

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**



ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА БРУЦЕЛЬОЗУ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ – 2026

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 3 від 19.05.2026 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику державних лабораторій Держпродспоживслужби Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 24 від 15.07.2026 р.).

Розробники: Піщанський О.В. канд. вет. наук, Алексеева Г.Б. канд. вет. наук, Пискун А.В. канд. вет. наук, Кравцова О.Л., Ординська Д.О., Мусієць І.В., Поліщук О.Д., Метопалова Г.М., Придюк О.В.

Рецензенти:

Корнієнко Л.Є. – доктор ветеринарних наук, професор, головний науковий співробітник науково-дослідного епізоотологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи;

Болотін В.І. – кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник науково-дослідного відділу організації наукової та міжнародної роботи Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи;

Ушкалов В.О. – доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України, академік НААН України

Лабораторна діагностика бруцельозу сільськогосподарських тварин: методичні рекомендації; О.В. Піщанський, Г.Б. Алексеева, А.В. Пискун, Д.О. Ординська, О.Л. Кравцова, І.В. Мусієць, О.Д. Поліщук, Г.М. Метопалова, О.В. Придюк; Київ, ДНДІЛДВСЕ; 2026; 74 с.

У методичних рекомендаціях представлені дані щодо актуальності та аспектів лабораторної діагностики бруцельозу у тварин.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів регіональних, міських, районних та міжрайонних державних лабораторій Держпродспоживслужби, лікарів ветеринарної медицини, наукових співробітників науково-дослідних установ, слухачів факультетів післядипломного навчання, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень та скорочень	4
Вступ	5
I. Актуальність проблематики, пов'язаної з бруцельозом тварин	7
1.1. Етіологія	7
1.2. Епізоотологічні дані та клінічний прояв у тварин	8
1.2.1. Географічне поширення хвороби	8
1.2.2. Інфікування великої рогатої худоби збудниками бруцельозу	9
1.2.3. Інфікування овець і кіз збудниками бруцельозу	10
1.2.4. Інфікування свиней збудниками бруцельозу	11
1.3. Зоонозний ризик і вимоги біобезпеки	12
1.4. Діагностика	13
1.5. Диференційна діагностика	15
II. Методи лабораторної діагностики бруцельозу с/г тварин	16
2.1. Бактеріологічні методи досліджень	16
2.1.1. Відбір біологічного матеріалу до випробування	16
2.1.2. Бактеріологічний метод діагностики	18
I. Мікроскопія мазків	18
II. Культуральне виділення бактерій роду <i>Brucella</i>	19
III. Постановка біопроби	22
2.2. Молекулярно-генетичні методи досліджень	24
2.2.1. Контроль якості досліджень ПЛР	26
2.2.2. Валідація ПЛР	27
2.2.3. Відбір патологічного матеріалу для ПЛР	27
2.3. Серологічні методи досліджень	28
2.3.1. РБП. Методика постановки. Інтерпретація результатів	29
2.3.2. РА. Методика постановки. Інтерпретація результатів	31
2.3.3. РЗК. Методика постановки. Інтерпретація результатів	35
2.3.4. ФПА. Методика постановки. Інтерпретація результатів	48
2.3.5. ІФА. Методика постановки. Інтерпретація результатів	50
2.4. Методи досліджень антитіл у молоці	55
2.4.1. ІФА	55
2.4.2. Кільцева реакція з молоком	56
2.5. Методи досліджень клітинного імунітету	58
2.5.1. Шкірний тест на бруцельоз	58
2.5.2. Гамма-інтерферон тест	59
Список використаної літератури	61
Додатки	67

Перелік умовних позначень та скорочень

C-ELISA – конкурентний варіант імуноферментного аналізу;
FITC – ізотіоціанат флуоресцеїну;
I-ELISA – непрямий варіант імуноферментного аналізу;
IGRA – тест на вивільнення гамма-інтерферону;
ISaBmS – Міжнародна стандартна антисироватка проти *Brucella melitensis*;
MLST – мультилокусне секвенувальне типування;
MLVA – мультилокусний аналіз варіабельної кількості тандемних повторів;
ВЛІ – внутрішньолaboratorні інфекції;
ГСТ – гіперчутливість сповільненого типу;
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
ІФА (ELISA) – метод імуноферментного аналізу;
КР з молоком (MRT) – кільцева реакція з молоком;
м.о. – мікроорганізми;
МППБ - м'ясопептонний печінковий бульйон;
МППГА – м'ясо-пептонний печінково-глюкозо-гліцериновий агар;
ПГА – печінково-глюкозо-гліцериновий агар;
ПГБ – печінково-глюкозо-гліцериновий бульйон;
ПЛР (PCR) – полімеразна ланцюгова реакція;
РА – реакція аглютинації;
РБП (RBT) – Роз-Бенгал проба;
РЗК (CFT) – реакція зв'язування комплементу;
ФПА (FPA) – флуоресцентно-поляризаційний аналіз.

ВСТУП

Бруцельоз – це один із найбільш поширених зоонозів бактеріальної етіології у світі, що характеризується абортами, орхітами, епідидимітами, артритами, враженнями центральної нервової системи тощо. Все вищезазначене спричиняє тривалі розлади у репродуктивній системі тварин, що, у свою чергу, веде до значних економічних збитків.

Проблема бруцельозу протягом багатьох років залишається актуальною для сільського господарства й охорони здоров'я. Значна сприйнятливість різних видів та легкість інфікування ускладнюють контроль за цією інфекцією. Соціально-економічна значимість проблеми бруцельозу визначається особливостями перебігу цієї інфекції, а також основним контингентом, що уражується, а саме працездатним населенням, що пов'язано як із професійними факторами, так і соціальними причинами. Однією з найбільш яскравих клінічних особливостей перебігу сучасного бруцельозу є наявність вираженої тенденції до переходу захворювання в хронічну форму з наступною інвалідизацією.

Варіабельність збудника (станом на 2025 рік писано понад 20 видів бруцел, однак таксономія продовжує переглядатися із застосуванням молекулярно-генетичних методів) та поліморфізм клінічних проявів, особливо на ранніх стадіях, ускладнюють своєчасну діагностику. До того ж, досі не вирішена проблема лікування, тому що збудник захворювання – внутрішньоклітинний паразит, що робить його недосяжним для дії антибіотиків саме у період його перебування всередині клітини. Крім того, важливу роль в ефективній лабораторній діагностиці бруцельозної інфекції відіграє диференціація бруцел на S-форми (прозорі, на твердих живильних середовищах невеликі, круглі та опуклі) та R-форми (матові, на твердих живильних середовищах утворюють сухі, зернисті, нерівні, зморшкуваті колонії з грубими краями). Типовими представниками S-форм є *B. abortus*, *B. melitensis* та *B. suis*, які вражають відповідно ВРХ, ДРХ, свиней та, в меншій мірі, коней.

Специфічні антитіла до цих збудників ефективно виявляються класичними діагностичними методами: реакцією зв'язування комплементу (РЗК), реакцією аглютинації (РА), Роз-Бенгал пробою (РБП), імуноферментним аналізом (ІФА) тощо. У цих методичних вказівках основна увага приділена саме таким формам бруцел, оскільки вони відіграють ключову роль у поширенні інфекції серед сільськогосподарських тварин. У той же час, представниками R-форм є *B. canis* (вважає собак) та *B. ovis* (збудник інфекційного епідидиміту баранів). Для діагностики цих збудників використовують модифіковані методи досліджень.

Враховуючи все вищезазначене, бруцельоз ВРХ, ДРХ та свиней занесений до переліку хвороб, що підлягають обов'язковій звітності до Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (ВООЗТ), що зазначено у «Кодексі здоров'я наземних тварин».

I. Актуальність проблематики, пов'язаної з бруцельозом тварин

1.1. Етіологія

Бактерії, що спричиняють бруцельоз, належать до роду *Brucella*, родини *Brucellaceae*, порядку *Rhizobiales*, класу *Alphaproteobacteria*. Вони демонструють генетичну спорідненість із деякими фітопатогенами та симбіонтами родів *Agrobacterium* і *Rhizobium*, а також зі збудниками хвороб у тварин (*Bartonella*) та умовно-патогенними чи ґрунтовими бактеріями, такими як *Ochrobactrum* [31].

По своїй природі це грамнегативні коккобактерії або короткі палички розміром 0,6–1,5 мкм у довжину та 0,5–0,7 мкм у ширину. Вони не мають джгутиків, нерухомі, безкапсульні, не утворюють спор та є аеробами [48]. Вони є факультативними внутрішньоклітинними патогенами, які здатні проникати, розмножуватися та виживати в дендритних клітинах, макрофагах, трофобластах плаценти та епітеліальних клітинах [27].

Станом на сьогодні рід *Brucella* представлений численними видами, кількість яких постійно збільшується внаслідок перегляду таксономії та опису нових представників. До найбільш епізоотично значущих для сільськогосподарських тварин належать *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* та *B. canis*, тоді як інші види асоційовані переважно з морськими ссавцями, гризунами, земноводними та іншими тваринами. Диференційна характеристика найбільш поширених видів представлена у додатку А. Генетичні та імунологічні дослідження свідчать про тісну спорідненість усіх представників роду *Brucella*. Водночас, з огляду на значні відмінності у видовій специфічності господаря та епідеміології, а також молекулярні докази геномної варіабельності, Міжнародний комітет із систематики прокаріот, Підкомітет із таксономії бруцел, у 2005 році висловив чітку позицію щодо повернення до поглядів на класифікацію *Brucella*, які існували до 1986 року. Наслідком цієї позиції стало повторне затвердження шести класичних номінальних видів *Brucella* з відповідними визнаними біоварами, хоча обидві таксономічні точки зору залишаються чинними (диференційна характеристика біоварів

представлена у додатку Б) [3]. Класичні назви шести номінальних видів, опубліковані в Approved Lists of Bacterial Names (1980), включають *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* і *B. canis* [31].

Основним збудником бруцельозу у овець і кіз є *B. melitensis*, яка водночас є надзвичайно патогенною для людини і вважається однією з найнебезпечніших зоонозних інфекцій у світі [41]. З соціально-економічної точки зору найбільше значення мають три види бруцел, які найчастіше інфікують сільськогосподарських тварин, зокрема *B. suis*, *B. melitensis* та *B. abortus* [14, 23]. Ці збудники продукують уреазу, оксидазу, каталазу, нітратредуктазу та є негемолітичними; водночас вони негативні в реакціях на індол, метиловий червоний і пробу Фогеса-Профскауера [15]. Більшість видів *Brucella* використовують глюкозу як джерело енергії [37].

