания проб и подготовки (сенсбилизации) иммунологического планшета);

- 19 – 24 ч от начала исследования – учет результатов РА Райта;

- 25 – 30 ч от начала исследования – учет результатов клеточных антигенспецифических КАСТ-тестов (в т.ч. аллерготест *in vitro*, «БрИФ-тест»);

- 48 ч от начала исследования – выдача предварительного положительного ответа на основании положительного результата ПЦР и (или) МАНК, положительных иммунологических реакций (например, РА Хеддльсона и Райта, ИФА, КАСТ-тесты, аллерготеста *in vitro*).

8.26. III этап.

3 – 30 суток от начала исследования:

- учет результатов роста на бифазной среде, плотных и жидких питательных средах;

- при наличии роста культуры (или единичных колоний) на питательных средах производят отбор колоний, сходных по морфологии с колониями возбудителя бруцеллеза;

- приготовление и микроскопия, окрашенных по Граму бактериологических мазков из подозрительных колоний;

- постановка реакции слайд-агглютинации отобранных изолированных колоний с сывороткой бруцеллезной диагностической поливалентной для РА;

- отсев отобранных изолированных колоний на плотные питательные среды для получения чистой культуры;

- ПЦР, МАНК: родо- и видоспецифичная с материалом из подозрительных колоний;

- МФА с материалом из подозрительных колоний;

- MALDI-TOF MS;

- подтверждение предварительного ответа на основании наличия характерного роста на плотных питательных средах, наличия в мазках из колоний мелких грамтрицательных кокковидных палочек, положительной реакции слайд-агглютинации, положительных результатов ПЦР и (или) МАНК, МФА и MALDI-TOF MS с материалом из подозрительных колоний.

8.27. IV этап.

5 – 35 суток от начала исследования:

- пересев выделенных культур на скошенный агар для хранения и последующей работы со штаммами;

- определение наличия диссоциации выделенных культур;

- постановка с культурами возбудителя бруцеллеза, находящимися в стабильной S-форме, тестов межвидовой дифференциации:

- отношение к избыточному содержанию углекислоты в воздухе;

- способность к образованию сероводорода;
- редуцирующая активность в отношении красителей (тионин, основной фуксин);
- агглютинация моноспецифическими бруцеллезными сыворотками (*anti-abortus*, *anti-melitensis*);
- чувствительность к бруцеллезному бактериофагу Тб;
- выявление видо- и биоварспецифичных генетических мишеней с помощью молекулярно-генетических методов;
 - определение чувствительности к АБП дискодиффузионным методом;
 - вскрытие биопробных животных, посев органов и крови на плотные питательные среды:
 - а) белых мышей через 20 – 25 суток, посев на питательные среды патологического материала: лимфатические узлы (паховый, аксиллярный, парааортальный, подчелюстной), кусочки органов (селезенки и печени);
 - б) морских свинок через 30 – 35 суток, посев на питательные среды патологического материала: лимфатические узлы (регионарные в месте введения исследуемого материала, паховый, подчелюстной, шейный, парааортальный), кусочки органов (селезенка, печень, костный мозг), кровь;
 - приготовление мазков-отпечатков из органов биопробных животных, постановка МФА;
 - постановка ПЦР (суспензия из гомогената органов, лимфатических узлов, костный мозг, сыворотка крови);
 - учет результатов МФА, ПЦР, РА и слайд-агглютинации.

8.28. V этап.

10 – 40 суток от начала исследования:

- учет результатов дифференциации культур для определения вида и биовара возбудителя бруцеллеза;
- учет посевов материала от биопробных животных;
- выдача окончательного положительного ответа по результатам бактериологического исследования на основании выделения чистой культуры бруцелл из посевов нативного материала или от биопробных животных, или по результатам иммунологического и молекулярно-биологического исследований, масс-спектрометрического анализа, на основании положительных результатов иммунологических и индикационных тестов.

36 – 60 суток от начала исследования:

- завершение исследования и выдача окончательного отрицательного ответа проводятся на основании отсутствия специфического роста на питательных средах, отрицательных результатов молекулярно-биологических и иммунологических реакций на всех этапах исследования, отсутствия специфического роста в посевах от биопробных животных.

IX. Молекулярно-генетический мониторинг штаммов бруцелл

9.1. Геномный мониторинг (молекулярно-генетический анализ) выделенных штаммов *Brucella* spp. относится к дополнительным методам и осуществляется в

Центрах индикации, Референс-центре по мониторингу за бруцеллезом, Центрах верификации, научно-исследовательских учреждениях заинтересованных ведомств, имеющих лицензию и (или) санитарно-эпидемиологическое заключение на соответствие санитарно-эпидемиологическим требованиям условий проведения работ с микроорганизмами I–II групп патогенности⁵⁶ и проводится для решения следующих задач:

- обследования эпидемического очага, определения причин возникновения заболевания, верификации этиологического агента (дифференциации местных (заносных) случаев заболевания);

- изучения генетического разнообразия штаммов патогена, выделенных на различных территориях и в разное время;

- генетической характеристики стабильности популяции патогена.

9.2. Материал для молекулярно-генетического анализа.

9.2.1. В качестве материала для молекулярно-генетической характеристики вариантов *Brucella* spp. используются только штаммы *Brucella* spp. изолированные из образцов биологического материала от больных бруцеллезом, а также образцов биоматериала от животных и объектов окружающей среды, отобранных при эпидемиологическом расследовании вспышек бруцеллеза.

Выборка штаммов не формируется. Для проведения углубленного молекулярно-генетического анализа все культуры бруцелл, выделенные лабораториями особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, ПЧУ, Центрами верификации, лабораториями учреждений других ведомств, осуществляющих бактериологические исследования на бруцеллез (по согласованию), передаются в Референс-центр по мониторингу за бруцеллезом в установленном порядке⁵⁷.

Выделенные культуры *Brucella* spp. направляются в Референс-центр по мониторингу за бруцеллезом (по факту выделения).

9.2.2. Приоритетные критерии для забора материала от людей с целью выделения культур бруцелл:

- лихорадящие больные бруцеллезом до лечения АБП;

- длительно лихорадящие больные бруцеллезом без положительной динамики после лечения;

- заболевшие бруцеллезом с положительными результатами выявления ДНК *Brucella* spp. методом ПЦР, МАНК.

9.2.3. Приоритетные критерии для забора материала от животных с целью выделения культур бруцелл:

- больные бруцеллезом животные с клиническими проявлениями: например, аборт, мертворождения, задержка последа;

- абортированные плоды и мертворожденные животные от больных бруцеллезом животных;

- больные бруцеллезом животные с высокими титрами специфических антител к возбудителю бруцеллеза, неиммунизированные противобруцеллезными вакцинами.

⁵⁶ Часть 1 статьи 12 Федерального закона от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности»; пункты 134, 135 СанПиН 3.3686-21.

⁵⁷ Приложение 10 приказа Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

9.3. Алгоритм дифференциации генетических вариантов (типов) штаммов бруцелл.

Образцом для проведения генетической дифференциации вариантов возбудителя бруцеллеза является ДНК, выделенная из штаммов *Brucella* spp.

Для проведения молекулярно-биологических исследований штаммов бруцелл используются диагностические препараты и тест-системы, разрешенные к применению на территории Российской Федерации (приложение 6 к настоящим МУ), а также алгоритм последовательного генетического анализа методами с возрастающей разрешающей способностью⁵⁸:

1 этап – определение видовой и биоварной принадлежности бруцелл с использованием ПЦР.

Для проведения исследований используется один из следующих методов: например, определение видов бруцелл по протоколу Bruce-Ladder, AMOS-DEL, БРУ-ДИФ или с помощью препарата «Бру-Диф-РГФ», определение видов и биоваров бруцелл по протоколу Suis-Ladder с дополнениями или Suis-ДИФ, определение видов и биоваров бруцелл на основании рестрикции фрагментов *otr25*, *otr2a*, *otr2b* генов.

Выполняется серия моно- или мультиплексных ПЦР с праймерами к исследуемым локусам. Учет результатов проводится по наличию или отсутствию специфических полос амплифицированной ДНК и определению размеров ампликонов методом электрофореза в 2 – 3 % агарозном геле с этидия бромидом. При применении метода ПЦР в режиме «реального времени» результаты учитываются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

2 этап – выявление вставок-делеций в 10 INDEL-локусах путем определения размера ампликона после ПЦР. На данном этапе выявляются индивидуальные различия между штаммами.

