

БРУЦЕЛЛЁЗ

ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОГЕНЕЗ, КЛИНИКА,
ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, ДИСПАНСЕРИЗАЦИЯ

ГБУЗ РК «Республиканская инфекционная больница»
Морозова М.В., заведующая диагностическим отделением
Таскаева А.С., заведующая бактериологической лабораторией

БРУЦЕЛЛЕЗ

Бруцеллёз (син.: лихорадка мальтийская, лихорадка гибралтарская, лихорадка средиземноморская, лихорадка ундулирующая, болезнь Банга, болезнь Брюса, мелитококкоз, мелитококция)- зоонозное инфекционно- аллергическое заболевание, вызывается различными видами бруцелл, передаётся алиментарным, контактно-бытовым и аэрогенным путём, характеризуется ундулирующей лихорадкой, поражением опорно-двигательного аппарата, нервной, половой и других систем, склонностью к хроническому течению.

ЭТИОЛОГИЯ

Возбудитель - представители рода *Brucella* семейства *Brucellaceae*:

- **неподвижные грам (-) бактерии;**
- **Полиморфные - от кокковидных(0,3-0,6 мкм), до палочковидных форм(0,6-2,5 мкм).;**
- **спор и капсул не образуют, жгутиков не имеют;**
- **внутриклеточные паразиты, антигенно однородны, содержат эндотоксин;**
- **растут медленно на питательных средах при повышенном содержании СО (1-3 нед.)**
- **подвержены изменчивости и переходят из S-формы в R- и L- формы;**
- **устойчивы окружающей среде; в воде сохраняются свыше 2 мес., в почве- до 3 мес., в навозе до 75 дн., в молоке - 40 дн., в брынзе - 2 мес., в сыром мясе - 3 мес., засоленном -до 30 дн., в шерсти овец - до 4 мес.;**
- **при T + 80 погибает в течении 5 мин., при кипячении и под воздействием дезинфицирующих средств- несколько мин.,**
- **чувствительны к антибиотикам тетрациклиновой группы, аминогликозидам , фторхинолонам , макролидам, ко- тримаксозолу.**

ЭТИОЛОГИЯ

Род бруцелл подразделяется на 6 видов и 17 биотипов(биоваров). Для человека патогенны 4 вида бруцелл:

- 1.Br.militensis(3 биотипа), основными хозяевами являются овцы и козы;
- 2.Br. abortus bovis(10 биотипов), резервуар- крупный рогатый скот;
- 3.Br. abortus suis(5 биотипов), основные хозяева 1,2,3 биотипа- свиньи, 2 биотип поражает зайцев, 4 биотип- северных оленей, 5 биотип циркулирует у мышевидных грызунов;
- 4.Br. canis вызывает заболевание у собак и , редко у человека,
- 5.Не патогенны для человека-Br.ovis (поражает баранов) и Br. neotomae (поражает кустарниковых крыс).

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

- Бруцеллёз является зоонозом.
- Больной человек не опасен для окружающих.
- Резервуаром и источником инфекции являются сельскохозяйственные животные – мелкий и крупный рогатый скот, свиньи, реже – олени, верблюды, собаки, кошки, которые выделяют возбудитель с молоком, мочой, калом, околоплодной жидкостью.
- Бруцеллёз распространён во многих странах мира (до 500 тыс. случаев в год), особенно в регионах с животноводческой ориентацией сельского хозяйства.
- Наибольшая заболеваемость наблюдается в Средиземноморском бассейне, на Аравийском полуострове, в Индии, Средней Азии, Африке, Мексике, Центральной и Южной Америке.
- В России бруцеллёз регистрируется в Республике Дагестан, Краснодарском и Ставропольском крае., на Южном Урале, Алтае, в Республике Тыва.

МЕХАНИЗМ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЯ:

1. Контактный путь : при попадании на повреждённые кожные покровы и слизистые оболочки околоплодной жидкости (при отёлах, ягнении, при уходе за новорождёнными телятами, ягнятами), при контакте с мясом инфицированных животных, с навозом.

2. Алиментарное заражение : через сырое молоко, при употреблении непастеризованных молочных продуктов (брынза, сыр, масло, простокваша, кумыс) и недостаточно проваренного или прожаренного мяса больных животных.