З огляду на високу контагіозність при аерозольному інфікуванні, низьку інфікуючу дозу та здатність спричиняти тяжке захворювання, бактерії роду *Brucella* віднесені Центрами з контролю та профілактики захворювань США (CDC) до біологічних агентів категорії В, що розглядаються як потенційні агенти біотероризму. [7].

1.2. Епізоотологічні дані та клінічний прояв у тварин

1.2.1. Географічне поширення хвороби

Поява нових осередків інфекції та рецидиви захворювання в уже уражених регіонах свідчать про динамічний характер географічного поширення бруцельозу [28]. Захворювання поширене серед сільськогосподарських тварин майже по всьому світу, за винятком Великої Британії, Нідерландів, Норвегії, Австралії, Кіпру, Канади, Швеції та Фінляндії [17]. Водночас бруцельоз є особливо поширеним у країнах Середземномор'я, Близького Сходу, Мексики, Південної Америки, Центральної Азії, Африки та Індії [18].

Враховуючи епізоотичний статус тварин щодо бруцельозу, Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (ВООЗТ) у звіті за результатами 26-річного аналізу (1996–2023 рр.) класифікувала 156 країн на три категорії:

1) вільні від бруцельозу країни, де захворювання не реєструвалося протягом усього періоду дослідження;

2) неензоотичні щодо бруцельозу країни, де хвороба не виявлялася протягом досліджуваного періоду, але потенційно збудники можуть циркулювати;

3) вільні від бруцельозу країни менше ніж три роки [45].

Станом на 2026 рік, країни, визнані вільними від хвороби, переважно розташовані в Європі та Океанії. Висока або ензоотична захворюваність спостерігається у Центральній та Південній Америці, Африці та частині країн Азії [6]. Бруцельоз залишається ендемічним у країнах Близького Сходу, Західної Азії, Південної Європи, Індії та Південної Америки [2]. Проте, перелік країн, «вільних від бруцельозу», швидко застаріває і визначається відповідно до актуальних даних ВООЗТ.

Щодо нашої держави, за даними офіційної звітності регіональних державних лабораторій Держпродспоживслужби України, останній підтверджений випадок бруцельозу великої рогатої худоби було зареєстровано у 1992 році, а свиней – у 2008 році (Держпродспоживслужба України, архівні звіти з епізоотичної ситуації щодо бруцельозу).

1.2.2. Інфікування великої рогатої худоби збудниками бруцельозу

Інфікування ВРХ зазвичай викликається біоварами *Brucella abortus*. У деяких країнах, особливо в південній Європі, Африці та Західній Азії, де тварини цього виду утримуються спільно з вівцями або козами, можливе також інфікування збудником *B. melitensis* [44]. У літературі описані також випадки ураження *B. suis*.

Молоді тварини та неплідні самки зазвичай не демонструють клінічних ознак захворювання. Після інфікування *B. abortus* або *B. melitensis* у тільних корів розвивається плацентит, що зазвичай призводить до аборту між п'ятим і дев'ятим місяцями тільності. Навіть за відсутності аборту можливе інтенсивне виділення збудника з плацентою, плодовими водами та статевими виділеннями. Молочна залоза та прилеглі лімфатичні вузли також можуть бути уражені, при

цьому бруцели можуть виділятися з молоком. Молозиво від інфікованих корів є джерелом зараження новонароджених телят.

Наступні тільності, як правило, завершуються народженням живого потомства, однак ураження матки й молочної залози залишаються, хоча й з меншим виділенням збудника з послідом та молоком (молозивом). При гострих формах інфекції збудник може існувати у більшості великих лімфатичних вузлів організму.

У дорослих бугаїв розвивається орхіт або епідидиміт, а бруцельоз може стати причиною безпліддя в обох статей. *Brucella abortus* може виділятися зі спермою та сечею. У деяких тропічних країнах типовим проявом бруцельозу є гігрома (особливо в ділянці суглобів кінцівок), які іноді є єдиним помітним клінічним симптомом інфекції; рідина з гігromи часто містить збудник.

1.2.3. Інфікування овець і кіз збудниками бруцельозу

Інфікування овець і кіз (за винятком інфекцій, викликаних *B. ovis*) в основному спричиняється *Brucella melitensis*. Спорадичні випадки інфікування, викликані *B. abortus* або *B. suis*, також спостерігалися, однак вони є вкрай рідкісними. Інфекції, викликані бруцелями серед овець і кіз, мають широке поширення, хоча вважається, що низка країн є вільними від цього збудника. Актуальну інформацію можна знайти через інтерфейс WAHIS ВООЗТ.

За патоморфологічними та епізоотологічними характеристиками інфекція *B. melitensis* у овець і кіз подібна до інфекції *B. abortus* у великої рогатої худоби. У більшості випадків основними шляхами передачі є плацента, плодові води та статеві виділення, що виділяються інфікованими вівцями та козами під час або впродовж кількох місяців після абортів чи окоту. Виділення бруцел також часто відбувається з секретами вимені та зі спермою. Збудник може бути ізолюваний із різних тканин, таких як лімфатичні вузли голови, селезінка, а також органи, пов'язані з репродуктивною системою (матка, сім'яники), і з артритичних уражень [1].

1.2.4. Інфікування свиней збудниками бруцельозу

Інфікування свиней найчастіше спричиняється біоварами 1, 2 або 3 *Brucella suis*. Спорадичні випадки інфікування *B. abortus* або *B. melitensis* у свиней також були зареєстровані, однак вони є рідкісними. Захворювання поширене в багатьох країнах, де вирощують свиней. Загалом поширеність є низькою, однак у деяких регіонах, таких як Південна Америка та Південно-Східна Азія, вона може бути значно вищою. У деяких країнах бруцельоз свиней може бути серйозною, але наразі недооціненою проблемою.

Інфекції, спричинені *B. suis* біовару 1, зафіксовані серед диких свиней у південних штатах США, у деяких частинах Австралії та кількох інших країнах Океанії. У цих регіонах було зареєстровано численні випадки захворювання серед людей, які полюють або контактують із патологічним матеріалом диких свиней. Захворювання, як правило, передається через корм, контамінований абортіваними плодами, плацентами або матковими виділеннями. Свині інстинктивно поїдають абортівані плоди та плацентарні оболонки. Часто також відбувається передача збудника під час злучки, а виділення *B. suis* зі спермою має важливе значення для господарств, де застосовується штучне осіменіння.

Як і у жуйних тварин, після початкової бактеріємії *B. suis* колонізує репродуктивні органи тварин обох статей. У самок бактерія проникає в плаценту та плід, тоді як у самців ураження може виникати в сім'яниках, простаті, сім'яних міхурцях або бульбоуретральних залозах. У самців ураження зазвичай одностороннє й починається з гіперплазії, яка може перейти в абсцес, а в кінцевій стадії – у склероз і атрофію.

Найбільш поширеним проявом бруцельозу у свиноматок є аборт, який може виникати в будь-який період супоросності, але найчастіше між 50-м і 110-м днями. Статеві виділення зазвичай відсутні, а у хронічно інфікованих стадах основною клінічною ознакою є безпліддя, а не аборти. У самців бруцельоз частіше набуває хронічного перебігу з ураженням статевих органів, що може призводити до тимчасового або постійного зниження чи втрати репродуктивної

здатності. При цьому кнур може виділяти бруцел зі спермою навіть без видимих змін статевих органів або змін у статевій поведінці.

У тварин обох статей можуть виникати артрити в різних суглобах, набряки суглобів та сухожильних піхв, кульгавість, іноді параліч задніх кінцівок або спондиліт. Значна частка інфікованих свиней може одужати протягом шести місяців, однак багато з них залишаються персистентно інфікованими [38].

Інфекція, спричинена *B. suis* біовару 2, відрізняється від біоварів 1 і 3 за спектром хазяїв, поширенням і патогенністю. Історично її географічне поширення охоплювало регіон від Скандинавії до Балкан. Поширеність інфекції серед диких свиней у континентальній Європі є високою. Під час спалахів у Європі джерелом інфекції біоваром 2 для свиней, яких утримують вигульно, були дикі свині, які розглядаються як основне природне резервуарне джерело збудника. *Brucella suis* bv. 2 спричиняє міліарні ураження, особливо в репродуктивних органах, що часто нагноюються.

На сьогодні біовар 2 рідко є причиною бруцельозу людини. Також у Європі були описані поодинокі безсимптомні випадки зараження ВРХ та ДРХ після контакту з інфікованими дикими свинями.

1.3. Зоонозний ризик і вимоги біобезпеки

Деякі види бруцел, насамперед *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* і, ймовірно, меншою мірою *B. canis*, легко передаються людині, спричиняючи гостре гарячкове захворювання – ундулярну (хвильову) лихоманку, яке може переходити в хронічну форму і викликати серйозні ускладнення з боку опорно-рухового апарату, серцево-судинної та центральної нервової систем. За даними ВООЗ у світі щорічно реєструється близько 500 тис. нових випадків бруцельозу у людей.

Необхідно вживати відповідних заходів для запобігання інфікуванню. Зараження відбувається переважно через слизові оболонки рота, дихальних шляхів або кон'юнктиву. Вживання сирих (непастеризованих) молочних

продуктів є основним фактором ризику для населення в ендемічних регіонах. Існує професійний ризик для ветеринарів, працівників боєнь і фермерів, які контактують із інфікованими тваринами, їхніми тушами, абортіваними плодами чи плацентами.

Бруцельоз також є однією з найпоширеніших внутрішньолaborаторних інфекцій (ВЛІ). Усі лабораторні маніпуляції з живими культурами м.о. роду *Brucella* або потенційно інфікованим / контамінованим матеріалом повинні проводитися на відповідному рівні біобезпеки та в умовах, які забезпечують належний рівень біозахисту, що визначається на основі аналізу біоризиків з дотриманням конкретних рекомендацій щодо заходів біобезпеки під час роботи з інфікованими матеріалами [1, 19, 29, 30].

1.4. Діагностика

Усі випадки абортів, а також орхіту у ВРХ, ДРХ, верблюдів і свиней мають розглядатися як підозра на бруцельоз і підлягають розслідуванню через аналіз епізоотологічного анамнезу стада та лабораторне дослідження відповідних зразків.

Клінічні ознаки не є патогномонічними, і однозначний діагноз може бути встановлений лише шляхом виділення та ідентифікації збудника. Однак у випадках, коли бактеріологічне дослідження неможливе, діагностика має базуватися на молекулярних або імунологічних методах.

Діагностичні тести можуть застосовуватися з різними цілями, а саме: підтверджуючий діагноз, скринінг (дослідження превалентності), сертифікація, а в країнах, де бруцельоз ліквідовано, контроль можливого повторного занесення збудників через імпорт інфікованих тварин або продуктів тваринного походження.