Амплификация проводится с праймерами к каждому из десяти INDEL-локусов (RS05410, RS06765, RS11140, RS12095, RS12365, RS14755, RS16525, RS05465, RS14470 и RS16540), имеющих по две дискриминируемые аллели. Учет результатов осуществляется методом электрофоретической детекции в 2 % агарозном геле с этидия бромидом, размер полученного фрагмента определяется с помощью маркера молекулярного веса. Для каждого исследуемого штамма устанавливается уникальный INDEL-генотип.

3 этап – установление принадлежности штамма к одному из мультилокусных анализов варибельного числа tandemных повторов генотипов (далее – MLVA-генотипов), основанное на определении размеров аллелей нескольких VNTR-локусов I и II хромосомы бруцелл, сочетание которых определяет MLVA-генотип. Используется для углубленной идентификации, генетической паспортизации и определения клональности происхождения штаммов возбудителя бруцеллеза.

С целью видовой идентификации применяется схема MLVA-8, включающая минисателлитные локусы Bruce 06, Bruce 08, Bruce 11, Bruce 12, Bruce 42, Bruce 43, Bruce 45, Bruce 55. Для большей достоверности филогенетического и эпидемиологического анализа клональности происхождения штаммов применяется схема MLVA-16, в которой к вышеописанным добавлены 8 микросателлитных

⁵⁸ МР 3.1.0288-22.

локусов Bruce 04, Bruce 07, Bruce 09, Bruce 16, Bruce 18, Bruce 19, Bruce 21, Bruce 30.

Проводится серия моно- или мультиплексных ПЦР с праймерами к исследуемым локусам. Учет результатов MLVA осуществляется методами гель-электрофореза, микрокапиллярного электрофореза и секвенирования по Сенгеру.

Полученные данные сравниваются с существующими базами данных по MLVA-генотипам штаммов *Brucella* spp.

Определение степени генетического родства между изолятами проводится с помощью филогенетического анализа, который отображается графически в виде дендрограммы (филогенетического дерева).

Изоляты *B. abortus* в Российской Федерации характеризуются циркуляцией штаммов, MLVA-профиль которых входит в кластер *abortus* C и имеет идентичный профиль со штаммами, выделенными в Казахстане, Монголии и Китае (до 90 %). Менее 10 % российских изолятов имеют общие генотипы со штаммами из Европы (Великобритании, Португалии), Африки (Египта, Сомали, Южно-Африканской республики (ЮАР), Эфиопии, Мавритании) и Америки (Кубы, Бразилии, Коста-Рики).

Изоляты *B. melitensis*, выделенные в Российской Федерации по своему MLVA-профилю входят в Средиземноморский восточный кластер, в котором наибольшее родство отмечено с MLVA-8-генотипами 45 и 42. Идентичные MLVA-16-генотипы найдены в Казахстане, Турции, Китае, Алжире.

4 этап – проведение секвенирования нового поколения (англ. next generation sequencing, NGS) и анализ полученных данных.

Максимальную разрешающую способность для генетического типирования бруцелл демонстрирует выявление стабильных одиночных нуклеотидных полиморфизмов при анализе полногеномных последовательностей. Методика заключается в оценке вариабельности полиморфизмов в локусах с высокой степенью полиморфизма, на основании которой определяются филогенетические взаимосвязи изолятов бруцелл.

Коровый геном штаммов бруцелл получается путем множественного выравнивания изучаемых полногеномных последовательностей против референсного генома штамма соответствующего вида рода *Brucella*.

Используя биоинформационный алгоритм, содержащий комплекс программ, проводится поиск единичных нуклеотидных полиморфизмов в полученной матрице выравнивания и для всех обнаруженных определяются координаты расположения в геноме в сравнении с референсным.

По полученному полиморфизму единичных нуклеотидов (SNP-профилю) строится дендрограмма и проводится филогенетический анализ, который дает точное представление о положении исследуемого штамма в глобальной популяции *Brucella* spp. и ближайших родственных штаммах.

При проведении геномного мониторинга штаммов *Brucella* spp. учитывается, что штаммы *B. melitensis*, циркулирующие на территории Российской Федерации, принадлежат к генотипу II, который имеет широкое географическое распространение на территории Евразии. При этом в регионах Сибири преобладает подгенотип IIIh, а на европейской территории страны – IIIi.

Штаммы *B. abortus*, выделенные в Российской Федерации, принадлежат к двум генетическим линиям глобальной популяции вида: C, широко распространенной в странах Европы и Восточной Азии (субгенотипы C1, C2 и C4),

и D, к которой относятся большинство известных вакцинных штаммов *B. abortus* (субгенотип D4).

9.4. Порядок и периодичность подготовки отчетов о результатах молекулярно-генетического анализа штаммов бруцелл.

Референс-центром по мониторингу за бруцеллезом в течение 25 – 30 календарных дней после поступления (выделения) культур бруцелл проводится окончательная идентификация и типирование штаммов бруцелл с использованием молекулярно-биологических методов⁵⁹.

Данные генетического типирования штаммов бруцелл Референс-центром передаются в установленном порядке⁶⁰ для включения в российские электронные платформы агрегирования результатов расшифровок генома возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний.

⁵⁹ Пункт 1.1 МР 3.1.0288-22.

⁶⁰ Приложение 10 приказа Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

Методика проведения эпидемиологического районирования субъекта Российской Федерации по показателю эпидемической опасности

1. Для осуществления эпидемиологического районирования по ПЭО необходимо использовать данные государственной статистической отчетности «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (форма № 1) в субъекте Российской Федерации за определенный период (не менее трех лет) с учетом частоты встречаемости заболевших бруцеллезом людей в разрезе административных районов субъекта Российской Федерации, а также индекса эпизоотичности. Эпидемиологическое районирование позволяет сгруппировать административные территории субъекта Российской Федерации по степени эпидемической опасности и составить шкалу картограмм, позволяющих визуализировать эпидемическую ситуацию на карте.

Эпидемиологическое районирование проводят с использованием картографического метода, основанного на применении географических карт, а также статистических методов, необходимых для обработки данных.

2. Для каждого административного района (города) в субъекте Российской Федерации величина ПЭО (Z) рассчитывается по формуле (4):

$$Z = A \times \text{ИЭ}, \quad (4)$$

где: Z – ПЭО;

A – интегрированный показатель риска инфицирования бруцеллезом (далее – РИБ);

ИЭ – индекс эпизоотичности.

Показатель степени РИБ рассчитывается по формуле (5):

$$A = \frac{X_{\text{ип}} \times t}{T}, \quad (5)$$

где: A – интегрированный показатель риска инфицирования;

$X_{\text{ип}}$ – средний интенсивный показатель заболеваемости (на 100 тыс. населения);

t – число лет регистрации заболевания на конкретной территории;

T – продолжительность изучаемого периода (число лет наблюдения).

Расчет среднего интенсивного показателя заболеваемости ($X_{\text{ип}}$) людей бруцеллезом проводится по формуле (6):

$$X_{\text{ип}} = \frac{\sum X}{T}, \quad (6)$$

где: $X_{\text{ип}}$ – средний интенсивный показатель заболеваемости (на 100 тыс. населения);

X – заболеваемость людей в районе (например, в городе краевого,

областного подчинения) по годам (на 100 тыс. населения);

T – продолжительность изучаемого периода (число лет наблюдения).

Индекс эпизоотичности рассчитывается по формуле (7):

$$ИЭ = \frac{tж}{Tж}, \quad (7)$$

где: ИЭ – индекс эпизоотичности;

$tж$ – число лет регистрации заболеваемости животных на конкретной территории;

$Tж$ – продолжительность изучаемого периода (число лет наблюдения).

При районировании территории субъекта Российской Федерации по уровню эпидемической опасности используется критерий Мартина, в котором среднее квадратическое отклонение (σ) характеризует степень рассеивания вариант распределения ПЭО (Z) на различных административных территориях субъекта и рассчитывается по формуле (8):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(Z - Z_{ср})^2}{n - 1}}, \quad (8)$$

где: σ – среднее квадратическое отклонение;

Z – ПЭО по отдельным районам (например, городам краевого, областного подчинения);

$Z_{ср}$ – усредненный ПЭО;

n – количество административных районов (например, городов краевого, областного подчинения).