3. Аэрогенное заражение: при попадании в дыхательные пути пыли, содержащей бруцеллы (в местах выпаса и в загонах для содержания овец, на предприятии, перерабатывающая шерсть и шкуры животных), а также в лабораториях при нарушении техники безопасности.

- Чаще заболевают лица трудоспособного возраста (18-50 лет).
- Естественная восприимчивость людей высокая. Инфицирующая доза составляет от 10 до 100 микробных тел.
- Постинфекционный иммунитет ненапряжённый, через 5-6 лет возможна реинфекция.
- В большинстве случаев это профессиональное заболевание (чаще заражаются чабаны, доярки, пастухи, зооветеринарные работники, работники мясо-комбинатов, кожевенных и шерстеобрабатывающих предприятиях.
- Сезонность чаще зимне-весенняя, реже летняя.

ПАТОГЕНЕЗ

Внедрение через слизистые оболочки , конъюнктиву, повреждённые кожные покровы без «первичного эффекта». Бруцеллы захватываются макрофагами и с током лимфы попадают в регионарные лимфатические узлы, где размножаются и накапливаются. Эта фаза называется лимфогенной и соответствует инкубационному периоду.

Затем бруцеллы могут поступать в кровь и распространяться по всему организму(первичная генерализация), развиваются бактериемия и эндотоксинемия, что клинически соответствует острому периоду болезни.

В различных органах (селезёнке, печени, лимфатических узлах, костном мозге) формируются вторичные(метастатические) очаги инфекции, откуда возбудитель может повторно поступать в кровь. Повторные случаи генерализации инфекции приводят к обострению и рецидивам болезни.

Параллельно происходит иммунологическая и аллергическая перестройка организма. В результате при длительном воздействии возбудителя и продуктов его жизнедеятельности возникает комплекс проявлений, типичных для подострого и хронического бруцеллёза и характеризующихся поражением различных органов и тканей с образованием специфических бруцеллёзных гранулём.

Исходом заболевания может быть либо полное рассасывания воспалительных образований, либо возникновение стойких необратимых рубцовых изменений в поражённых органах.

Инкубационный период при остром начале-1-3 нед. , ; как первично- латентная - несколько месяцев.

- По классификации Г.П.Руднева различают формы :острую (до1,5 мес.), подострую (до 4 мес.), хроническую(более 4 мес.) и резидуальную (клинику последствий) .
- Классификация клинических форм бруцеллёза (Н.И.Рагозов 1952г.) Показал этапность бруцеллёзного процесса:
 1. Первично- латентная;
 2. Остросептическая;
 3. Первично-хроническая метастатическая;
 4. Вторично-хроническая метастатическая;
 5. Вторично- латентная.
 6. Отдельно выделена септико-метастатическая форма – на фоне остросептической формы обнаруживают отдельные очаговые изменения (метастазы).

КЛИНИКА

▪Первично-латентная форма- состояние практического здоровья. Отмечаются микросимптомы (повышение температуры до субфебрильно, незначительное увеличение периферических л/узлов, повышенная потливость при физическом напряжении). Полностью сохраняют трудоспособность.

▪Остросептическая форма – высокая лихорадка(39-40 С), держится от 3-7 дней до 3-4 нед., принимая волнообразный характер, сопровождается ознобами, обильным потоотделением , самочувствие больного остаётся хорошим, увеличение всех групп л/узлов, некоторые из них чувствительны при пальпации. К концу первой недели болезни- увеличение печени и селезёнки. В ОАК - лейкопения, СОЭ в N. Отсутствие очаговых изменений(метастазов). Без этиотропного лечение может заканчиваться выздоровлением.

▪Хронические формы:

1.Первично-хроническая метастатическая;

2.Вторично-хроническая метастатическая (остросептическая форма в анамнезе);

Клинические проявления:

1. Синдром общей интоксикации;

2.Очаговые поражения со стороны различных органов и систем.