Діагностичні методи поділяють на прямі тести, що включають бактеріологічні та молекулярно-генетичні (ПЛР), і непрямі тести, які застосовуються або *in vitro* (переважно з молоком чи сироваткою крові), або *in vivo* (алергічний метод з бруцеліном). Вибір конкретної стратегії досліджень

залежить від переважаючої епідеміологічної ситуації щодо бруцельозу сприйнятливих тварин у країні чи регіоні.

Рекомендовані ВООЗТ методи лабораторних досліджень бруцельозу, викликаного збудниками *B. melitensis*, *B. abortus* та *B. suis* представлені у таблиці 1 [31].

Таблиця 1

Ефективність методів лабораторної діагностики бруцельозу, викликаного збудниками *B. abortus*, *B. melitensis* або *B. suis* відповідно до даних ВООЗТ

Метод		Мета застосування					
		Популяція благополучна щодо інфекції	Окрема неінфікована тварина	Оздоровлення від хвороби	Підтвердження підозрілих або клінічних випадків	Нагляд за розповсюдженням інфекції у стаді	Імунний статус окремих тварин чи популяції після вакцинації
Ідентифікація збудника							
Бактеріоскопія		–	–	–	+	–	н/з
Культивування		–	–	–	+++	–	н/з
ПЛР		–	–	–	+ / ++	–	н/з
Виявлення імунної відповіді							
РБП		+++	++	+++	+	+++	н/з
ФПА		++	++	+	++	++	н/з
РЗК		++	++	+++	++	+++	н/з
ІФА	I-ELISA	+++	++	+++	++	+++	н/з
	C-ELISA	++	+	+	+	++	н/з
Бруцеліновий шкірний тест		++	–	+	+++	++	н/з
РА		++	+	+	–	+	н/з
Реакції з нативним гаптенем		–	–	+	++	–	н/з
Дослідження пулів молока методом ІФА або КР		+++	–	+++	+	+++	н/з

Примітка: +++ рекомендований метод; ++ придатний; + може застосовуватися в деяких випадках, але вартість, надійність чи інші фактори обмежують його застосування; – не застосовується для даної мети; н/з - не застосовується.

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція, РБП – Роз-Бенгал проба, ФПА – флуоресцентно-поляризаційний аналіз, РЗК – реакція зв'язування комплементу, ІФА – імуноферментний аналіз, C-ELISA – конкурентний ІФА, I-ELISA – непрямий ІФА, РА – реакція аглютинації, КР – кільцева реакція з молоком.

Золотим стандартом у діагностиці бруцельозу є виділення та культивування збудника, незважаючи на наявність інших методів діагностики. Класично бактеріальну культуру ідентифікують як *Brucella spp.* за

характеристиками росту, хоча однозначна ідентифікація нині можлива за допомогою різноманітних молекулярних методів [21, 31].

1.5. Диференційна діагностика

За лабораторних досліджень на бруцельоз слід виключати інші інфекційні захворювання тварин, збудники яких вражають репродуктивну та опорно-рухову системи. Зокрема, часто аборти виникають за хламідіозу (збудник *Chlamydophila abortus*), кампілобактеріозу (*Campylobacter fetus*), токсоплазмозу (*Toxoplasma gondii*) тощо. Збудники гемофільозу та актинобацильозу (*Histophilus somni* та *Actinobacillus seminis*, відповідно можуть викликати ураження репродуктивної системи, нагадуючи бруцельоз.

Крім того, мікоплазми та рикетсії викликають легеневі інфекції з бронхопневмонією, які можуть поєднуватися з артритом і нагадувати системні прояви при бруцельозі.

У сільськогосподарських тварин, особливо свиней, не є рідкістю інфікування ієрсиніозом, викликаним *Yersinia enterocolitica* серотипом O:9 (YO9). Оскільки YO9 та *Brucella spp.* мають спільний полісахаридний О-ланцюг (англ. – O-chain), антигени, що використовуються в серологічних тестах, не є специфічними до антитіл на ці два патогени.

II. МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

БРУЦЕЛЬОЗУ С/Г ТВАРИН

2.1. Бактеріологічні методи досліджень

Безпосередню роботу з ізолятами *Brucella* spp. необхідно проводити із застосуванням практик та інженерних засобів біологічної безпеки, еквівалентних рівню BSL-3 відповідно до вимог чинних нормативних документів. У той же час, робота з клінічним матеріалом з підозрою на бруцельоз може виконуватися за нижчого рівня біобезпеки за умови проведення оцінки ризику та використання відповідних заходів контролю [4, 24].

2.1.1. Відбір біологічного матеріалу до випробування

Бактеріологічні дослідження проводять у випадках абортів або при виявленні інших підозрілих на бруцельоз клінічних ознак (орхіти, епідидиміти, бурсити), а також при діагностичному забої тварин.

Для проведення бактеріологічних досліджень в лабораторію направляють матеріал від кожної тварини окремо:

- абортований плід з оболонками (якщо він невеликий) або ж його шлунок, перев'язаний з обох боків, із вмістом, шматочки печінки та селезінки;
- проби молока в об'ємі 10–15 см³;
- вміст бурс в об'ємі 10–15 см³;
- від баранів при підозрі на інфекційний епідидиміт відбирають сім'яники з придатками,
- від вівцематок — абортівані плоди й виділення із родових шляхів;
- при діагностичному забої відбирають матку, надвименні, поверхневі тазові та інші лімфатичні вузли, селезінку;

Для зменшення контамінації матеріал потрібно відбирати дотримуючись правил асептики.

Щоб отримати вміст із гігром (бурс), вистригають шерсть, шкіру дезінфікують 70% спиртом, шприцом з голкою великого діаметра роблять

пункцію, відбирають вміст гігром (бурс), переносять у стерильну пробірку яка буде направлена для дослідження.

Щоб отримати молоко для дослідження, вим'я обмивають теплою водою, дійки дезінфікують 70% спиртом. З кожної долі беруть останні порції молока (10-15мл) в окремі стерильні ємності або пробірки. У овець та кіз проби молока відбирають пункцією з цистерни вимені, для цього тварину фіксують у боковому положенні, вим'я біля дійки протирають 70% спиртом. Стерильним шприцом з голкою роблять пункцію, набирають молоко та переносять у стерильну ємність або пробірку яка щільно закривається.

Патологічний матеріал, відібраний для дослідження на бруцельоз, транспортують до лабораторії відповідно до вимог чинних нормативно-правових актів України та міжнародних вимог щодо перевезення інфекційних матеріалів.

Зразки повинні бути герметично упаковані із застосуванням системи потрібної упаковки, що включає:

- 1) первинний герметичний контейнер із біологічним матеріалом;
- 2) вторинний герметичний контейнер із достатньою кількістю абсорбувального матеріалу;
- 3) зовнішню жорстку транспортну упаковку, яка забезпечує захист від механічних пошкоджень під час перевезення.

Зразки транспортують в охолодженому стані при температурі 2–8 °С. Якщо впродовж 24–30 год відібраний матеріал не можна доставити у лабораторію, його консервують 30% розчином стерильного хімічно чистого гліцерину. При цьому стежать, щоб консервант перевищував об'єм матеріалу у 4–5 разів.

Під час перевезень інфекційного матеріалу необхідно дотримуватися вимог Європейської угоди про міжнародне дорожнє перевезення небезпечних вантажів (ADR) та рекомендацій WOAH щодо пакування і транспортування діагностичних зразків [10, 13, 29, 30].

2.1.2. Бактеріологічний метод діагностики

Бактеріологічний метод діагностики бруцельозу включає три основні етапи: мікроскопію мазків, виділення культур бруцел та постановку біопроби (Рис. 1).

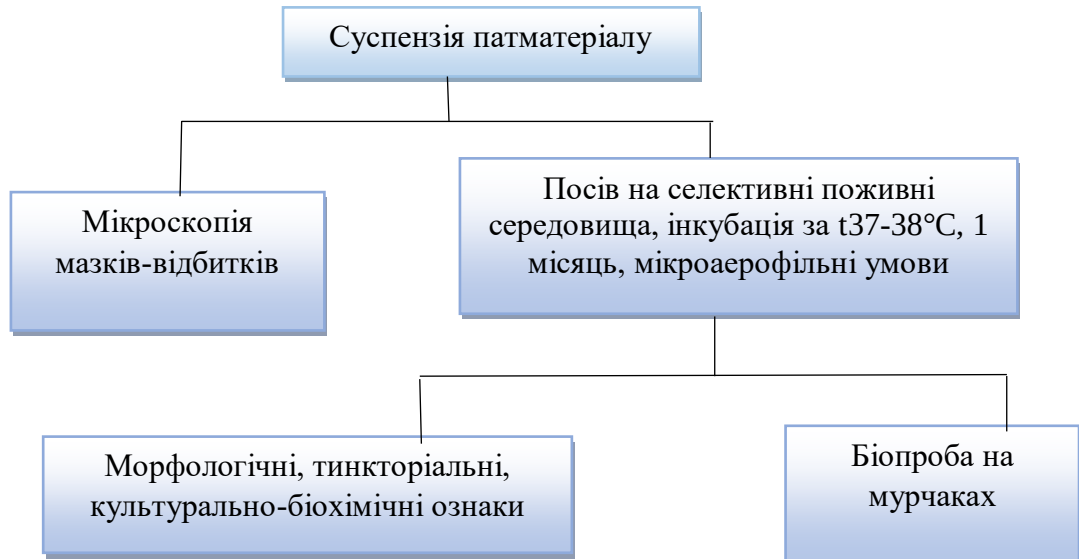


Рис. 1. Схема бактеріологічного дослідження бруцельозу

I. Мікроскопія мазків

З патологічного матеріалу роблять по 2 мазки з кожного об'єкту. При дослідженні абортіваних плодів мазки готують з вмісту шлунку, рідини черевної та грудної порожнини, печінки, селезінки, а також з котеледонів плодових оболонок. Рідкий матеріал наносять на предметне скло піпеткою або роблять мазки-відбитки з органів. Мазки висушують за кімнатної температури. Фіксують над полум'ям пальника, фарбують за Грамом та одним із наступних методів: Stamp (модифікований метод Ціль-Нільсена) (Рис. 2), Козловського (Рис 3), Шуляк-Шина (Додаток В).

При мікроскопії мазків враховують морфологію і колір бактерій. Бруцели мають вигляд дрібних, коротких, кулястих або паличкоподібних бактерій, які не утворюють спор і є грамнегативними [48] (Рис. 4).