Расчет усредненного ПЭО ($Z_{ср}$) рассчитывается по формуле (9):

$$Z_{ср} = \frac{\sum z}{n}, \quad (9)$$

где: $Z_{ср}$ – усредненный интегрированный ПЭО;

z – ПЭО по отдельным районам (например, городам краевого, областного подчинения);

n – количество административных образований (районов и городов краевого, областного подчинения).

3. Среднее квадратическое отклонение (σ) рассматривается как критерий группировки по уровню эпидемической опасности (далее – ЭО). Варианты изучаемого признака ЭО, отклоняющегося от средней величины в пределах $Z \pm 0,5\sigma$, считают относящимися к средней величине (средний уровень ЭО), тогда как лежащие за пределами $Z \pm 0,5\sigma$, но не более чем $Z \pm 1\sigma$, (ЭО – 68,2 % от всех случаев) отличаются от средней величины умеренно (высокий и низкий уровни РИБ), а за пределами $Z \pm 1\sigma$ – резко отличаются от средних величин (очень высокий и очень низкий уровни ЭО).

Расчеты, группировка первичных данных, вычисление средних величин выполняются с использованием персонального компьютера с пакетом программ для работы с электронными таблицами.

Картограмма осуществляется с помощью графических редакторов, с

применением ГИС.

4. Эпидемиологическое районирование (ранжирование) проводится для территорий, на которых регистрировались случаи заболевания бруцеллезом людей и (или) животных за последние 10 лет.

В качестве предикторов (предвестников) выбираются следующие показатели:

- 1) площадь административной территории;
- 2) абсолютное количество восприимчивого поголовья сельскохозяйственных животных;
- 3) плотность населения на анализируемой территории;
- 4) факт наличия заболевания людей (в случае регистрации – вычисляется средний интенсивный показатель заболеваемости на 100 тыс. населения за последние 10 лет);
- 5) регистрация больных животных.

Количественная обработка предикторов осуществляется в таблицах программы MS Excel с применением формул «суммирование» и «средние значения».

Затем для каждой территории вычисляется «событие», где вероятность достоверного события равна единице, вероятность невозможного события равна нулю, вероятность случайного события есть число между нулем и единицей.

С учетом коэффициента «события» производится расчет прогноза предполагаемого числа больных людей и РИБ.

Ранжирование территории по риску заражения возбудителем бруцеллеза (на предстоящий эпидемический сезон) проводится по следующему алгоритму:

1. Подготовка первичных данных для ранжирования (поиск предвестников).
2. Определение информативности факторов.
3. Составление оптимизированного перечня факторов для последующего составления прогноза.
4. Вычисление прогностических коэффициентов предикторов.
5. Прогнозирование появления (отсутствия) больных бруцеллезом по каждому административному району (расчет вероятности).
6. Расчет предполагаемого числа больных относительно порогового уровня (для административных районов, на территории которых ожидается возникновение случаев заболевания бруцеллезом).
7. Представление результатов ранжирования (в табличном виде).
8. Функционально. Графическое отображение результатов ранжирования на физической или административной карте территории с применением ГИС.

Методика риск-ориентированного районирования субъекта Российской Федерации на уровне его муниципальных районов

5. Риск-ориентированное районирование субъекта Российской Федерации на уровне его муниципальных районов с целью определения территорий высокого риска возникновения эпидемических осложнений по бруцеллезу проводится на основе систематизации эпидемиологических рисков – их стандартизации по критериям с количественной оценкой (таблица 9). В основу методики

количественной оценки эпидемиологических рисков по бруцеллезу положены следующие принципы:

- 1) количественная оценка рисков (в баллах) по десяти стандартным критериям;
- 2) универсальность применения в любом субъекте Российской Федерации;
- 3) наличие необходимо-достаточного минимума исходных данных у специалистов территориальных органов (учреждений) Роспотребнадзора;
- 4) отсутствие необходимости в сложных расчетах и дополнительном программном обеспечении, что делает возможным успешное применение методики сотрудниками территориальных органов (учреждений) Роспотребнадзора любого уровня.

В качестве исходных данных используются следующие сведения, собираемые за 10 последних лет: заболеваемость бруцеллезом людей в динамике; ситуация по бруцеллезу среди сельскохозяйственных животных; наличие и расположение по муниципальным районам неблагополучных по бруцеллезу хозяйств; выделение (бактериологическим методом) бруцелл *B. melitensis* и других видов, их обнаружение другими лабораторными методами. Необходимо установить наличие условий, способствующих ухудшению эпизоотологической ситуации по бруцеллезу: неполный учет и маркировка скота, несанкционированный ввоз сельскохозяйственных животных из неблагополучных по бруцеллезу субъектов Российской Федерации, несанкционированное перемещение скота без надлежащего ветеринарного контроля, несовершенный механизм компенсации физическим лицам и животноводческим хозяйствам экономического ущерба от вынужденной ликвидации скота, положительно реагирующего на бруцеллез.

Таблица 9

Критерии оценки эпидемиологического риска по бруцеллезу в субъекте Российской Федерации по муниципальным районам

Критерий		Оценка в баллах
K1	Наличие документированных неблагополучных по бруцеллезу хозяйств	3 балла
K2	Местные случаи впервые выявленного бруцеллеза среди людей	3 балла
K3	Случаи обнаружения <i>B. melitensis</i> у сельскохозяйственных животных: лабораторно подтвержденные любым из методов: бактериологическим, ПЦР (тест-системы с видоспецифичными праймерами, дающие возможность дифференциации бруцелл до вида), секвенирование, масс-спектрометрия	3 балла
K4	Случаи обнаружения <i>B. melitensis</i> у собак, кошек, других животных, кроме сельскохозяйственных: лабораторно подтвержденные любым из методов: бактериологическим, ПЦР (тест-системы с видоспецифичными праймерами, дающие возможность дифференциации бруцелл до вида), секвенирование, масс-спектрометрия	3 балла
K5	Случаи обнаружения других видов бруцелл у животных, включая сельскохозяйственных животных и домашних: лабораторно подтвержденные любым из методов: бактериологическим, ПЦР, секвенирование, масс-спектрометрия.	2 балла

	Обнаружение только серологическими методами – ноль баллов	
K6	Факт завоза больных или положительно реагирующих на бруцеллез сельскохозяйственных животных	2 балла
K7	Факт миграции сельскохозяйственных животных, в т.ч. пересечение госграницы и выпас скота на приграничных территориях с другими государствами, неблагополучных по бруцеллезу	1 балл
K8	Факт наличия незарегистрированного скота в частных подворьях и фермах	1 балл
K9	Отсутствие ветеринарной лаборатории, имеющей возможность выявлять больных животных комплексом серологических реакций (РА, РСК, РИД) и (или) ПЦР	1 балл
K10	Проведение вакцинации сельскохозяйственных животных против бруцеллеза	1 балл

Сумма баллов для каждого муниципального района (Σ) позволяет отнести его к территориям низкого (0 – 2 балла), среднего (3 – 5 баллов) или высокого (6 и более баллов) эпидемиологического риска по бруцеллезу.

Путем расчета балльного показателя эпидемиологического риска для каждого муниципалитета проводится районирование субъекта Российской Федерации с выявлением муниципальных образований с высоким риском развития эпидемических осложнений по бруцеллезу. Оформление результатов районирования может быть представлено в форме таблицы – матрицы рисков (таблица 10) – или визуализировано на карте.