КЛИНИКА

- Синдром общей интоксикации :длительный субфебрилитет, слабость, повышенная раздражительность , плохой сон, нарушение аппетита, снижение работоспособности.
- Генерализованная лимфаденопатия (мелкие плотные безболезненные склерозированные л/узлы ($d=0,5-0,7$ см) и вновь появившимися увеличенными мелкими чувствительными или болезненными л/узлами.
- Увеличение печени и селезёнки;
- Поражение опорно-двигательного аппарата: чаще поражаются крупные суставы - коленный, локтевой, плечевой, тазобедренный, редко- мелкие суставы кисти и стоп. При обострении вовлекаются новые суставы. Характерны периартрит, параартрит, бурсит, экзостозы. Суставы опухают, подвижность в них ограничена, кожа над ними нормальной окраски; Нарушение подвижности и деформация обусловлена разрастанием костной ткани. Поражается позвоночник в поясничном отделе, сакроилеит(крестцово-подвздошном сочленении);
- Миозиты. Чаще в мышцах конечностях и пояснице, определяются болезненные участки, а в толще мышц - болезненные уплотнения различных размеров и форм;
- Фиброзит(целлюлит)- в подкожной клетчатке на голеньях, предплечьях, часто на спине и пояснице d от 5-10 мм до 3-4 см.

Поражение нервной системы- чаще проявляется невритом, полиневритом, радикулитом, реже- поражением ЦНС (миелит, менингит, энцефалит, менингоэнцефалит);

Урогенитальная патология: у мужчин- орхитом, эпидидимитом, снижение половой функции; у женщин- сальпингит, метрит, эндометрит, возможны аменорея, развитие бесплодие. У беременных часты аборт, мёртворождения, преждевременные роды. Описан врождённый бруцеллёз у детей;

Поражение глаз: ирит, хориоретинит, увеит, кератиты, атрофия зрительного нерва и др.;

При аэрогенном заражения- вялотекущие бруцеллёзные пневмонии;

Поражение сердечно- сосудистой системы: миокардит, эндокардит, аортит и др.;

Обе хронические формы заканчиваются переходом во вторично- латентную форму.

Вторично- латентная форма чаще переходит в манифестные формы(рециди-вирует), на фоне вторичной латенции- развитие различных резидуальных явлений (ограничение подвижности суставов, бесплодие, нарушение зрения и др.).

ДИАГНОСТИКА

Стандарты обследования:

Общий анализ крови, мочи (в динамике 2 раза);

Кал на я/глистов;

Биохимические анализы крови(концентрация билирубина, АЛТ, АСТ);

Бактериологический метод: выделение бруцелл (в специализированной лаборатории с соблюдением строгих мер предосторожности). Исследуют кровь взятую на высоте лихорадки, ЦСЖ, мочу, кал, желчь, костный мозг, биоптат л/узлов, селезёнки, суставную жидкость и др.;

Серологические методы:

1.РА Райта – положительная с 10-11 дня болезни в титре 1:200 - 1:800 и выше, нарастание титра а/т, особенно у привитых от бруцеллёза;

2.Пластинчатый агглютинационный тест(реакция Хеддельсона), часто даёт ложноположительные результаты.;

3.РПГА с бруцеллёзным эритроцитарным диагностикумом, РСК- нарастание титров специфических а/т в парных сыворотках; ИФА (IgM- и IgG- а/т);

Кожно- аллергические пробы:

1.Реакция Кумбса (в динамике 2 раза);

2.Внутрикожная проба Бюрне (введение бруцеллина).Учёт реакции ч/з 24 и 48ч, d инфильтрата от 3-6 см. Проба (+) со 2-й нед. болезни.;

ЭКГ, УЗИ внутренних органов, Ро-графия позвоночника, суставов.;

Консультация вр- офтальмолога, невролога (по показаниям).

ЛЕЧЕНИЕ

Принципы и методы терапии бруцеллёза зависят от его клинической формы.

При первично- латентных формах бруцеллёза лечение не проводят.

Антибиотикотерапия- при остросептической(септической) форме и других формах при наличии лихорадочной реакции. Продолжительность лечения- 1,5 мес..