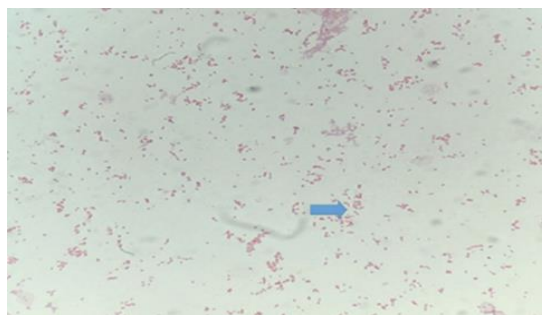


Рис. 2. Мазок пофарбований методом Stamp (модифікований метод Ціль-Нільсена)



Рис. 3. Мазок пофарбований методом Козловського

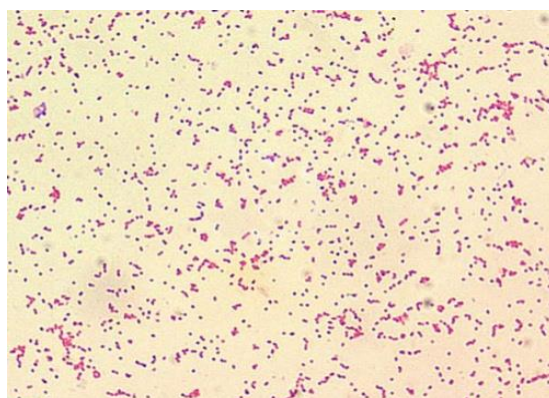


Рис. 4. Мазок пофарбований за Грамом

II. Культуральне виділення бактерій роду *Brucella*

Для виділення культур бруцел використовують комерційні середовища, такі як: еритрит агар, бруцела агар, бруцела бульйон, бульйон триптозний та інші; або середовища виготовлені в умовах лабораторій: м'ясо-пептонний печінковий бульйон (МППБ) або печінково-глюкозо-гліцериновий бульйон (ПГГБ), м'ясо-пептонний печінково-глюкозо-гліцериновий агар (МППГГА) чи печінково-глюкозо-гліцериновий агар (ПГГА), сироватково-декстрозний агар,

кров'яний агар (Додаток Г). Середовища розливають в пробірки за 1–2 доби до висіву матеріалу.

- ***Посів абортowanego плоду***

Перед посівом місце розтину протирають 70% розчином етилового спирту. Стерильними ножицями або скальпелем розтинають черевну та грудну стінки. Дотримуючись правил асептики проводять посів вмісту грудної та черевної порожнин на одну пробірку з рідким та на два різні агаризовані селективні середовища на вибір – по одній пробірці з кожним.

- ***Посів внутрішніх органів***

З печінки, селезінки вирізають шматочки розміром 2,0x1,5x2,0см, занурюють в 70% етиловий спирт, фламбують поверхню та розтирають в стерильній ступці з піском. Потім до гомогенізату додають рівний об'єм (1:1) стерильного фізіологічного розчину та продовжують гомогенізацію зразка. Після відстоювання гомогенізату продовж 5-10 хв проводять посів пастерівською піпеткою по 2 - 4 краплі на 1 пробірку рідкого та на два різні агаризовані селективні середовища на вибір - по одній пробірці з кожним.

Примітка: допускається посів матеріалу пастерівською піпеткою безпосередньо з органів дотримуючись правил асептики.

З кожного органу посів роблять на одну пробірку з рідким та 2 пробірки агаризованим селективними середовищами, з шлунку плоду – не менше як на дві пробірки з рідким та 10 пробірок з агаризованими селективними середовищами (по 5 пробірок на одне середовище).

- ***Посів з плаценти***

З плаценти вирізають шматочки змінених тканин з фіброзним або гнійним ексудатом, які занурюють у 3% розчин гідроокису калію на 30 хв., споліскують стерильним фізіологічним розчином та розтирають в стерильній ступці з стерильним піском. Посів проводять пастерівською петлею на чашки Петрі з середовищами, що містять бактеріостатичні речовини: генцианвіолет 1:200000/ 0,1см³ 0,5% спиртового розчину на 100 см³ середовища, кристалвіолет

1:100000, малахітовий зелений 1:200000, оцтовокислий натрій у розрахунку 0,125 мг на 1 см³ середовища.

- ***Посів вмісту бурс, гігром***

Пунктат висівають на 3-4 чашки Петрі з агаризованим середовищем, що містить бактеріостатичні речовини.

- ***Посів молока***

Зразки молока центрифугують 30 хв за 3000 об/хв. вершки та осад набирають пастерівською піпеткою та висівають по 0,1-0,2 см³ на 4 чашки Петрі з агаризованим середовищем, що містить бактеріостатичні речовини. Молоко консервоване генціанвіолетом висівають на тверді середовища без бактеріостатичних речовин.

Культивування. Після висіву дослідних зразків проводять культивування поживних середовищ за температури 37–38°C продовж 30 діб. Половину засіяних пробірок культивують в термостаті з наявністю вуглекислого газу (10–15%), а половину – за звичайних умов.

Перегляд первинних посівів проводять через 24–72 год, а потім кожні 3–4 дні. За відсутності росту, на 4 добу агаризоване середовище у пробірках зрошують конденсаційною рідиною, шляхом нахилення пробірок так, щоб рідина зросила край агаризованого косяка. За значного росту сторонньої мікрофлори ($\geq 80\%$) на засіяних пробірках, бактеріологічне дослідження припиняють.

При перегляді посівів звертають увагу на характер росту колоній мікроорганізмів. На поверхні агару на 4–7 добу бруцели утворюють дрібні блискучі, випуклі з рівними краями і гладкою поверхнею прозорі колонії, які мають у відсвіті голубуватий відтінок, а у проточному світлі – сірий. Згодом колонії мутніють і набувають більш темного кольору, що пов'язано з появою пігменту. У бульйонах бруцели утворюють рівномірне помутніння, іноді пристінкове кільце над рівнем бульйону та невеликий осад на дні пробірки [52]. За виявлення росту на рідких середовищах та відсутності росту на агарових, з

кожної пробірки готують мазки, які фарбують одним із вищезазначених методів та роблять пересів на чашку з твердим селективним середовищем для виділення чистої культури (Рис. 5–9). Пересіви на чашках культивують як зазначено вище.



Рис. 5. *Brucella melitensis* на кров'яному агарі

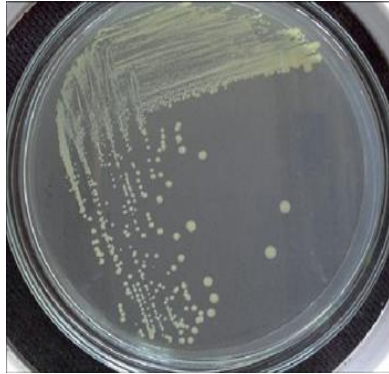


Рис. 6. *Brucella canis* на еритрит-агарі

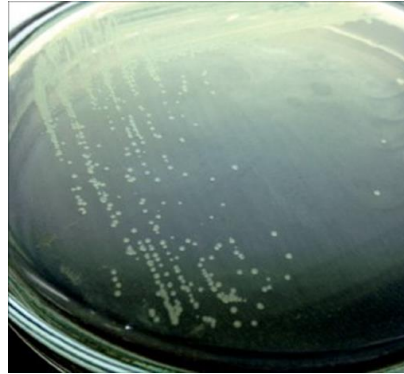


Рис. 7. *Brucella* на кров'яному агарі



Рис. 8. *Brucella* на МППА



Рис. 9. *Brucella* на агарі для бруцел

Виділені культури ідентифікують за культуральними властивостями (Додаток Д).

III. Постановка біопроби

Постановку біопроби на тваринах проводять згідно діючих на території України нормативних документів. Відповідно до Директиви 2010/63/ЄС, яка обмежує застосування біопроби на тваринах, цей метод слід застосовувати в крайніх випадках за відсутності альтернативних методів досліджень.

Біологічне дослідження проводять на мурчаках (не менше двох) масою по 350–400 г, попередньо перевірених на бруцельоз в РА з негативним результатом у розведенні сироватки 1:5.

Для постановки біологічної проби використовують ті ж проби матеріалу, що і для бактеріологічного дослідження.

З органів та вмісту шлунку абортів плоду готують суспензію на стерильному фізіологічному розчині у співвідношенні 1:10 та заражають мурчаків підшкірно з внутрішньої сторони стегна у дозі 1,0 см³.

З плаценти та плодових оболонок, підсушених стерильними тампонами, вирізають шматочки розміром 0,5х0,5 см, фламбують, розтирають із стерильним піском та заливають стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1:10. Одержаною суспензією заражають мурчаків у дозі 1,0 см³.

Вміст гігrom, бурс вводять мурчакам підшкірно в дозі 0,2–0,3 см³. При цьому можлива загибель мурчаків від супутньої мікрофлори, особливо часто від стрептококів.

Зразки молока центрифугують 30 хв за 3000 об/хв та заражають мурчаків підшкірно в дозі 2–3 см³ з верхнього шару (супернатант).

На 15-й, 25-й, та 40-й дні після зараження у мурчаків беруть кров 1–2 см³ з вени вуха або серця. Сироватку досліджують у РА в розведенні від 1:10 до 1:80.

При позитивній реакції аглютинації 1:10 і вище, мурчаків забивають та досліджують бактеріологічно. Посів роблять пастерівськими піпетками в 1 пробірку з бульйоном та 2 пробірки з агаром з лімфатичних вузлів (пахових, парапортальних, шийних), з селезінки, печінки та кісткового мозку. Посіви культивують за температури 37–38⁰С продовж 30 діб. Перегляд первинних посівів проводять через 24–72 год, а потім кожні 3–4 дні. За негативної РА у мурчаків у зазначенні строки біопробу визнають негативною. Мурчаків забивають та знезаражують шляхом автоклавування.

У разі виділення культур бруцел у посівах на живильних середовищах, біологічну пробу за даною експертизою припиняють, а заражених мурчаків знезаражують шляхом автоклавування.

Результати дослідження на бруцельоз вважають позитивними у разі виділення культури збудника або за позитивною РА у біопробі на мурчаках у розведенні сироватки крові 1:10 та вище, навіть якщо з первинних посівів культуру бруцел не виділено.

У разі одержання позитивних результатів бактеріоскопії і негативних – за бактеріологічного дослідження та у біопробі на мурчаках, матеріал вважають підозрілим на інфікованість збудником бруцельозу. Для встановлення діагнозу проводять додаткові дослідження (ПЛР).

- **Строк дослідження**

Бактеріологічний метод – до 1 місяця;

Біологічний метод – до 2-х місяців.

Весь матеріал після закінчення дослідження та отримання заключення знищують, про що оформляється акт утилізації.