Таблица 10

Матрица рисков по бруцеллезу для муниципальных образований

№	Муниципальный район	Критерии эпидемиологического риска и оценка в баллах										Σ	Риск
		K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10		
	Административный центр	3	3	-	-	2	2	-	1	-	-	11	высокий
1	А район	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	низкий
2	Б район	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	низкий
3	В район	3	-	-	-	-	2	-	1	-	-	6	высокий
4	Г район	3	3	-	-	2	2	1	1	-	-	12	высокий
5	Д район	3	-	-	-	-	2	1	1	-	-	7	высокий
6	Е район	3	-	-	-	-	-	1	1	-	-	5	средний
7	Ж район	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	4	средний
8	З район	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	низкий
9	И район	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	низкий
10	К район	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	низкий

Алгоритм исследования материала в лабораториях разного уровня при подозрении на бруцеллез

Вид исследуемого материала	Территориальный		Региональный			Федеральный	
	Медицинские организации	ЦГиЭ филиалы	ЦГиЭ в субъекте Российской Федерации в ФО (Опорные базы Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, лаборатории ООИ)	ПЧУ (Центры индикации возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности)	ПЧУ (Научно-методические центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II – IV групп патогенности)	Референс-центр по мониторингу за возбудителем бруцеллеза (Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора)	Центры верификации
Материал от больного (подозрительного на заболевание бруцеллезом)	Взятие материала. Постановка ПЦР, изотермической амплификации, иммунологических, аллергологических (проба Бюрне) и клеточных антигенспецифических КАСТ-тестов (в т.ч. аллерготест <i>in vitro</i> , БриФ-тест)	Исследование материала всеми методами. Филиалы центров гигиены и эпидемиологии выполняют исследования биологического материала иммунологическими методами и ПЦР, изотермической амплификации			Консультативно-методическая помощь	Исследование материала всеми методами. Идентификация культур, молекулярно-генетическое типирование, секвенирование. Консультативно-методическая помощь.	Исследование материала всеми методами. Подтверждение результатов исследования проведенного в Центрах индикации возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности
Обследование лиц, подлежащих вакцинации против бруцеллеза и диспансеризации	Взятие материала. Постановка ПЦР, изотермической амплификации, иммунологических, аллергологических (проба Бюрне) и клеточных антигенспецифических КАСТ-тестов (в т.ч. аллерготест <i>in vitro</i> , БриФ-тест)	Исследование материала ПЦР, изотермической амплификации, иммунологическими методами, клеточными антигенспецифическими КАСТ-тестами (в т.ч. аллерготест <i>in vitro</i> , БриФ-тест)			При необходимости (по эпидемическим показаниям) исследование материала всеми методами. Консультативно-методическая помощь		

Вид исследуемого материала	Территориальный		Региональный			Федеральный	
	Медицинские организации	ЦГиЭ филиалы	ЦГиЭ в субъекте Российской Федерации в ФО (Опорные базы Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, лаборатории ООИ)	ПЧУ (Центры индикации возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности)	ПЧУ (Научно-методические центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II – IV групп патогенности)	Референс-центр по мониторингу за возбудителем бруцеллеза (Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора)	Центры верификации
Объекты окружающей среды, пищевые продукты и сырье животного происхождения (мясо, молоко и другие пищевые продукты, сырье)	Материал не забирают и не исследуют	По эпидпоказаниям при необходимости из эпидемического очага осуществляют отбор, упаковку, передачу проб в лаборатории противочумных учреждений для исследования материала всеми методами. Отбор, упаковку и передачу проб материал от животных осуществляют специалисты органов исполнительной власти в области ветеринарии и подведомственных ему организаций	При необходимости (по эпидемическим показаниям) исследование материала всеми методами		Исследование материала всеми методами, подтверждение и идентификация культур бруцелл. Консультативно-методическая помощь		

Приложение 3
к МУ 3.1/4.2. 4145-25
(рекомендуемый образец)

Направление на исследование биологического материала

1. Адрес и наименование учреждения, куда направляется проба (пробы)
2. Фамилия, имя, отчество больного
Пол _____, возраст _____, профессия, место работы _____
Место жительства _____
Дата заболевания _____
Дата обращения за медицинской помощью _____
Дата госпитализации _____
Диагноз предварительный _____
3. Особенности эпидемиологического анамнеза _____
4. Проводилась ли антибактериальная терапия до взятия материала:
- дата проведения _____
- какие использовались препараты _____
- какая доза _____
5. Вид материала, взятого для бактериологического исследования _____
6. Дата и час забора материала _____
7. Условия транспортировки _____
8. Цель исследования _____
9. Наименование учреждения, должность, фамилия и инициалы лица, направляющего пробу (пробы)
(подпись)
10. Время доставки пробы (проб) (час, минуты, дата, месяц, год) _____
11. Кто принял пробы _____
(Ф.И.О., занимаемая должность)
12. Адрес, по которому следует сообщить результаты бактериологического исследования _____

Приложение 4
к МУ 3.1/4.2. 4145-25
(рекомендуемый образец)

Направление на исследование продовольственного сырья и продуктов животного происхождения, материала из объектов окружающей среды

1. Адрес и наименование учреждения, куда направляется проба (пробы)
2. Место отбора проб
3. Количество проб в общей упаковке
4. Наименование материала животного происхождения
5. Дата и час забора материала животного происхождения
6. Наименование материала и объекта окружающей среды, из которого взята проба
7. Дата и час забора материала из объектов окружающей среды
8. Условия транспортировки
9. Цель исследования
10. Наименование учреждения, должность, фамилия и инициалы лица, направляющего пробу (пробы)
(подпись)
11. Время доставки пробы (проб) (час, минуты, дата, месяц, год)
12. Кто принял пробы (Ф.И.О., занимаемая должность)
13. Адрес, по которому следует сообщить результаты бактериологического исследования

Рецепты питательных сред

1. Печеночные среды

1.1. Свежая говяжья печень освобождается от жира и пленок и пропускается через мясорубку. Фарш заливается водопроводной водой (на 1 кг фарша – 1 л воды) и настаивается при температуре плюс 25 – 30 °С в течение 3 ч или при температуре плюс 4 – 10 °С в течение 6 – 10 ч. Затем смесь перемешивается и автоклавировается текучим паром в течение 20 мин. Можно варить и в котле, постоянно помешивая в течение одного часа после закипания. В процессе варки снимается накипь. После варки настой фильтруется через тонкий ватно-марлевый фильтр.

Приготовленный таким образом печеночный настой разливается по бутылкам и стерилизуется в течение 20 мин при температуре плюс 115 – 120 °С.

1.2. Печеночный бульон.

К 500 мл печеночного настоя добавляется 500 мл водопроводной воды, 10,0 г сухого пептона и 5,0 г химически чистого хлористого натрия. Смесь кипятится, устанавливается рН 7,4, фильтруется через бумажный фильтр и стерилизуется 20 мин при температуре плюс 115 – 120 °С, рН бульона после стерилизации должен быть 7,1 – 7,2.

1.3. Печеночный агар.

К 500 мл печеночного настоя добавляется 500 мл водопроводной воды, 10,0 г сухого пептона, 5,0 г химически чистого хлористого натрия и 25,0 г агара, промытого водопроводной водой и хорошо отжатого, рН среды устанавливается 7,8. Затем среда варится до полного расплавления агара и разливается в необходимую посуду (по 1 – 2 л).

В дальнейшем среда автоклавировается при температуре плюс 115 °С в течение 20 мин, отстаивается, фильтруется через ватно-марлевый фильтр, предварительно смоченный теплой водой и вновь устанавливается рН 7,1 – 7,2.

Среда разливается в необходимую по емкости посуду и стерилизуется при температуре плюс 115 °С в течение 20 мин.

2. Мясопептонные среды

2.1. Мясная вода.

Свежее говяжье мясо освобождается от костей, жира и сухожилий и пропускается через мясорубку. Фарш заливается водопроводной водой из расчета 500,0 г фарша на 1 л воды и выдерживается в течение 15 ч в прохладном месте.

В дальнейшем настой варится 30 – 40 мин, фильтруется через ватно-марлевый фильтр.

Полученная мясная вода стерилизуется при температуре плюс 121 °С в

течение 20 мин.

2.2. Мясопептонный бульон.

На 2 л мясной воды добавляется 10,0 г сухого пептона и 5,0 г химически чистого хлористого натрия. Смесь подщелачивается до pH 7,4 и кипятится в течение 20 мин. После этого фильтруется через бумажный фильтр, разливается в необходимую посуду и стерилизуется при температуре плюс 121 °С в течение 20 мин, pH среды после стерилизации – 7,2.

2.3. Мясопептонный агар.

К 1 л мясной воды добавляется 10,0 г сухого пептона, 5,0 г химически чистого хлористого натрия и 25,0 г агар-агара. Смесь подщелачивается до pH 7,8, варится до полного расплавления агара. Затем автоклавируется при температуре плюс 120 °С в течение 30 мин для стерилизации и расплавления агара. После стерилизации среда отстаивается, фильтруется через ватно-марлевый фильтр, предварительно смоченный теплой водой, корректируется pH среды до 7,2, разливается в необходимую посуду и вновь стерилизуется 20 – 30 мин при температуре плюс 110 °С.