Схемы:

Доксициклин внутрь по 100 мг*2р/сут. + стрептомицин в/м по 1г/сутки (первые 15 дн.);

Доксициклин 100 мг*2р/сутки + гентамицин 5 мг/кг/сутки;

Доксициклин по 100 мг*2р/сутки + рифампицин внутрь по 600-900 мг/сутки в 1-2 приёма;

Ко-тримоксазол внутрь по 960 мг*2р/сутки + рифампицин 600-900 мг в 1-2 приёма или стрептомицин в/м по 1 г/сутки;

Офлоксацин по 200-300 мг*2 р/сутки + рифампицин 600-900 мг в 1-2 приёма.

Антибиотики необходимо давать непрерывно.

При остеомиелитах позвонков, паравертебральных, эпидуральных абсцессах, менингоэнцефалитах- курс а/биотиков до 3 мес.. При сочетании менингита и эндокардита- не менее 3-х (доксициклин(проникает ч/з ГЭБ) + 2 из указанных выше.

Хирургический метод- при формировании гнойных поражений паравертебральных тканей.

ЛЕЧЕНИЕ

С первично- и вторично- хроническими формами антибактериальная терапия часто оказываются неэффективными и назначается больным с выраженной лихорадкой более длительными курсами.

Десенсибилизирующие средства – антигистаминные препараты;

Иммуностимулирующие (имунофан, полиоксидоний и др.)- при обострении хронических форм болезни;

Витамины («С», гр.В);

Противовоспалительные (НПВП)-при поражении опорно- двигательного аппарата;

Седативные;

Глюкокортикоиды (преднизолон , дексаметазон)- при поражении ЦНС (менингит, менингоэнцефалит), выраженных воспалительных изменениях (орхиты, невриты), при неэффективности др. противовоспалительных средств.

Физиотерапевтические процедуры (индуктотерапия, электрофорез; ультравысокочастотная терапия, ионогальванотерапия, применение озокерита, парафиновых аппликаций, массаж, лечебная гимнастика и др.)- при очаговом поражении суставов;

Санаторно- курортное лечение (преимущественно местные курорты)- при хроническом бруцеллёзе ч/з 3 мес. после ремиссии.

Бальнеологические процедуры- водолечение, грязелечение- больным с последствиями бруцеллёза.

Прогноз благоприятный. При адекватной терапии- полное выздоровление.

Инвалидизация- при тяжёлом поражении опорно- двигательного аппарата и ЦНС.

Рекомендуют рациональное трудоустройство реконвалисцентов на 3-6 мес, с освобождением от тяжёлого физического труда и работы в неблагоприятных условиях.

Диспансеризация

«Д» учёт врачом КИЗа переболевших острым и подострым бруцеллёзом- 2 года. Обследование в первый год ч/з 1-3, 6, 9, 12 мес., в течении второго года- ежеквартально- клиническое и серологическое (р-ия Райта, РПГА, Хедделсона).

Противорецидивизирующая терапия в первый год- при каждом обследовании, 2-й год- весной и осенью.

С «Д» учёта снимает комиссия в составе вр- инфекциониста, терапевта, эпидемиолога, если в течении 2-х лет наблюдения не отмечали признаков хронического процесса.

Больных хроническим бруцеллёзом- обследование ежеквартально- с обязательной термометрией и серологическим исследованием (р-ия Райта, РПГА).

Противорецидивизирующая терапия- весна и осень.

Пациенты с резидуальным бруцеллёзом направляются на лечение соответствующим специалистам в зависимости от преимущественного поражения органов и систем.

Чабаны, доярки, ветеринарные работники, работники мясокомбинатов и др. профессиональные группы- постоянное диспансерное наблюдение в течении всего периода работы.

При подозрении на заболевание бруцеллёзом (с положительными серологическими реакциями или аллергической пробой Бюрне) без клинических проявлений- обследование 1 раз в квартал. Если титр серологических реакций нарастает- повторное обследование 1раз в 2 мес., при необходимости назначается лечение.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

МУК 4.2.3010-12

Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней

Дата введения 2012-03-29

Характеристика возбудителя бруцеллеза

Возбудитель бруцеллеза относится к роду *Brucella*, который входит в группу грамотрицательных, аэробных/микроаэрофильных палочек и кокков согласно схеме идентификации бактерий Берджи, принадлежит к семейству *Brucellaceae* порядка *Rhizobiales* класса *Alphaproteobacteria*. Бруцеллы являются факультативными внутриклеточными патогенами.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