2.2. Молекулярно-генетичні методи досліджень

Відповідно до рекомендацій ВООЗТ застосування ПЛР за діагностики бруцельозу, викликаного збудниками *B. melitensis*, *B. abortus* та *B. suis*, може бути ефективним для підтвердження клінічних випадків захворювання [31].

На сьогодні цей метод активно розвивається для діагностики бруцельозу як у людей, так і у тварин. Найбільш поширеними у цьому контексті є модифікації, що дозволяють ампліфікувати специфічні ділянки геному, характерні для роду, виду або біовару *Brucella spp.* [49].

Порівняно з класичною, ПЛР у реальному часі (англ. – real-time PCR) є швидшою та чутливішою, оскільки не потребує постампліфікаційного аналізу продуктів ампліфікації, що знижує ризик лабораторного контамінаційного забруднення та зменшує кількість хибно-позитивних результатів [43].

Незважаючи на високу ступінь гомології ДНК у межах роду *Brucella*, декілька молекулярних методи дозволяють диференціювати види та навіть біовари бруцел [46].

Перший мультиплексний ПЛР-тест, так званий AMOS-PCR, для видоспецифічної диференціації був описаний ще у 1994 році. Він базувався на видовій специфічності вставки IS711 у геномі *Brucella spp.* і включав п'ять олігонуклеотидних праймерів, здатних ідентифікувати *B. abortus* біоварів 1, 2 та 4, але не виявляв біовари 3, 5, 6 і 9. Надалі до методу було внесено вдосконалення, зокрема для виявлення вакцинних штамів *B. abortus* та інших біоварів і видів [36].

Іншим важливим мультиплексним ПЛР-тестом є Bruce-ladder, розроблений для швидкої одноетапної ідентифікації більшості видів бруцел, а також вакцинних штамів *B. abortus* S19, RB51 і *B. melitensis* Rev.1. На відміну від попередніх ПЛР-протоколів, цей метод також здатен виявити ДНК *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* і *B. ceti*. Оновлена версія цього методу – Bruce-ladder v2.0 – була валідована в декількох лабораторіях і дозволяє додатково диференціювати *B. suis* від *B. canis* і визначати *B. microti* [20].

Також був розроблений Suis-ladder – мультиплексний ПЛР-протокол, спрямований на швидку і точну ідентифікацію біоварів *B. suis* [26].

Альтернативні підходи включають методи на основі виявлення одонуклеотидного поліморфізму. Ці методи є швидкими, простими у виконанні та забезпечують високу специфічність [46].

Для поглибленого епізоотологічного аналізу також застосовується багатолокусне секвенування (MLST) [47] та аналіз VNTR-повторів або мультилокусний варіативний аналіз (MLVA) [42]. MLST ґрунтується на секвенуванні фрагментів кількох консервативних (housekeeping) генів і використовується для визначення еволюційних зв'язків між ізолятами та їх довгострокової популяційної структури. Натомість MLVA базується на аналізі кількості тандемних повторів (VNTR-локусів) у геномі, які характеризуються більшою мінливістю, що забезпечує вищу дискримінаційну здатність методу

при дослідженні близькоспоріднених ізолятів. Ці підходи дозволяють визначити не лише вид, а й прослідкувати джерела інфекції на рівні популяцій або навіть окремих спалахів.

Сучасні методи повного геномного секвенування (англ. – Whole Genome Sequencing, WGS) поступово впроваджуються як інструмент рутинного епідеміологічного нагляду. Методи аналізу, засновані на core-genome MLST (cgMLST), уже сьогодні забезпечують найвищий рівень епідеміологічної точності та дозволяють простежувати зв'язки між ізолятами на локальному й міжнародному рівнях.

Наразі комерційно доступні ПЛР набори у реальному часі для виявлення *Brucella spp.* та їх біоварів у різних біологічних зразках. Цей метод є швидким, однак на його ефективність сильно впливає якість проведення пробопідготовки. Таким чином, метод екстракції, який забезпечує високоякісний зразок ДНК, є критичним для використання ПЛР у реальному часі.

Всі етапи пробопідготовки та проведення реакції зазначені у настановах та листівках-вкладках до конкретних наборів.

2.2.1. Контроль якості досліджень ПЛР

Для забезпечення достовірності результатів кожна серія досліджень повинна включати відповідні контрольні зразки. Тому, до складу реакції рекомендується включати:

- 1) позитивний контроль ампліфікації – очищену ДНК *Brucella spp.* або контрольний матеріал, що містить цільову послідовність ДНК;
- 2) негативний контроль реакції (NTC) – воду або буфер без ДНК для контролю можливої контамінації реактивів;
- 3) негативний контроль екстракції – зразок, що проходить усі етапи виділення ДНК разом із дослідними пробами для контролю контамінації під час пробопідготовки;
- 4) внутрішній контроль екстракції (Internal Amplification Control, IAC) – екзогенну або ендогенну нуклеїнову кислоту, що додається до зразка до

початку екстракції або ампліфікується одночасно із цільовою ДНК для підтвердження ефективності виділення нуклеїнових кислот та виявлення інгібіторів ПЛР.

За відсутності ампліфікації внутрішнього контролю результати дослідження вважають недійсними, а дослідження повторюють після повторної екстракції ДНК або додаткового очищення зразка [5, 31].

2.2.2. Валідація ПЛР

ПЛР-методи, що застосовуються для лабораторної діагностики бруцельозу, повинні пройти аналітичну та діагностичну валідацію відповідно до рекомендацій ВООЗТ. Під час валідації оцінюють наступні показники:

- аналітичну чутливість (межу виявлення, LOD);
- аналітичну специфічність;
- діагностичну чутливість;
- діагностичну специфічність;
- повторюваність (repeatability);
- відтворюваність (reproducibility).

Для рутинної діагностики рекомендується використовувати лише валідовані методи або комерційні тест-системи, ефективність яких підтверджена виробником та незалежними випробуваннями [32].

2.2.3. Відбір патологічного матеріалу для ПЛР

Найбільш придатними зразками для молекулярної діагностики бруцельозу є:

- плацента (котиледони);
- печінка, селезінка та легені плода;
- вагінальні виділення після абортів;
- молоко;
- сперма;
- регіональні лімфатичні вузли;

- суглобова рідина або інші патологічні матеріали залежно від клінічної форми захворювання.

Найбільша концентрація збудника спостерігається у плаценті та плодових оболонках, тому саме ці зразки є пріоритетними для ПЛР-досліджень. Відбір матеріалу рекомендується проводити якомога швидше після абортів, бажано протягом перших 24–48 годин.

До лабораторії зразки транспортують охолодженими при температурі 2–8 °С. Якщо доставка займає більше 48 годин, допускається заморожування при –20 °С або –70 °С, якщо це не суперечить вимогам виробника тест-системи [31].

2.3. Серологічні методи досліджень

Відповідно до рекомендацій ВООЗТ, серологічними тестами, які використовуються для діагностики бруцельозу у сільськогосподарських тварин є Роз-Бенгал проба (РБП), реакція зв'язування комплементу (РЗК), флуоресцентно-поляризаційний аналіз (ФПА), імуноферментний аналіз (ІФА) та реакція аглютинації (РА). При цьому, жоден серологічний тест не є універсальним для всіх епізоотичних ситуацій або видів тварин. Усі вони мають певні обмеження, особливо у ході тестування окремих тварин. Під час вибору методу та інтерпретації результатів слід враховувати всі фактори, які впливають на його ефективність для конкретного діагностичного чи епідеміологічного завдання. Так, РА вважається малопридатною для цілей міжнародної торгівлі, РЗК є специфічнішою, ніж РА, але її результати можуть бути спотворені антикомплементажною активністю сироватки. У той же час, тест-системи ФПА та ІФА є більш чутливішими і специфічнішими та рекомендовані для моніторингу та контролю бруцельозу на національному і регіональному рівнях, проте постановка ФПА вимагає спеціального дороговартісного обладнання зі спеціалізованим програмним забезпеченням.

У разі одержання позитивного результату за одним чи кількома серологічними методами діагностики, зразки від тварини повинні бути

додатково протестовані бактеріологічними та/або молекулярно-генетичними методами [31].

2.3.1. РБП. Методика постановки. Інтерпретація результатів

РБП являє собою простий тест аглютинації з використанням антигену, забарвленого бенгальським рожевим та забуференого до низького рН, що становить $3,65 \pm 0,05$ [33].

Ця реакція є найпоширенішим скринінговим тестом, що застосовується для діагностики як у людей, так і у тварин. Його перевагами є простота виконання, швидкість і зручність інтерпретації результатів. Однак, як і інші скринінгові методи, РБП потребує підтвердження позитивних результатів за допомогою чутливіших тестів.

Компоненти реакції:

- **Антиген** – це інактивована стандартизована бактеріальна суспензія забарвлених бенгальським рожевим бруцел виду *B. abortus* зі штамів S99, або S1119-3 в буферному розчині. Застосовується у нерозведеному вигляді.
- **Позитивна бруцельозна сироватка** – сироватка ВРХ імунізованої інактивованим бактеріальним препаратом зі штаму 19, або S99, або S1119-3 виду *B. abortus*. Застосовується у нерозведеному вигляді.
- **Негативна сироватка** – сироватка від здорової ВРХ, яка не містить специфічних антитіл до збудників бруцельозу.
- **Фізіологічний розчин (0,85 %)** – хімічно чистий хлорид натрію у дистильованій воді з рН 7,0–7,2.

Обладнання:

- центрифуга з частотою обертання 3000 об./хв;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 20–100 мкл та накінечники до них;
- плексигласові або керамічні, або пластикові, або емальовані аглютинаційні пластини для постановки РБП;

- Шейкер-струшувач для аглютинаційних пластин.

Постановка РБП. Реакцію проводять відповідно до настанови та листівки-вкладки до набору.

Загальні принципи постановки відповідно до рекомендацій ВООЗТ.

1. Доводять позитивну, негативну та досліджувані сироватки, а також антиген до кімнатної температури ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$). Маркуємо лунки аглютинаційних пластин (номер досліджуваної сироватки, позитивний і негативний контроль, бланк). З холодильника слід виймати лише необхідну кількість антигену для проведення досліджень впродовж одного дня.

2. В лунки аглютинаційних пластин вносять по $0,025\text{--}0,03\text{ см}^3$ досліджуваних та контрольних сироваток.

Примітка! Необхідний об'єм внесення сироваток може відрізнятися, тому перед постановкою його потрібно уточнити у листівках-вкладках до набору. Наприклад, окремі виробники рекомендують вносити по $0,015\text{ см}^3$ сироваток за досліджень зразків від овець, кіз та оленів.

3. Ретельно перемішують антиген у флаконі і додають його до кожної краплі сироватки у рівній кількості.