3. Сыворотно-декстрозный агар

3.1. Основой среды является питательный агар, который готовится следующим образом: к 835 мл дистиллированной воды добавляется 10,0 г агара микробиологического, 10,0 г пептона, 5,0 г химически чистого хлористого натрия и 165 мл мясной воды. Все ингредиенты помещаются в сосуд, устанавливается pH 7,8 и кипятится 2 – 3 мин до полного расплавления агара. Затем сосуд ставится в автоклав и подвергается одномоментному давлению 1 атмосферы при температуре плюс 121 °С в течение 20 мин для выпадения в осадок фосфатов. Среда фильтруется через ватно-марлевый фильтр, устанавливается pH 7,4, а затем разливается в мерную посуду и стерилизуется при температуре плюс 121 °С в течение 20 мин. Заготовленный таким образом питательный агар по мере надобности расплавляется в водяной бане или автоклаве и охлаждается до температуры плюс 50 °С. Затем к нему добавляется нормальная инактивированная (при температуре плюс 56 °С 30 мин) лошадиная или бычья сыворотка и раствор декстрозы, предварительно простерилизованный путем фильтрации через фильтр Зейтца так, чтобы окончательная концентрация сыворотки была 5 % и декстрозы – 1 %.

4. Кровяной агар

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

Для приготовления кровяного агара к основной среде добавляется 5 % крови бараньей дефибрированной.

5. Картофельная среда

5.1. Крупный отборный картофель моется и очищается. На 1 кг картофеля добавляется 1 л дистиллированной воды и варится до готовности картофеля. Затем жидкость сливается, замеряется объем, доливается дистиллированная вода до 1 л и фильтруется через двойной марлевый фильтр. После этого добавляются следующие ингредиенты: пептон – 10,0 г, химически чистый хлористый натрий – 5,0 г, глицерин – 30 мл и агар микробиологический – 10,0 г. Все помещается в кастрюлю и варится до полного расплавления агара, устанавливается рН 7,2 10 % раствором едкого натра.

Затем проводится стерилизация в автоклаве при температуре плюс 121 °С в течение 20 мин, фильтруется, добавляется 10,0 г глюкозы и вновь стерилизуется при температуре плюс 121 °С 20 мин. После автоклавирования к среде добавляется 10 % нормальной инактивированной стерильной лошадиной или овечьей сыворотки.

6. Среда «Д»

6.1. Бульон «Д».

К 100 мл холодной дистиллированной воды добавляется 2,5 г порошка стандартного бульона «Д», прогревается и тщательно размешивается до полного его растворения. Затем бульон фильтруется, разливается в необходимую посуду и стерилизуется при температуре плюс 120 °С в течение 20 мин (рН среды 7,1 – 7,2).

6.2. Агар «Д».

К 100 мл холодной дистиллированной воды добавляется 5,0 г порошка стандартного агара «Д», прогревается при помешивании до полного растворения порошка, не допуская его подгорания, затем фильтруется, разливается в необходимую посуду и стерилизуется при температуре плюс 120 °С в течение 20 мин (рН среды 7,2).

7. Среда-заменитель «Альбими»-агара

7.1. К 1 л дистиллированной воды добавляется 20,0 г сухого пептона, 20 мл дрожжевой воды, 5,0 г химически чистого хлористого натрия и 20,0 г агара-агара, устанавливается рН 7,3.

Затем все растворяется в автоклаве под текучим паром и фильтруется через ватно-марлевый фильтр (предварительно смоченный теплой водой и хорошо отжатый).

Затем добавляется 1,0 г глюкозы и 0,1 г бисульфита натрия, устанавливается рН 7,2 – 7,3. Разливается в необходимую посуду и стерилизуется 40 мин под текучим паром, а потом при температуре плюс 110 °С в течение 20 мин.

7.2. Дрожжевая вода.

К 1 л дистиллированной воды добавляется 1 кг хлебных дрожжей и

кипятится до растворения. Затем фильтруется через полотняный фильтр. Хранится под хлороформом в темноте не более двух недель.

8. Среда для культивирования *B. ovis*

8.1. Основной среды является печеночный или мясопептонный агар, к которому добавляют 1 % декстрозы (глюкозы) и 2 % глицерина. Среда разливается в необходимую посуду и стерилизуется при температуре плюс 116 °С в течение 15 мин. Перед посевом к расплавленной и остуженной до 50 °С среде добавляется 20 % нормальной сыворотки крупного рогатого скота или 10 % аминокептида и 10 % сыворотки.

9. Среда для выделения и культивирования L-форм бруцелл

9.1. Основной среды является питательный агар, который готовится с использованием печеночного настоя.

Для приготовления агара (из расчета на 1 л среды) к 500 мл печеночного настоя добавляется 500 мл водопроводной воды и 10,0 г сухого пептона, 5,0 г химически чистого хлористого натрия, 30,0 г микробиологического агара. Устанавливается рН 7,8.

Смесь кипятится до полного расплавления агара, разливается в бутылки и стерилизуется при температуре плюс 121 °С в течение 20 мин, отстаивается, фильтруется через ватно-марлевый фильтр, смоченный теплой водой. После фильтрации добавляется 10 г глицерина и 10 г глюкозы, устанавливается рН 7,2 и стерилизуется при температуре плюс 121 °С в течение 20 мин.

Заготовленный агар перед посевом крови расплавляется в водяной бане, охлаждается до температуры плюс 50 °С и добавляется 25 % нормальной лошадиной сыворотки (предварительно простерилизованной через фильтр Зейтца), 25 % печеночного агара, содержащего 50 – 100 ЕД пенициллина на 1 мл среды.

Посев крови в объеме не менее 5 мл, пунктатов костного мозга и лимфоузлов проводится на питательную среду сразу же после застывания агара.

10. Среда для выделения L-форм бруцелл на основе печеночного настоя (плотная)

10.1. Компоненты среды:

Микробиологический агар – 12,0 – 12,5 г;

Натрия хлорид – 5,0 – 5,5 г;

Натрия гидроокись – 2,0 – 2,5 г;

Магния сульфат – 20,0 – 20,5 г;

Сахароза – 100,0 – 100,5 г;

Глицерин – 10,0 – 10,5 г;

Кристаллический фиолетовый – 0,025 – 0,03 г;

Нормальная лошадиная сыворотка – 100,0 – 200,0 мл;

Бициллин-3 – 3000 ЕД/мл;

Печеночный настой – 18,0 – 18,5 мл;

Пептон ферментативный – 10,0 – 10,5 г;

Вода дистиллированная – до 1 л.

10.2. Навеска, содержащая компоненты среды в указанных выше количественных соотношениях, растворяется в 1 л дистиллированной воды, доводится до кипения при помешивании и кипятится в течение 2 – 3 мин. Затем среда охлаждается до температуры плюс (40 ± 5) °С, добавляется 100 – 200 мл нормальной лошадиной сыворотки и бициллин-3 (3000 ЕД/мл), тщательно перемешивается и разливается в стерильную посуду.

**Диагностические препараты, тест-системы и питательные среды,
используемые для лабораторной диагностики бруцеллеза⁶¹**

№	Наименование препарата	Регистрационное удостоверение
1	Аллерген бруцеллезный жидкий (Бруцеллин), раствор для внутрикожного введения	ЛС-002624 от 29.12.2011
2	Диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации, суспензия для диагностических целей	ФСР 2008/03141 от 17.02.2014
3	Сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая для реакции агглютинации (РА)	ФСР 2012/13323 от 11.04.2012
4	Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в иммуноферментном анализе (ИФА) («ИФА-Бру-СтавНИПЧИ»)	ФСР 2010/06745 от 26.12.2012
5	Набор реагентов тест-система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю бруцеллеза («ИФА-Бру-Аг-СтавНИПЧИ»)	РЗН 2013/428 от 05.04.2013
6	Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителю бруцеллеза (Бруцелла-IgG-ИФА-БЕСТ)	ФСР 2012/13844 от 23.03.2017
7	Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса A к возбудителю бруцеллеза (Бруцелла-IgA-ИФА-БЕСТ)	ФСР 2012/13843 от 29.03.2017
8	Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса M к возбудителю бруцеллеза (Бруцелла-IgM-ИФА-БЕСТ)	ФСР 2012/13842 от 25.03.2017
9	Набор реагентов для иммуноферментного выявления суммарных антител к возбудителю бруцеллеза (Бруцелла-антитела-ИФА-БЕСТ)	РЗН 2015/2716
10	Набор реагентов для определения антител к антигенам бактерий тифо-паратифозной группы, бруцеллам и протее в реакции агглютинации « <i>Brucella</i> - реагент» (Анти-Бактантиген-Тест)	ФСР 2008/02480 от 28.10.13
11	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие («РИФ-Бру-СтавНИПЧИ»)	РЗН 2018/7784 от 07.11.2018
12	Набор реагентов для выявления ДНК бактерий <i>Brucella</i> spp. в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационнофлуоресцентной детекцией «АмплиСенс <i>Brucella</i> spp.-FL»	ФСР 2009/04212 от 13.03.2019

⁶¹ Примечание: при проведении лабораторной диагностики бруцеллеза допускается использовать другие зарегистрированные в установленном порядке диагностические препараты, тест-системы и питательные среды с аналогичными или лучшими характеристиками.