Род *Brucella* состоит из 10 самостоятельных видов:

1. *Brucella melitensis* (3 биовара; преимущественно поражает коз и овец, возможна миграция на крупный рогатый скот и свиней),
2. *B. abortus* (7 биоваров; вызывает аборт и орхиты у крупного рогатого скота),
3. *B. suis* (5 биоваров; поражает свиней, зайцев, северных оленей, грызунов),
4. *B. neotomae* (выделяется от пустынной кустарниковой крысы),
5. *B. ovis* (вызывает эпидидимиты и орхиты у баранов),
6. *B. canis* (поражает собак).
7. Вновь зарегистрированные бруцеллы: *B. ceti* выделяются от китообразных,
8. *B. pinnipedialis* - от ластоногих,
9. *B. microti* - от серой полевки,
10. *B. inopinata* - источник не установлен.

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

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

Возбудитель бруцеллеза обладает устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды, способен длительное время сохраняться в различных субстратах. В молоке бруцеллы способны сохраняться от 45 до 327 сут; в масле, сливках, в домашнем сыре - до 3 недель, в сливочном масле - более 4 недель, в простокваше, сметане - 8-15 сут, в брынзе - до 60 сут, в кумысе, шубате (сброженное верблюжье молоко) - до 3 сут; в мясе - до 12 сут, а в замороженном виде - до 5 мес; во внутренних органах, костях, мышцах и лимфатических узлах инфицированных туш - в течение 1 мес и более, в овечьей шерсти и смушках - от 1,5 до 4 мес. В естественных условиях во влажной почве и в навозе бруцеллы могут переживать свыше 2 мес.

Бруцеллы чувствительны к ультрафиолетовому излучению, действию прямых солнечных лучей и высоких температур: при температуре 100 °C погибают мгновенно, при 80-85 °C - через 5 мин, при 60 °C - через 30 мин. Сухой жар (90-95 °C) убивает бруцелл в течение часа. В то же время они довольно устойчивы к воздействию низких температур - сохраняют жизнеспособность при температуре минус 5-8 °C в течение 35 сут, а при минус 20 °C - в течение 20 сут.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

Выраженной бактерицидной активностью по отношению к бруцеллам в течение 1-5 мин

- **обладают растворы сулемы (0,1%);**
- **креолина (0,5%);**
- **фенола (3-5%);**
- **хлорамина (0,01-0,05%);**
- **серной, соляной и азотной кислот (0,5%);**
- **уксусной кислоты и формалина (0,2%).**

Однако бруцеллы остаются невосприимчивыми к действию

- **5% раствора борной кислоты в течение 60 мин;**
- **1-2,5% растворов карболовой кислоты в течение суток,**
- **свежегашенной извести в течение 2 ч.**

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

Лабораторная диагностика бруцеллеза включает:

- проведение диагностических исследований клинического материала от людей для установления диагноза у больных с подозрением на заболевание бруцеллезом.

Клинический материал: кровь, сыворотка крови, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость (при артритах), моча, желчь, гной (при абсцессах), пунктаты костного мозга и лимфатических узлов, грудное молоко, мокрота, трупный материал и т.д.

- проведение по эпидпоказаниям лабораторных исследований материала из сырья животного происхождения (шерсть, кожа), продовольственного сырья (мясо и мясные продукты, молоко и молочные продукты) и из объектов окружающей среды (почва, трава, фураж, подстилка, вода, смывы и т.д.).

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

Для лабораторной диагностики бруцеллеза у людей применяются три группы методов:

- **первая - тесты позволяющие выявить возбудитель заболевания и его растворимые антигены;**
- **вторая - методы определения специфических антител;**
- **третья - тесты выявляющие сенсibilизацию организма к бруцеллезным антигенам.**

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Вся работа по выделению и дифференциации бруцелл проводится в строгом соответствии с санитарными правилами "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности. СП 1.2.011-94".

Характерной особенностью рода *Brucella* является медленный рост на питательных средах: от 5 - 10 дней до 20-30 дней после засева. При этом первые генерации некоторых культур способны расти только при наличии повышенного содержания углекислоты (5-10%).