Примітка! На кожну нову партію зразків проводимо перевірку чутливості. Для цього, у лунки першої аглютинаційної пластини крім досліджуваних проб вносимо позитивну та негативну сироватки. Окремі виробники рекомендують також проводити контроль антигену на спонтанну аглютинацію (до $0,03\text{ см}^3$ антигену додають $0,03\text{ см}^3$ фізіологічного розчину).

4. Після додавання антигену його ретельно змішують із сироваткою накінецьниками до автоматичних дозаторів, чистою скляною або пластиковою паличкою для кожного окремого зразка. У результаті має утворитися кругла або овальна зона змішування приблизно 2 см у діаметрі.

5. Аглютинаційну пластину поміщають на Шейкер-струшувач та коливають суміш впродовж 4 хвилин за кімнатної температури ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$).

Облік та інтерпретація результатів. Реакцію оцінюють безпосередньо після закінчення 4 хвилин інкубації. Будь-яка видима кольорова аглютинація у

вигляді дрібних або великих пластівців рожевого кольору, які чітко виділяються на білому тлі лунки, вважається позитивною реакцією.

За відсутності аглютинації (суміш однорідна, рівномірно профарбована) реакцію вважають негативною. Після обліку реакції пластинки дезінфікують зануренням на п'ять хвилин в 3% розчин фенолу або 1% розчин хлораміну, потім ретельно миють водопровідною водою, висушують і використовують повторно. У разі невираженої аглютинації проводять повторне дослідження зразка сироватки. За результатами повторного дослідження дають заключну оцінку реакції (позитивна або негативна).

2.3.2. РА. Методика постановки. Інтерпретація результатів

Принцип РА полягає у виявленні антитіл переважно класу IgM, спрямованих проти *Brucella spp.* При оптимальній концентрації антигену і антитіл утворюються великі комплекси антиген-антитіло, які випадають в осад на дні пробірки.

Ця реакція є повільною, оскільки, на відміну від швидких реакцій аглютинації, вимагає інкубації впродовж 16–20 год при 37–38°C. Головними недоліками вважається низька діагностична чутливість (близько 82 %), оскільки бруцельоз – це хронічне захворювання і у хворих переважають антитіла класу IgG, та застосування фенольного розчину, який є небезпечним для дихальних шляхів і шкірних покривів лабораторного персоналу. До того ж, можливе виникнення перехресних реакцій до збудників *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O116, *E. coli* O157, *Salmonella urbana* та *Yersinia enterocolitica* O:9 [39]. Наразі ця реакція рекомендується до застосування лише як додатковий метод діагностики. Вона не застосовується для діагностики бруцельозу у свиней.

Компоненти реакції:

- **Антиген** – це інактивована стандартизована бактеріальна суспензія бруцел виду *B. abortus* зі штамів S99 або S1119-3. Застосовується у титрі 1:10 на розчині хлориду натрію відповідної концентрації.

- **Позитивна бруцельозна сироватка** – сироватка ВРХ імунізованої інактивованим бактеріальним препаратом зі штаму 19, або S99, або S1119-3 виду *B. abortus*.
- **Негативна сироватка** – сироватка від здорової ВРХ, яка не містить специфічних антитіл до збудників бруцельозу.
- **Фенольний розчин хлориду натрію відповідної концентрації** – хімічно чистий хлорид натрію у дистильованій воді у концентраціях 0,85 % або 5 %, або 10% (залежно від досліджуваного виду тварин) з додаванням 0,5 % фенолу. Для приготування 0,85, 5 або 10%-розчинів натрію хлориду в 1000 см³ дистильованої води розчиняють при підігріванні відповідно 8,5, 50 або 100 г натрію хлориду і 5 г фенолу. Доводять рН розчину до 7,0–7,2 і фільтрують через паперовий фільтр.

Обладнання:

- центрифуга з частотою обертання 3000 об./хв;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 20–100 мкл, 100–1000 мкл та накінечники до них;
- скляні пробірки та штативи для них;
- термостат з підтриманням температури на 37–38 °С.

Постановка РА. ВООЗТ рекомендує проводити постановку в пробірках або в мікропланшетах. Суміш розведень антигену та сироватки слід інкубувати протягом 16–24 годин при температурі 37°C ± 2°C. Якщо постановка реакції проводиться в мікропланшетах, час інкубації можна скоротити до 6 годин [31].

За класичної постановки досліджувану сироватку розводять 0,5 % фенолізованим розчином хлориду натрію різних концентрацій:

- для ВРХ, коней, верблюдів, хутрових звірів та морських свинок – 0,85 %;
- для овець, кіз, буйволів – 5 %;
- для оленів – 10 % розчином хлориду натрію.

Для приготування фенолізованого 0,85%, 5%, 10% розчинів хлориду натрію необхідно:

1) 0,85% фенолізований хлорид натрію: на 1,0 л дистильованої води додати 8,5 г хлориду натрію та 5 г фенолу;

2) 5% фенолізований хлорид натрію: на 1,0 л дистильованої води додати 50 г хлориду натрію та 5 г фенолу;

3) 10% фенолізований хлорид натрію: на 1,0 л дистильованої води додати 100 г хлориду натрію та 5 г фенолу.

Ставиться у скляних пробірках в загальному об'ємі 1 см³ у чотирьох розведеннях:

- сироватку крові ДРХ, буйволів та оленів – 1:25, 1:50, 1:100 та 1:200;
- ВРХ, коней та верблюдів – 1:50, 1:100, 1:200 та 1:400;
- Хутрових звірів та морських свинок – 1:10, 1:20, 1:40 та 1:80.

За умови проведення масових досліджень РА ставлять у перших двох розведеннях.

1. Для дослідження кожної проби необхідно 5 пробірок. У першій пробірці готують основне розведення, для чого сироватку ВРХ, коней та верблюдів вносять в об'ємі 0,1 см³ та додають 2,4 см³ розчину хлориду натрію відповідної концентрації (титр сироватки 1:25).

Сироватку ДРХ, буйволів і оленів вносять по 0,2 см³ і додають 2,3 см³ розчину хлориду натрію відповідної концентрації (титр 1:12,5).

Сироватку хутрових звірів та морських свинок вносять по 0,3 см³ і додають 1,2 см³ розчину хлориду натрію відповідної концентрації (титр 1:5).

2. У третю, четверту та п'яту пробірки вносять по 0,5 см³ розчину хлориду натрію відповідної концентрації (у другу пробірку не вносимо). З першої пробірки переносять по 0,5 см³ основного розведення у другу та третю. У третій пробірці сироватку піпетують з хлоридом натрію та переносять по 0,5 см³ цього розведення у четверту пробірку, а з неї у п'яту. З п'ятої вилучають 0,5 см³ вмістимого.

3. До другої, третьої, четвертої та п'ятої пробірок додають по 0,5 см³ антигену, розведеного 1:10 фізіологічним (0,85%) розчином хлориду натрію. Таким чином розведення сироваток подвоюється і в залежності від виду

досліджуваних тварин буде відповідно становити 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 або 1:25, 1:50, 1:100 та 1:200 чи 1:10, 1:20, 1:40 та 1:80.

У першу пробірку антиген не вносять і він слугує контролем прозорості. За наявності помутніння у цій пробірці облік реакції аглютинації у досліджуваному зразку не проводять.

Примітка! У разі проведення масових досліджень сироватки вносять у дві пробірки по 0,02 і 0,01 см³ (ВРХ, коні і верблюди) або 0,04 і 0,02 см³ (ДРХ, буйволи та олені). Додають у кожну пробірку по 1,0 см³ антигену, розведеного відповідним розчином хлориду натрію в титрі 1:20. Кінцеві розведення сироваток становлять відповідно 1:50 і 1:100 або 1:25 і 1:50.

4. Постановка РА супроводжується наступними контролями антигену:

- з негативною сироваткою у тих же титрах, що і досліджувані;
- з позитивною сироваткою у розведеннях до граничного титру;
- з фізіологічним (0,85 %), 5 % або 10 % розчином хлориду натрію.

5. Штативи з пробірками збовтують та інкубують у термостаті за температури 37–38 °С впродовж 16–20 годин. Потім витримують за кімнатної температури одну годину.

Облік та інтерпретація результатів. Проводиться візуально і оцінюється в хрестах:

++++ (4 хрести) – повне просвітлення рідини, на дні пробірки «парасолька» аглютинату антигену, який за легкого збовтування руйнується на пластівці, а рідина залишається прозорою – 100 % аглютинації;

+++ (3 хрести) – неповне просвітлення рідини і добре виражений аглютинат бактерій – 75 % аглютинації;

++ (2 хрести) – часткове просвітлення рідини, аглютинат бактерій помірно виражений – 50 % аглютинації;

+ (1 хрест) – слабо виражене просвітлення рідини і аглютинат бактерій;

– (мінус) – рідина мутна, на дні пробірки осад бактерій у вигляді «гудзика», після легкого збовтування формується однорідна суміш.

За титр антитіл приймають останнє розведення сироватки, в якому спостерігається аглютинація не менше як на 2 хрести. За масових досліджень у двох розведеннях всі зразки, які дали аглютинацію з оцінкою не менше як на 2 хрести, досліджуються повторно у чотирьох розведеннях.

Реакція вважається позитивною з сироваткою крові ВРХ, коней та верблюдів, починаючи із розведення 1:100; ДРХ, буйволів та оленів – 1:50; хутрових звірів та морських свинок – 1:10. За титр антитіл приймають останнє розведення сироватки, в якому пройшла аглютинація не менше, як на 2 хрести, що відповідає кількості міжнародних одиниць (МО) антитіл в 1 см³ сироватки. Наприклад, якщо в розведенні сироватки 1:200 спостерігається аглютинація на 2, 3 або 4 хрести, а у наступному розведенні реакція відсутня, результат відповідатиме 200 МО.

Реакцію вважають сумнівною за аглютинації лише у розведенні 1:50 з сироватками крові ВРХ, коней та верблюдів і у розведенні 1:25 – ДРХ, буйволів та оленів з оцінкою не менше, як на два хрести. У таких випадках зразки від таких тварин повторно відбираються та досліджуються через 3–4 тижні [51].

2.3.3. РЗК. Методика постановки. Інтерпретація результатів

РЗК може бути використана для діагностики багатьох інфекційних захворювань з метою виявлення специфічних антитіл.