№	Наименование препарата	Регистрационное удостоверение
13	Тест-система для выявления ДНК <i>Brucella</i> spp. методом полимеразной цепной реакции (ГенБру)	ФСР 2007/00099 от 19.09.2022
14	Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени (Бру-Диф-РГФ)	РЗН 2020/9875 от 02.09.2022
15	Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» АмплиСенс	ФСР 2009/05220 от 05.03.2019
16	Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллеза, сапа и мелиоидоза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ)	РЗН 2015/2697 от 02.06.2015
17	Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени («ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ»)	РЗН 2015/3429 от 21.12.2015
18	Питательная среда жидкая для транспортировки биоматериала и накопления бруцелл	РЗН 2013/1153 от 09.09.2013
19	Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллеза сухой (БРУЦЕЛЛАГАР)»	РЗН 2013/1329 от 31.12.2020
20	Питательный бульон для культивирования возбудителя бруцеллеза сухой (Бруцелла-бульон)	РЗН 2015/2948 от 16.10.2020
21	Питательная среда для выделения и культивирования бруцелл сухая (Эритрит агар)	ФСР 2008/02098 от 20.04.2021
22	Питательная среда для накопления бруцелл сухая (Эритрит бульон)	ФСР 2008/02096 от 20.04.2021
22	«Набор реагентов для иммуноферментного определения в плазме крови концентрации стимулированного антигенами бруцелл гамма интерферона «БрИФ-тест»	ТУ 21.20.23-059-01897080-2022

Контроль питательных сред по биологическим показателям для выделения и культивирования возбудителя бруцеллеза

1. Диагностические среды включают: среды для накопления и культивирования; для выделения конкретного возбудителя (элективные и селективные); дифференциальные (например, содержащие индикаторы, красители); для идентификации, позволяющие по отдельным признакам (например, отношение к углеводам, мочеvine, подвижности) проводить идентификацию микроорганизмов.

Биологические показатели, применяемые для оценки питательных сред

2. Чувствительность определяется по максимальному разведению культуры, при котором на всех засеянных чашках (пробирках) наблюдается рост. По этому показателю оцениваются диагностические среды для выделения и дифференциальные.

Показатель прорастания – по проценту выросших колоний микроорганизмов от числа засеянных клеток. По этому показателю оцениваются питательные среды для культивирования.

Эффективность – по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды. По этому показателю контролируются питательные среды для культивирования и среды, используемые в производстве медицинских иммунобиологических препаратов (далее – МИБП).

Показатель стабильности основных свойств микроорганизмов при выращивании на испытываемой среде – по отношению числа атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизательным и другим свойствам колоний к числу выросших на агаровых пластинках колоний тест-штаммов. Определяются для всех сред.

Показатель скорости роста – по минимальному времени выращивания культуры, для диагностических сред.

Организация контроля

3. Для лабораторной диагностики возбудителей особо опасных инфекционных болезней используются питательные среды, перечисленные в приложении 5 к настоящим МУ.

Для зарегистрированных в установленном порядке⁶² питательных сред бактериологическому контролю подлежит первая варка и по одной варке ежегодно от каждой серии, а также все варки серии при изменении условий ее хранения или приготовления.

⁶² Постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

Для незарегистрированных⁶³ питательных сред, приготовленных по утвержденной рецептуре, контролируется каждая варка.

На контроль направляется по 200 мл плотных и по 100 мл жидких питательных сред. На этикетке указываются предприятие-изготовитель, название питательной среды, номер серии, дата приготовления, срок годности. Упаковка должна исключать возможность боя посуды и загрязнение среды при транспортировании.

Тест-штаммы

4. Для бактериологического контроля питательных сред, предназначенных для диагностики бруцеллеза, используются тест-штаммы *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16М и *B. suis* 1330. Тест-штаммы *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16 М и *B. suis* 1330 получают в лиофилизированном состоянии из Национальных Центров верификации⁶⁴.

Хранение тест-штаммов

5. Тест-штаммы *Brucella* хранятся в лиофилизированном состоянии при температуре плюс (4 ± 1) °С до сохранения свойств (см. п. 6). Рабочая субкультура бруцелл хранится в пробирке на скошенном агаре Альбими или эритрит-агаре при температуре плюс (4 ± 1) °С. Пересевы культур проводятся не менее одного раза в 3 месяца, но не более четырех раз. По истечении этого срока для работы вскрывается новая ампула с культурой.

Требования к тест-штаммам

6. Тест-штаммы должны обладать типичными для S-формы бруцелл культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами. В мазках – грамтрицательные палочки или коккобациллы. На агаре тест-штаммы бруцелл образуют выпуклые, гладкие, бесцветные, мутноватые, круглые колонии диаметром 1,0 – 1,5 мм; в бульоне – рост гомогенный без просветления. Тест-штаммы не должны проявлять признаков диссоциации, должны агглютинироваться сывороткой диагностической бруцеллезной поливалентной до ее титра с образованием крупнохлопчатого агглютината. Биохимические свойства: тест-штаммы бруцелл должны ферментировать глюкозу; *B. abortus* 19 ВА и *B. suis* 1330 должны разлагать арабинозу, галактозу, рибозу; *B. melitensis* 16 М не должен ферментировать указанные углеводы; *B. melitensis* 16 М должен расти на питательных средах с анилиновыми красками фуксин и тионин; *B. abortus* 19 ВА – только на среде с фуксином, а *B. suis* – на среде с тионином (см. п. 8.9).

⁶³ Часть 11.1 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ.

⁶⁴ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

Подготовка культуры

7. Лиофилизированная культура тест-штаммов пересевается в две пробирки с бульоном Альбими и чашку Петри с печеночным агаром, агаром Альбими или на эритрит-агар. Посевы инкубируются при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение (48 ± 2) ч. Выросшая культура каждого тест-штамма проверяется на чистоту роста, отсутствие диссоциации, затем пересевается в пробирку со скошенным агаром Альбими, печеночным или эритрит-агаром. После инкубации посевов *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16 М и *B. suis* 1330 при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение (48 ± 2) ч культуры используются для контроля питательных сред.

Контроль плотных и жидких питательных сред (показатели чувствительности, прорастания и скорости роста)

8. Двухсуточная культура тест-штаммов бруцелл смывается с поверхности скошенного агара 0,9 % раствором натрия хлорида, концентрация микробной взвеси доводится до 10 единиц ФСО 3.1.00086 (ОСО 42-28-85) (5 МЕ), эквивалентному $1,7 \times 10^9$ бруцелл в 1 мл.

Полученная микробная взвесь культуры разводится сначала до концентрации 1×10^9 м.к./мл и затем десятикратными разведениями до концентрации 1×10^2 м.к./мл. В процессе разведения перенос взвеси в следующую пробирку производится стерильной пипеткой объемом 1 мл, меняя пипетку для каждого разведения.

Контроль плотных сред. По 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16М и *B. suis* 1330 из разведений в концентрации 10^{-6} (100 м.к.) и 10^{-7} (10 м.к.) высевается на 3 чашки Петри с испытуемой средой и равномерно распределяется покачиванием по всей поверхности. Контролем служит заранее проверенный агар высокого качества.

Учет результатов. Через (72 ± 2) ч инкубации при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С должен наблюдаться рост бруцелл трех тест-штаммов на всех агаровых пластинках при высеве на них 10 м.к. и не менее 60 % из числа засеянных 100 м.к.

Контроль жидких сред. По 1,0 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-7} вносится в 3 пробирки с 9 мл жидкой питательной среды, перемешивается и инкубируется при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение 22 – 26 ч. Одновременно по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-7} высевается на 3 чашки Петри с эритрит-агаром и равномерно распределяется покачиванием по всей поверхности среды.