Кровь для посева берут во время лихорадочного состояния больного до лечения антибиотиками. Кровь не менее 10 мл стерильно берут шприцем из локтевой вены и засевают по 5 мл в два флакона емкостью 100-200 мл с двойной средой (агар и бульон).

У больных, прошедших курс лечения антибиотиками, через 1 месяц и спустя 4-6 месяцев после окончания курса антибиотикотерапии, а также больных хронической формой бруцеллеза в период обострения (особенно при субфебрилитете) перед началом лечения, рекомендуется проводить посевы крови, пунктатов костного мозга и лимфатических узлов на специальную питательную среду для выделения L-культур бруцелл. Посевы выдерживаются в термостате не менее 35-40 дней.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Кровь на серологические реакции у больного берут натошак из локтевой вены в количестве 5-10 мл, соблюдая правила асептики, шприцем или с использованием вакуумной системы типа "Vakurette®" с активатором сыворотки. Для получения сыворотки и предотвращения гемолиза пробирку с кровью оставляют при комнатной температуре в скошенном положении до образования сгустка.

Костный мозг получают путем пункции грудины шприцем с короткой и несколько затупленной иглой. Полученный костный мозг (в количестве нескольких капель) засевают в пробирку на питательные среды.

Спинномозговую жидкость отбирают после пункции поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков в количестве 0,1-0,3 мл и засевают на питательные среды.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Материалом для исследования методом ПЦР являются:

- **кровь,**
- **сыворотка крови,**
- **пунктат из лимфатических узлов,**
- **синовиальная жидкость.**

Забор, транспортировку и хранение биологического материала для проведения ПЦР осуществляют в соответствии с действующими методическими указаниями по организации работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Упаковка проб. Пробы упаковывают согласно рекомендациям по правилам перевозки инфекционных материалов с соблюдением принципа тройной упаковки. Материалы помещают в первичный контейнер (водонепроницаемый герметичный), который упаковывается в достаточное количество адсорбирующего материала, чтобы в случае повреждения контейнера адсорбировать всю жидкость. Вторичная упаковка (прочная, водонепроницаемая, герметичная), которая закрывает и защищает первичный контейнер (первичные контейнеры), упакованный в адсорбирующий материал. Вторичную упаковку помещают в наружную упаковку для транспортировки с достаточным количеством амортизирующего материала. Наружную упаковку, минимальные размеры которой должны быть не менее 10х10 см, печатают, маркируют необходимое положение груза стрелками или надписью "верх, осторожно". Недопустимо помещать сопроводительных документов в тару с пробами. Материал с направлением доставляют в специализированную лабораторию специально выделенным транспортом в сопровождении медицинского работника.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Для выделения бруцелл из материалов, загрязненных посторонней микрофлорой и при малой концентрации бруцелл в исследуемом материале, используются морские свинки или белые мыши.

Исследуемый материал вводят подкожно в паховую область в дозах не более 0,5 мл для мышей и 1 мл для морских свинок.

Вскрытие белых мышей производится через 20-25 дней, а морских свинок - через 30-35 дней после введения исследуемого материала. Перед вскрытием у свинок следует взять кровь из сердца для исследования сыворотки в реакции агглютинации. Для посевов у морских свинок берут целиком лимфатические узлы (регионарные к месту введения исследуемого материала): паховый, подчелюстной, шейный, парааортальный, кусочки селезенки, печени, костный мозг, кровь, мочу; у белых мышей лимфатические узлы: паховый, аксельлярный, парааортальный, подчелюстной, кусочки селезенки и печени. Посевы выдерживают при 37°C в термостате 20-25 дней.

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

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Пластинчатая реакция агглютинации (реакция Хеддлсона)

Преимущество метода - простота постановки реакции, быстрое получение результатов и чувствительность реакции. Реакцию ставят на обычном обезжиренном стекле, расчерченном на квадраты величиной 4 х 4 см каждый, по горизонтали должно быть 5 квадратов. На первом квадрате записывается номер испытуемой сыворотки, в последующие квадраты слева направо разливают (микропипеткой) испытуемую сыворотку в следующих дозах: 0,04; 0,02; 0,01 и 0,03 (контроль сыворотки). К испытуемой сыворотке добавляют по 0,03 мл антигена.