Застосування цієї реакції не виключає постановки інших методів діагностики, однак її цінність полягає у підтвердженні діагнозу у клінічно хворих тварин. Вона є референтним тестом, який рекомендований ВООЗТ для міжнародної торгівлі тваринами [31]. РЗК застосовують як підтверджувальний тест для виявлення інфекцій, спричинених *Brucella abortus*, *Brucella suis* та *Brucella melitensis*, завдяки високій чутливості та специфічності [8]. Однак, в Україні та інших країнах Європи і США постановка цієї реакції відрізняється. Так, у вітчизняних лабораторіях цю реакцію проводять із використанням скляних пробірок (класичний метод постановки), тоді як в інших країнах

реакцію здійснюють у 96-луночних полістиролових плашках з круглим дном (мікрометод РЗК) [31].

Серед недоліків РЗК виділяють можливі хибнонегативні результати на ранніх стадіях захворювання та трудосмність постановки. Додаткові проблеми включають неможливість постановки гемолізованих зразків сироватки, а також суб'єктивність у тлумаченні результатів реакції [25].

Принцип реакції. Як класичний метод, так і мікрометод РЗК належать до непрямих двосистемних імунологічних реакцій, що використовуються з метою діагностики (визначення в крові специфічних комплементзв'язуючих антитіл) із застосуванням відомого антигену до специфічних антитіл. На відміну від інших імунологічних реакцій, в РЗК відбувається взаємодія антитіла і антигена, за участі комплементу, який зв'язує антитіла (IgM, IgG) з антигеном.

В основі реакції лежать два процеси – бактеріоліз та гемоліз. Реакція ґрунтується на імунологічних принципах і відбувається за двома фазами:

1. Взаємодія антигену та антитіла за участю комплементу.
2. Виявлення ступеня зв'язування комплементу, що досягається додаванням гемолітичної системи.

Під час взаємодії імунної сироватки зі специфічним антигеном у присутності комплементу утворюється комплекс «антиген-антитіло». Якщо у дослідній сироватці специфічні антитіла відсутні, то комплекс «антиген-антитіло» не утворюється і комплемент залишається вільним.

Процес зв'язування комплементом антитіла з антигеном невидимий. Для того, щоб визначити, чи утворився цей комплекс, у реакцію, як індикатор, вводять гемолітичну систему. Якщо комплемент залишився вільним, то після додавання гемолітичної системи він переходить в останню і гемолізін спричинює гемоліз еритроцитів барана. Відсутність гемолізу буде свідчити про відсутність вільного комплементу, адже він у бактеріолітичній системі зв'язав антитіла з антигеном.

Постановку мікрометоду РЗК проводять відповідно до загальноприйнятих методик ВООЗТ [31]. У цих методичних вказівках описано класичну постановку РЗК.

Компоненти реакції.

- **Антиген** – це інактивована стандартизована бактеріальна суспензія бруцел виду *B. abortus* зі штамів S99 або S1119-3. Застосовується у робочому титрі, зазначеному виробником.
- **Комплемент** – сироватковий молекулярний комплекс (сироватковий протеїн), який може зв'язуватися з комплексом «антиген-антитіло». Застосовується у титрі, встановленому у день постановки реакції шляхом титрування в бактеріолітичній системі.
- **Гемолізін** – сироватка, одержана від гіперімунізованих кролів проти гетерологічних червоних кров'яних тілець (еритроцитів) барана з високим титром антитіл. Вона спричинює *in vitro* лізис еритроцитів за наявності комплекменту. Застосовується з робочим титром не нижче 1:500.
- **Позитивна бруцельозна сироватка** – сироватка ВРХ імунізованої інактивованим бактеріальним препаратом зі штаму 19, або S99, або S1119-3 виду *B. abortus*. Застосовується під час титрування комплекменту в бактеріолітичній системі та для контролю реакції в головному досліді після попередньої інактивації в день постановки реакції у розведенні 1:5 та 1:10 впродовж 30 хв за температури 62 °С.
- **Негативна сироватка** – сироватка від здорової ВРХ, яка не містить специфічних антитіл до збудників бруцельозу. Застосовується під час титрування комплекменту в бактеріолітичній системі та для контролю реакції в головному досліді після попередньої інактивації (розведення та інактивація ідентичні до позитивної сироватки).
- **2,5 % суспензія еритроцитів барана у фізіологічному розчині** – суспензія, яку застосовують сенсibilізованою. Для сенсibilізації гемолітичну систему (суміш робочого розведення гемолізину, яку додають до 2,5 % суспензії еритроцитів у рівних об'ємах) інкубують у водяній бані за

температури 37–38 °С впродовж 20 хв (методика підготовки еритроцитів до дослідження представлена у Додатку Е).

- **Фізіологічний розчин (0,85 %)** – хімічно чистий хлорид натрію у дистильованій воді з рН 7,0–7,2.

Обладнання та розхідні матеріали:

- центрифуга з частотою обертання 3000 об./хв;
- автоклав;
- водяна баня із автоматичним регулюванням температури на 30–70 °С;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл та накінечники до них;
- пробірки скляні серологічні та штативи для них;
- вортекс;
- фільтрувальний папір;
- маркер перманентний.

Перевірка на антикомплементарність та гемотоксичність. Робочі розведення всіх компонентів для РЗК готують перед постановкою реакції і перевіряють їх на антикомплементарність та гемотоксичність за схемою, наведеною у таблиці 2.

Таблиця 2

Схема контролю на антикомплементарність і гемотоксичність компонентів РЗК

Компоненти	Антикомпле- ментарність	Гемотоксичність			
		Комплемент	Гемолізін	Антиген	Фізіологічний розчин
	Пробірка 1	Пробірка 2	Пробірка 3	Пробірка 4	Пробірка 5
1	2	3	4	5	6
Фізіологічний р-н	-	0,6 см ³	0,6 см ³	0,4 см ³	0,8 см ³
Комплемент у розведенні 1:20	0,2 см ³	0,2 см ³	-	-	-
Гемолізін у робочому титрі	0,2 см ³	-	0,2 см ³	-	-

1	2	3	4	5	6
Антиген у робочому титрі	0,4 см ³	-	-	0,4 см ³	-
2,5 % суспензія еритроцитів	0,2 см ³	0,2 см ³	0,2 см ³	0,2 см ³	0,2 см ³
Водяна баня 10 хвилин за температури 37–38 °С					
Результат	Гемоліз	Повна затримка гемолізу			

Для дослідження використовують компоненти, які не володіють антикомплементарними та гемотоксичними властивостями.

Титрування компонентів. Під час постановки реакції необхідне точне дозування компонентів (гемолізін та комплемент), що досягається їх титруванням. Титрування гемолізіну проводять періодично 1 раз у три місяці, а також при використанні нової серії. Комплемент титрують при кожній постановці в бактеріолітичній системі, крім того, кожену нову серію комплементу додатково титрують у гемолітичній системі для визначення активності.

1. Титрування гемолізіну проводиться відповідно до листівки-вкладки. Для титрування беруть штатив з двома рядами пробірок. У першому ряду готують послідовні розведення гемолітичної сироватки, для чого із основного розведення гемолізіну 1:100 (0,1 см³ гемолізіну + 9,9 см³ фізіологічного розчину) роблять розведення 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:1100 і т.д. (таблиця 3).

Таблиця 3

Схема приготувань розведення гемолізіну

Компоненти	Номери пробірок та об'єм компонентів, см ³									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Фізіологічний розчин	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	2,2	2,4	2,6
Гемолізін (у розведенні 1:100)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Одержане розведення гемолізіну	1:500	1:600	1:700	1:800	1:900	1:1000	1:1100	1:1200	1:1300	1:1400

По 0,2 см³ кожного розведення гемолізіну, починаючи з найбільшого розведення переносять у відповідні пробірки другого ряду, на яких позначають ступінь розведення. До пробірок другого ряду також додають комплемент (застосовують в реакції у розведенні 1:20) по 0,2 см³ та суспензію еритроцитів барана – по 0,2 см³. Замість сироваток та антигену до пробірок вносять по 0,4 см³ фізіологічного розчину. Одночасно ставлять наступні контролю:

- гемолізін 1:100 (0,2 см³) із 2,5 % суспензією еритроцитів (0,2 см³) та фізіологічним розчином (0,6 см³) без додавання комплементу;
- комплемент 1:20 (0,2 см³) із 2,5 % суспензією еритроцитів (0,2 см³) та фізіологічним розчином (0,6 см³) без додавання гемолізіну;
- 2,5 % суспензія еритроцитів (0,2 см³) та фізіологічний розчин (0,8 см³) без додавання комплементу та гемолізіну.

Схема внесення компонентів представлена у таблиці 4.

Таблиця 4

Схема титрування гемолізіну

Компоненти	Об'єм компонентів, см ³										Номери контрольних пробірок		
	1:500	1:600	1:700	1:800	1:900	1:1000	1:1100	1:1200	1:1300	1:1400	1	2	3
Гемолізін	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—
Комплемент (у розведенні 1:20)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	0,2	—
Фізіологічний розчин	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,8
2,5% суспензія еритроцитів	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Пробірки з компонентами збовтують і поміщають у водяну баню за температури 37–38 °С на 10 хв і відразу проводять облік.

У всіх контролях не повинно бути гемолізу еритроцитів. Титром гемолізіну вважається найменша його кількість, що необхідна для повного

гемолізу 0,2 см³ суспензії еритроцитів за наявності комплементу в кількості 0,2 см³ у розведенні 1:20.

Для титрування комплементу та постановки головного досліду гемолізін застосовують у робочому титрі, який є двократною дозою порівняно з визначеним титром. Наприклад, якщо він складає 1:1000, то в реакції застосовується розведення 1:500.

2. Титрування комплементу в гемолітичній системі. Проводять з метою визначення активності комплементу при одержанні кожної нової серії. Для цього вміст флакону з ліофілізованим комплементом розчиняють до початкового об'єму, вказаного виробником. Потім, готують основне розведення комплементу у співвідношенні 1:20 (0,5 см³ комплементу + 9,5 см³ фізіологічного розчину) і вносять у пробірки з інтервалом 0,02 см³ в дозах 0,02 см³, 0,04 см³, 0,06 см³ і закінчуючи – 0,2 см³. Після цього, у кожну пробірку додають необхідну кількість фізіологічного розчину до загального об'єму 0,2 см³, а подальше внесення компонентів проводять за схемою, що представлена у таблиці 5.

Таблиця 5

Схема титрування комплементу у гемолітичній системі

Компоненти	Номери пробірок та об'єм компонентів, см ³									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент (у розведенні 1:20)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2
Фізіологічний розчин	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	-
Гемолітична система (2,5% суспензія еритроцитів та гемолізіну у робочому титрі)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Фізіол. розчин (замість антигену та сироваток)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня за 37–38 °С впродовж 10 хв										
Можливий результат	ЗГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Примітка: ЗГ – затримка гемолізу; ЧГ – частковий гемоліз; ПГ – повний гемоліз.