Через 22 – 26 ч инкубации при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С по 0,1 мл микробной взвеси из каждой пробирки высевается на 3 чашки Петри с эритрит-агаром.

Засеянные чашки с эритрит-агаром без подрачивания и с подрачиванием инкубируются при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С в течение 70 – 74 ч.

Учет результатов. Показатель эффективности среды определяется

отношением среднего числа колоний, выросших на чашках с эритрит-агаром после обогащения в эритрит-бульоне, к среднему числу колоний, выросших на эритрит-агаре до обогащения; он должен быть не менее 3.

Определение стабильности биологических свойств культур при выращивании их на испытываемых средах

9. Стабильность основных свойств бруцелл определяется отношением числа атипичных по свойствам колоний тест-штаммов, изложенным в п.5, к общему числу колоний на чашках с испытываемыми средами. Питательная среда не должна изменять свойства тест-штаммов.

Определение показателя эффективности плотных питательных сред

10. Контроль проводится с использованием тест-штаммов *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16 М и *B. suis* 1330. Подготовка тест-штаммов проводится в соответствии п.6.

Плотные питательные среды. Готовится взвесь штаммов из суточной агаровой культуры с концентрацией 5×10^8 м.к./мл, эквивалентной ФСО 3.1.00086 (ОСО 42-28-85) (5 МЕ). По 0,1 мл этой взвеси засеивается на две пробирки с 5 мл скошенного испытываемого агара (в нижней части пробирки не должно быть столбика). Через 48 ч инкубации при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С культура смывается с поверхности агара 2,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. К 0,5 мл полученной взвеси мерно добавляется 0,9 % раствор натрия хлорида до концентрации 1×10^9 м.к./мл, эквивалентной 10 единицам ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ). Например, на 0,5 мл взвеси, смытой со скошенного агара, пошло 3,2 мл растворителя; всего в пробирке будет 0,5 мл + 3,2 мл = 3,7 мл. Выход с 1 мл среды – $3,7 \times 10^9$ м.к.

Жидкие питательные среды. Из суточной агаровой культуры готовится взвесь из разведений 10^{-5} (1×10^4 м.к./мл) и 10^{-6} (1×10^3 м.к./мл). По 1 мл взвеси из каждого разведения вносится в 3 пробирки с 10 мл жидкой испытываемой среды. Исходное число засеянных микробных клеток в 1 мл среды будет составлять соответственно 1×10^3 и 1×10^2 м.к. Параллельно делается высеив по 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-6} на 3 агаровые пластинки в чашки Петри для определения числа жизнеспособных клеток в посевной дозе (n_0). Через 48 ч инкубации посевов при температуре плюс $(37 \pm 0,5)$ °С из каждой пробирки производится высеив по 0,1 мл на чашки с питательным агаром (n_t). В случае обильного роста культуры в жидкой среде, культура перед высеивом на чашки разводится. Степень разведения учитывается при обсчете результатов. Прирост (J) числа микроорганизмов после инкубации посевов проводится по формуле (10) (%):

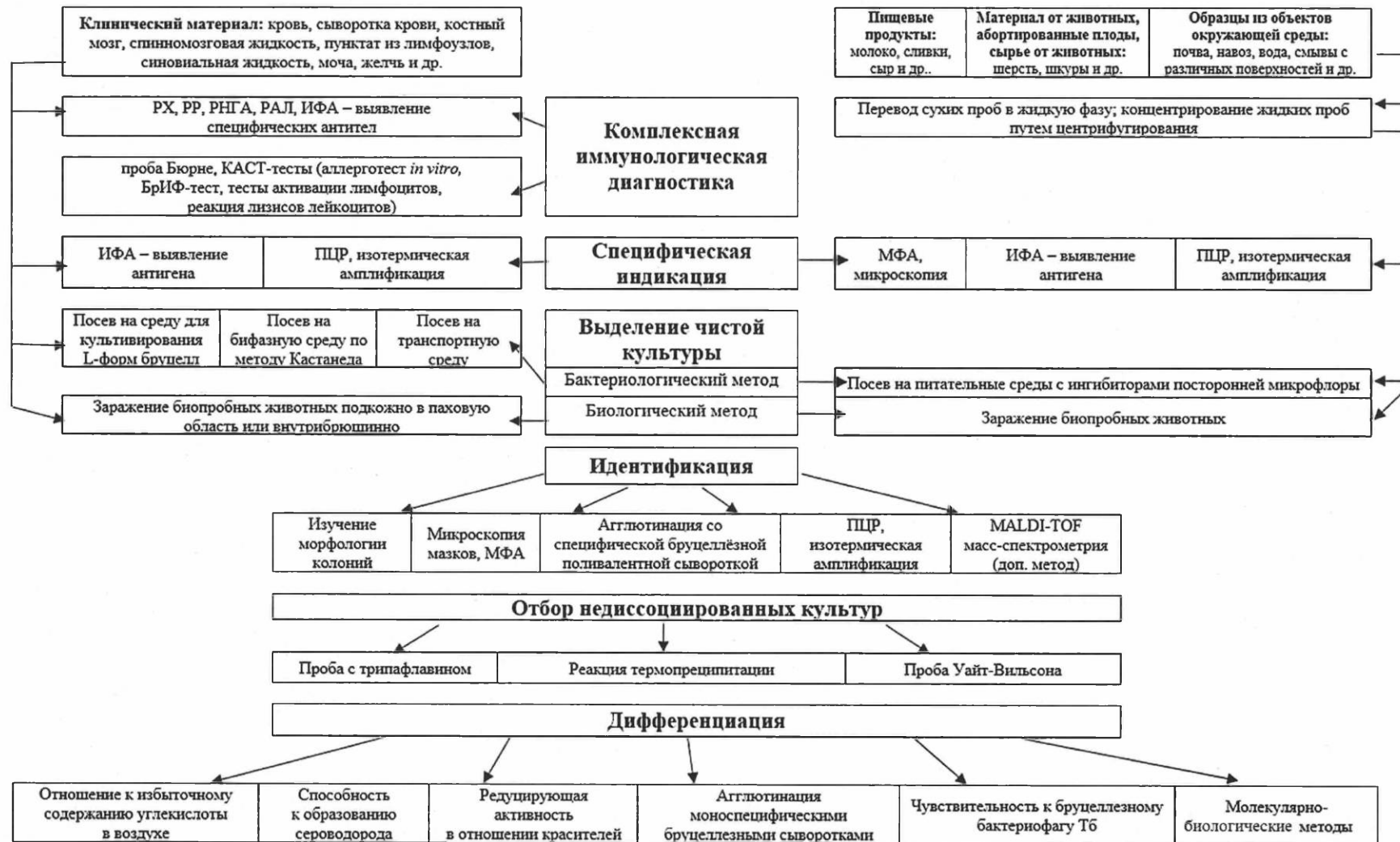
$$J = \frac{n_t - n_0}{n_t} \times 100 \quad (10)$$

где: J – прирост числа микроорганизмов;

n_t – чашки с питательным агаром;

n_0 – число жизнеспособных клеток в посевной дозе.