Осторожно смешивают, затем стекло слегка подогревают над пламенем спиртовки так, чтобы происходило равномерное нагревание всей поверхности стекла.

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

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для оценки результатов рекомендуется следующая схема:

- а) агглютинация на 4+ во всех дозах сыворотки - результат "резко положительный";
- б) агглютинация не менее 2+ во всех дозах сыворотки - результат "положительный";
- в) агглютинация только в первой или в первой и второй дозах сыворотки - результат "сомнительный";
- г) отсутствие агглютинации во всех дозах сыворотки - реакция "отрицательная".

Для диагностики бруцеллеза имеет значение только положительный результат реакции. При сомнительном или отрицательном результатах реакции и наличии эпидпоказаний, следует применять реакции Райта и Кумбса, РПГА и ИФА.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Реакция агглютинации в пробирках (реакция Райта)

Наибольшую диагностическую ценность реакция агглютинации представляет при острой и подострой форме бруцеллеза.

Техника постановки реакции.

Готовят разведения сыворотки больного с 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 и т.д. Добавляют диагностикум согласно инструкции. Сыворотки с антигеном смешивают путем встряхивания и помещают в термостат (37°C) на 18-20 часов. После инкубации пробирки выдерживают 1-2 часа при комнатной температуре и проводят учет реакции.

При диагностической оценке РА рекомендуется следующая схема:

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

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

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Антиглобулиновая проба (реакция Кумбса)

Ставят при хроническом течении инфекции, когда РА отрицательная или положительная в низких титрах. Выявляет неполные антитела. При постановке реакции Кумбса используют предварительно оттитрованную антиглобулиновую сыворотку против глобулинов человека (например - антиглобулиновая сыворотка для иммуноэлектрофореза против глобулинов человека).

Техника постановки. В начале ставят реакцию агглютинации (Райта). После учета реакции агглютинации (через 20 часов) берут не менее трех пробирок первых разведений. Эти пробирки центрифугируют и промывают три раза. После последнего центрифугирования к осадку отмытого антигена добавляют 0,5 мл антиглобулиновой сыворотки в рабочем титре, пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат на 18-20 часов. Учет реакции проводят также как при реакции агглютинации. Диагностическим титром РК считается агглютинация не менее 2+ в разведении сыворотки 1:50.

Для контроля антиглобулиновой сыворотки взять в опыт сыворотку, содержащую неполные антитела с известным титром.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Реакция пассивной гемагглютинации

РПГА является специфичным и высоко чувствительным методом выявления бруцеллезных антител в сыворотке крови человека. Реакцию ставят в прозрачных полистироловых пластинках с лунками.

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

К разведенной сыворотке с помощью микропипетки добавляют по 0,05 мл диагностикума. Пластины осторожно встряхивают до полного перемешивания содержимого лунки, следя, чтобы не было разбрызгивания жидкости, и оставляют при комнатной температуре. Учет реакции проводят через 2-3 часа.

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

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод используют для диагностики всех форм заболевания, а также при эпидемиологическом обследовании населения и при отборе лиц для вакцинации против бруцеллезной инфекции. В очаге бруцеллеза крупного рогатого скота эффективность диагностики бруцеллеза в 11,9 раза по сравнению с РА Райта, в 6 раз — с реакцией Хеддлсона, в 2,1 раза с антиглобулиновой пробой Кумса.

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

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Непрямой иммунофлуоресцентный метод

При использовании непрямого ИФМ для обнаружения антител к бруцеллам заранее готовят мазки из 1-2 суточной агаровой культуры возбудителя (1×10^9 мкл/мл). На одном предметном стекле делают 8 мазков, фиксируют их в этиловом спирте в течение 30 мин, высушивают на воздухе и помещают во влажную камеру. Исследуемую сыворотку разводят 2-кратно, начиная с разведения 1:2 до 1:320 и наносят пастеровской пипеткой на мазки, начиная с большего разведения. Влажную камеру с препаратом помещают в термостат при 37°C на 30 мин. Мазок отмывают от несвязавшихся антител и после подсыхания его вновь помещают во влажную камеру, докрашивая антивидовой люминисцирующей сывороткой в рабочем разведении. После просмотра препарата под люминесцентным микроскопом устанавливают титр антител в исследуемой сыворотке.

Диагностическим титром считается титр не менее 1:4.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ПРОБА БЮРНЕ

Внутрикожная аллергическая проба основана на способности организма, сенсibilизированного бруцеллезным антигеном, отвечать местной реакцией на внутрикожное введение бруцеллезного аллергена. Реакция специфична, но выявляется у больных позднее, чем антитела, и сохраняется очень долго, иногда годами, после исчезновения клинических симптомов. Аллергическая реакция может быть положительной при бессимптомной инфекции, а также у привитых живой бруцеллезной вакциной и у лиц, длительно контактировавших со специфическим антигеном.

Техника постановки пробы. Бруцеллезный аллерген вводится внутрикожно в количестве 0,1 мл на ладонной поверхности предплечья шприцом с тонкой иглой. Учет реакции производится через 24-48 часов после введения аллергена путем осмотра и ощупывания кожи. Иногда аллергическая реакция становится положительной к 72 часам.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ПРОБА БЮРНЕ

При положительной реакции на месте введения аллергена появляется красноватая или бледная болезненная отечность удлиненной или овальной формы.

Отек может быть с четкими контурами с ясным возвышением над уровнем нормальной кожи. При слабо выраженной реакции отек выявляется только при ощупывании (сравнить с аналогичным участком кожи на другой руке).

Гиперемию кожи при отсутствии отека принимают за отрицательный результат.

При учете реакции отмечается размер отека в сантиметрах (длина и ширина), степень болезненности через 24 и 48 часов.

При отрицательном результате следует учитывать реакцию и через 72 часа.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

КОЖНО-АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ПРОБА БЮРНЕ

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

Реакция, появившаяся и исчезнувшая ранее шести часов после введения аллергена, считается неспецифической.

Возможна общая реакция организма на введение бруцеллина с повышением температуры, ознобом, головной болью и недомоганием.

Оценка реакции: слабо положительная - слабо выраженный отек не более 2 см в диаметре, положительная - отек размером от 2 до 6 см в диаметре, резко положительная - отек свыше 6 см, иногда сопровождающийся лимфаденитом и общей реакцией организма.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА. РЕАКЦИЯ ЛИЗИСА ЛЕЙКОЦИТОВ

-метод выявления гиперчувствительности замедленного типа in vitro. Р-я основана на разрушении лейкоцитов под влиянием специфического антигена. В качестве антигена используется взвесь убитых нагреванием бруцелл или вакцинный штамм B. abortus 19ВА. Р-я обладает строгой специфичностью, дает возможность количественного учета степени сенсибилизации организма, позволяет получить ответ через 3-4 часа после взятия крови.

Кровь в количестве 1 мл и смешивается с гепарином и по 0,4 мл гепаринизированной крови помещается в 2 пробирки. В первую пробирку добавляют 0,1 мл бруцеллезного антигена (опытная пробирка), во вторую - 0,1 мл физраствора для установления неспецифического лизиса лейкоцитов (контрольная пробирка). Пробирки встряхивают и проводят подсчет лейкоцитов в камере Горяева по принятому в гематологии методу. Затем пробирки помещают в термостат на 2 часа при 37°С и периодически встряхивают их через 15-20 мин. Подсчет производится не менее 2-3 раз для каждой пробирки. По формуле высчитывают показатель специфического лизиса лейкоцитов (ПСЛ). ПСЛ выражается отрицательной величиной и колеблется в пределах от -10 до -30%. ПСЛ меньше -10% свидетельствует о неспецифическом лизисе.

БРУЦЕЛЛЕЗ. ДИАГНОСТИКА.

Методы используются в зависимости от целей исследования.

При проведении **эпидобследования** населения в очагах рекомендуется: РА Хеддлсона, РПГА, ИФА, кожно-аллергическая проба Бюрне.

При обследовании населения **перед профилактической вакцинацией**: РА Хеддлсона или ИФА и проба Бюрне или реакция лизиса эритроцитов.

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

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

В первые 6 месяцев от начала заболевания серологические реакции оказываются положительными почти в 98% случаев. В поздние периоды заболевания большую диагностическую ценность имеет реакция Кумбса, ИФА и внутрикожная аллергическая проба.