Схема лабораторной диагностики бруцеллеза



Дифференциальные свойства видов и биоваров бактерий рода *Brucella*

Виды бруцелл	Био-вар	Референтные и типовые штаммы	Потребность в CO ₂	Продукция H ₂ S	Рост на средах, содержащих		Агглютинация моноспецифическими сыворотками			Лизис фагами в ДРТ				Основные хозяева
					Т	Ф	А	М	Р	Тб	Wb	Fi	Bk	
<i>B. melitensis</i>	1	16-M	-	-	+	+	-	+	-	-	(-)	-	+	Овцы, козы
	2	63/9	-	-	+	+	+	-	-	-	(-)	-	+	
	3	Ether	-	-	+	+	+	+	-	-	(-)	-	+	
<i>B. abortus</i>	1	544	(+)	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	Крупный рогатый скот
	2	86/8/59	(+)	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	
	3 ^{<*>}	Tulya	(+)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
	4	292	(+)	+	-	(+)	-	+	-	+	+	+	+	
	5	B-3196	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	
	6 ^{<*>}	870	-	(+)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
<i>B. suis</i>	1	1330	-	+	+	(-)	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи
	2	Thomsen	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи, зайцы
	3	686	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	±	Свиньи
	4	40	-	-	+	(-)	+	+	-	-	+	+	±	Северные олени
	5	513	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	±	Мелкие млекопитающие из отряда грызуны
<i>B. neotomae</i>		5K33	-	+	-	-	+	-	-	±	+	+	+	Кустарниковые крысы
<i>B. ovis</i>		63/290	-	-	+	(-)	-	-	+	-	-	-	-	Овцы
<i>B. canis</i>		RM 6/66	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Собаки
<i>B. pinnipedialis</i>		BCCN 94-73	+	-	+	+	+	±	-	(-)	(+)	+	+	Ластоногие
<i>B. ceti</i>		BCCN 94-74	-	-	+	+	+	±	-	(-)	(+)	+	+	Китообразные
<i>B. microti</i>		CCM 4915 (BCCN 07-01, CAPM 6434)	-	-	+	+	-	+	-	+	+	н/д	н/д	Серые полевки
<i>B. inopinata</i>		BO1 (BCCN 09-01, CAPM 6436)	-	+	+	+	-	+	-	Р	+	+	+	Не установлен
<i>B. papionis</i>		F8/08-60 (NCTC 13660, CIRMBP 0958)	-	-	-	-	+	-	н/д	Р	+	н/д	н/д	Бабуины (<i>Papio spp.</i>)
<i>B. vulpis</i>		F60T и F965	-	-	+	+	+	-	н/д	+	+	+	+	Лисица обыкновенная (<i>Vulpes vulpes</i>)

Примечание: + – признак определяется у всех представителей,
 -- признак отсутствует у всех представителей,
 ± – признак выявляется у некоторых штаммов,
 (+) – большинство культур имеют данный признак,

Примечание: (-) – большинство культур не имеют данный признак,
 Р – неполный лизис фагом Tb при 10⁴×RTD (Scholz et al., 2010) или не чувствительны к фагу Tb (De et al., 2008),
 н/д – нет данных.
 <*> Для более точной дифференциации *B. abortus* биовар 3 и 6 используется тионин 1:25000 (биовар 3+, биовар 6–)

Нормативные и методические документы

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
3. Федеральный закон от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности».
4. Постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».
5. Постановление Правительства Российской Федерации от 24.11.2021 № 2026 «О незарегистрированных медицинских изделиях для диагностики *in vitro*».
6. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
7. СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».
8. Приказ Минздрава России от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».
9. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов бруцеллеза (включая инфекционный эрлихиоз баранов).
10. Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».
11. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».

12. МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей».

13. МР 2.1.0246-21 «Методические рекомендации по обеспечению санитарно-эпидемиологических требований к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

14. МР 3.1.0288-22 «Идентификация и типирование штаммов бруцелл с использованием молекулярно-биологических методов».

15. МУК 4.2.3733-21 «Подготовка культур микроорганизмов I – II групп патогенности для анализа методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и формирование баз данных референсных масс-спектров для автоматической идентификации микроорганизмов».

16. ГОСТ 21237-75 «Мясо. Методы бактериологического анализа».

17. ГОСТ 26809.1-2014 «Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и моллосодержащие продукты».

18. ГОСТ 26809.2-2014 «Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 2. Масло из коровьего молока, спреды, сыры и сырные продукты, плавленые сыры и плавленые сырные продукты».

19. ГОСТ Р 51448-99 «Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований».

20. ГОСТ Р 51447-99 «Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб».

Библиографические ссылки

1. Пономаренко Д.Г., Матвиенко А.Д., Хачатурова А.А., Жаринова И.В., Скударева О.Н., Транквиловский Д.В., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Кондратьева Ю.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Анализ ситуации по бруцеллезу в мире и Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2024. № 2. С. 36-50.
2. Бруцеллез. Современное состояние проблемы. Издание второе, дополненное. Под редакцией Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко. Нижний Новгород. Союзполиграф. Кириллица. 2021. 356 с.
3. Кузнецова И.В., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Бобрышева О.В., Шапаков Н.А., Жиров А.М., Сафонова Н.С., Пономаренко Д.Г., Хачатурова А.А., Жилченко Е.Б., Сердюк Н.С., Куличенко А.Н. Генетическая характеристика штаммов *Brucella melitensis*, выделенных на территории Российской Федерации, на основе данных анализа единичных нуклеотидных полиморфизмов при полногеномном секвенировании. Проблемы особо опасных инфекций. 2024. № 1. С. 154-161.
4. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под редакцией Онищенко Г.Г., Кутырева В.В. Издание 2-е, переработанное и дополненное. 2013. Москва. Шико. 560 с.
5. Пономаренко Д.Г., Саркисян Н.С., Куличенко А.Н. Патогенез бруцеллеза: анализ иммунопатологической концепции. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9. № 3. С. 96-105.
6. Брико Н.И., Онищенко Г.Г., Покровский В.И. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. В 2-х томах. Том 1. Москва. ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство». 2019. 880 с.
7. Ковалев Д.А., Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Бобрышева О.В., Пономаренко Д.Г., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Филогеномный анализ штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Российской Федерации. Бактериология. 2024. Т. 9. № 4. С. 107-114.
8. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е. Резервуары бруцеллезной инфекции в природе. Зоологический журнал. 2010. № 1. С. 53-60.
9. Кулаков Ю.К., Бургасова О.А., Далгатова А.А., Ходжибеков Р.Р. Сравнительная эффективность лабораторных методов в диагностике различных клинических форм бруцеллеза. Инфекционные болезни. 2023. № 2. С. 35-40.
10. Ременцова М.М., Постричева О.В., Рыбалко С.И. Бруцеллез промысловых животных. Под редакцией И.Г. Галузо. Алма-Ата. Издательство «Наука» Казахской ССР. 1969. 155 с.
11. Ременцова М.М. Бруцеллез диких животных. Под редакцией И.Г. Галузо. Алма-Ата. Издательство Академии наук Казахской ССР. 1962. 272 с.
12. Тимофеев А.Ф. Эпизоотологическая роль кровососущих членистоногих при бруцеллезе. Под редакцией А.А. Волковой. АН Киргизской ССР. Институт биохимии и физиологии. Фрунзе. Илим. 1966. 212 с.
13. Вершилова П.А., Чернышова М.И., Князева Э.Н. Патогенез и иммунология бруцеллеза. Москва. Медицина. 1974. 272 с.

14. Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Volynkina A.S., Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Zharinova N.V., Khachaturova A.A., Tokareva L.E., Khvoynova I.G., Kulichenko A.N. Global evolution and phylogeography of *Brucella melitensis* strains. BMC Genomics. 2018. Vol. 19. P. 353–362.

15. Janke N.R., Williamson C.H.D., Drees K.P., Suárez-Esquivel M., Allen A.R., Ladner J.T. Global phylogenomic diversity of *Brucella abortus*: spread of a dominant lineage. Front Microbiol. 2023. Vol. 14. P. 1287046.

16. Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Pisarenko S.V., Shapakov N.A., Khachaturova A.A., Serdyuk N.S. Phylogeny of *Brucella abortus* strains isolated in the Russian Federation. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2021. № 14 (7). P. 323–329.

17. Pereira C.R., Neia R.C., Silva S.B., Williamson C.H.D., Gillece J.D., O'Callaghan D., et al. Comparison of *Brucella abortus* population structure based on genotyping methods with different levels of resolution. J. Microbiol. Methods. 2023. Vol. 211. P. 106772.

18. Tan K.K., Tan Y.C., Chang L.Y. et al. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. BMC Genomics. 2015. 16:93.

19. Vergnaud G., Hauck Y., Christiany D., Daoud B., Pourcel C., Jacques I., Cloeckaert A., Zygmunt M.S. (2018). Genotypic Expansion Within the Population Structure of Classical *Brucella* Species Revealed by MLVA16 Typing of 1404 *Brucella* Isolates From Different Animal and Geographic Origins, 1974–2006. Front. Microbiol. № 9. P. 1545.

20. Whatmore A.M., Koylass M.S., Muchowski J., Edwards-Smallbone J., Gopaul K.K., Perrett L.L. (2016). Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. Front. Microbiol. № 7. P. 2049.

21. Whatmore A.M., Koylass M.S., Muchowski J., Edwards-Smallbone J., Gopaul K.K., Perrett L.L. Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. Front Microbiol. 2016. Vol. 7. P. 2049.