Одночасно ставлять три контролі:

- контроль еритроцитів – до $0,8 \text{ см}^3$ фізіологічного розчину додають $0,2 \text{ см}^3$ 2,5%-ої суспензії еритроцитів барана;
- контроль комплементу – до $0,2 \text{ см}^3$ комплементу в розведенні 1:20 додають $0,2 \text{ см}^3$ 2,5%-ої суспензії еритроцитів барана і $0,6 \text{ см}^3$ фізіологічного розчину;
- контроль гемолітичної сироватки – до $0,4 \text{ см}^3$ 2,5%-ої суспензії еритроцитів та гемолізіну у робочому титрі (у співвідношенні 1:1) і додають $0,6 \text{ см}^3$ фізіологічного розчину.

Титром комплементу у гемолітичній системі вважають найменшу його кількість, яка викликала повний гемоліз $0,2 \text{ см}^3$ суспензії еритроцитів за $37\text{--}38^\circ\text{C}$ впродовж 10 хв. У прикладі, наведеному в таблиці 5, титр комплементу у гемолітичній системі дорівнює 0,08.

Якщо титр комплементу в гемолітичній системі визначається у дозі $0,18 \text{ см}^3$ і вище (основне розведення 1:20), то титрування повторюють, користуючись основним розведенням комплементу 1:10.

3. Титрування комплементу в бактеріолітичній системі. Титрування проводять із контрольними позитивною бруцельозною (в розведенні 1:10) і негативною (в розведенні 1:5) сироватками крові. Також рекомендовано використовувати для титрування одну сироватку з досліджуваної партії в розведенні 1:5. Для цього, кожену сироватку розводять фізіологічним розчином до загального об'єму $5,0 \text{ см}^3$, а саме:

- позитивна сироватка – $4,5 \text{ см}^3$ фізіологічного розчину + $0,5 \text{ см}^3$ сироватки;
- негативна сироватка – $4,0 \text{ см}^3$ фізіологічного розчину + $1,0 \text{ см}^3$ сироватки.

Розведені позитивну (в титрі 1:10) та негативну (в титрі 1:5) сироватки інактивують впродовж 30 хв за температури 62°C .

Для титрування комплементу беруть два штативи (по одному для позитивної і негативної сироваток), у кожному з них по 2 ряди пробірок. Інактивовану сироватку вносять по $0,2 \text{ см}^3$. Комплемент розводять у співвідношенні 1:20 і вносять його у пробірки обох штативів у зростаючих дозах від $0,02 \text{ см}^3$ до $0,2 \text{ см}^3$ і відповідно

фізіологічний розчин до об'єму 0,2 см³ у пробірці. Після внесення комплементу у перший ряд пробірок з кожною сироваткою додають по 0,2 см³ антигену у робочому титрі, а у другий ряд – по 0,2 см³ фізіологічного розчину. Пробірки поміщають у водяну баню 37–38 °С на 20 хвилин. Схема внесення компонентів реакції показана у таблиці 6.

Таблиця 6

Схема титрування комплементу у бактеріолітичній системі

Компоненти реакції	Ряд пробірок у штативі	Номера пробірок та об'єм компонентів, см ³ (одержаний титр комплементу)									
		1 (0,02)	2 (0,04)	3 (0,06)	4 (0,08)	5 (0,1)	6 (0,12)	7 (0,14)	8 (0,16)	9 (0,18)	10 (0,2)
Позитивна (1:10)/ негативна (1:5) сироватка	перший	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	другий	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент у розведенні 1:20	перший	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2
	другий	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2
Фізіологічний розчин	перший	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	–
	другий	0,18	0,16	0,14	0,12	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	–
Антиген у робочому титрі	перший	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	другий	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Фізіологічний розчин (замість антигену)	перший	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	другий	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяна баня 37–38 °С – 20 хв											
Гемолітична система	перший	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	другий	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня 37–38 °С – 20 хв											
Можливий результат	перший	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
	другий	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Примітка: ЗГ – затримка гемолізу; ЧГ – частковий гемоліз; ПГ – повний гемоліз.

Проте, для більш точного дозування рекомендовано попередньо підготувати 10-ти кратні розведення комплементу в окремих пробірках. Для цього слід взяти додатковий ряд з 10 пробірок та внести розведений 1:20 комплемент в об'ємі 0,2; 0,4; 0,6 см³ і т.д. до 2 см³ та додати у кожну пробірку відповідний об'єм фізіологічного розчину до 2 см³, тобто 1,8; 1,6; 1,4 см³ і т.д. Потім з першої пробірки переносять по 0,2 см³ підготовлених розведень у перші пробірки із взятими для титрування сироватками, з другої пробірки відповідно у другі пробірки з сироватками і т.д. Схема проведення титрування комплементу у 10-кратних об'ємах наведена у таблиці 7.

Таблиця 7

Схема титрування комплементу в окремих пробірках у 10-кратних об'ємах

Компоненти	Номера пробірок та об'єм компонентів, см ³ (одержаний титр комплементу)									
	1 (0,02)	2 (0,04)	3 (0,06)	4 (0,08)	5 (0,1)	6 (0,12)	7 (0,14)	8 (0,16)	9 (0,18)	10 (0,2)
Фізіологічний розчин	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	–
Комплемент у розведенні 1:20	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2

Потім у всі пробірки вносять по 0,4 см³ гемолітичної системи, обережно збовтують вміст пробірок, похитуючи їх круговими рухами, та повторно інкубують у водяній бані 20 хвилин, після чого проводять облік реакції. Титром комплементу у бактеріолітичній системі вважається пробірка з найменшою його кількістю, яка призводить до повного гемолізу суспензії еритроцитів у пробірках з негативною або досліджуваною сироватками з антигеном і без антигену, а також затримки гемолізу у пробірках з бруцельозною сироваткою із антигеном.

Робочим титром комплементу для головного дослідження є титр на один інтервал вищий (тобто на 0,02 см³ більше). Наприклад, як наведено в таблиці 6, титр комплементу у бактеріолітичній системі складає 0,1, то в головний дослід береться значення 0,12.

Кількість нерозведеного (ліофілізованого) комплементу, необхідного для використання у головному досліді, визначають за наступною формулою:

$$X = \frac{A \times B}{20},$$

де X – кількість нерозведеного комплементу;

A – робочий титр комплементу;

B – кількість пробірок у головному досліді;

20 – розведення комплементу (1:20).

Наприклад, для дослідження 100 проб сироваток крові необхідно приготувати 20 см³ комплементу у робочому титрі з розрахунку 0,2 см³ на один зразок (100 × 0,2 см³ = 20 см³). Для визначення об'єму нерозведеного комплементу використовують вищенаведену формулу і за результатами розрахунку він становить 0,6 см³.

$$X = \frac{0,12 \times 100}{20} = 0,6 \text{ см}^3$$

Тому слід до 19,4 см³ фізіологічного розчину додати 0,6 см³ нерозведеного комплементу (20 см³ – 0,6 см³ = 19,4 см³).

Постановка головного досліді. Реакцію ставлять в загальному об'ємі 1,0 см³ всіх компонентів. Кожну дослідну сироватку досліджують у розведенні 1:5 та 1:10 з антигеном та 1:5 без антигену (контроль антикомплемента сироватки) після попередньої інактивації на водяній бані. Зразки від ВРХ та ДРХ інактивують за температури 60–62 °С впродовж 30 хвилин, від ослів та мулів – за 64–65 °С впродовж 30 хвилин, від буйволів – за 62–64 °С впродовж 30 хвилин, від зайців – 56 °С впродовж 30 хвилин, від свиней – за 60–62 °С впродовж 50 хвилин. Масові дослідження проводять у розведенні сироватки 1:5 тільки з антигеном.

Гемолізін застосовують у подвоєному титрі, визначеному при титрації. Комплемент застосовують у встановленому титрі (на 1 інтервал вищий від отриманого у бактеріолітичній системі). Час зв'язування комплементу в бактеріолітичній системі та подальший етап гемолізу становлять по 20 хв з інкубацією на водяній бані при температурі 37–38 °С.

Для дослідження проб сироватки у трьох пробірках у першу вносять 0,4 см³, у другу – 0,1 см³, у третю – 0,2 см³ фізіологічного розчину. У першу пробірку додають 0,1 см³ досліджуваної сироватки, що відповідає розведенню 1:5. Потім розведення із першої пробірки переносять у дві наступні пробірки: 0,1 см³ – у другу, що відповідає розведенню 1:10 та 0,2 см³ – у третю (відповідає розведенню 1:5, оскільки до цієї пробірки не буде додаватися антиген). Після термоінактивації сироваток вносять антиген (у перші дві пробірки) та комплемент, струшують і інкубують впродовж 20 хвилин за температури 37–38 °С. Після цього, до кожної пробірки додають по 0,4 см³ гемолітичної системи та повторно інкубують при тому ж режимі. У таблиці 8 наведено схему проведення головного досліді.

Таблиця 8

Схема внесення компонентів РЗК у головному досліді

Компоненти реакції	Об'єм компонентів, см ³					
	пробірка з досліджуваною сироваткою	контроль гемолітичної системи	пробірки з досліджуваною сироваткою			контроль гемолітичної системи
			1 1:5	2 1:10	3 (1:5 б/Аг)	
Фізіологічний розчин	0,16	0,6	0,4	0,1	0,2	0,6
Досліджувана сироватка крові	0,04	–	0,1	0,1 (з 1-ої пробірки)	0,2 (з 1-ої пробірки)	–
Водяна баня з метою інактивації сироватки						
Антиген у робочому титрі	0,2	–	0,2	0,2	–	–
Комплемент у робочому титрі	0,2	–	0,2	0,2	0,2	–
Водяна баня 37–38 °С – 20 хв						
Гемолітична система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяна баня 37–38 °С – 20 хв						

Примітка: б/Аг – безантигенний ряд (до пробірок третього ряду не вноситься антиген).

Під час постановки головного досліджу ставлять контролю:

- негативної та позитивної сироваток у розведеннях 1:5 та 1:10 (з антигеном та 1:5 без антигену;

- гемолітичної системи (0,6 см³ фізіологічного розчину + 0,4 см³ гемолітичної системи) (таблиця 8).

Облік та інтерпретація результатів. Облік проводиться візуально двічі: перший раз – відразу після закінчення інкубації штативів у водяній бані; другий раз – через 14–18 год зберігання штативів за умов холодильника.

Відсоток гемолізу виражають у хрестах:

++++ (4 хрести) – відсутність гемолізу (через 14–18 год зберігання надосадова рідина прозора, на дні пробірки інтенсивний осад у вигляді великого гудзика);

+++ (3 хрести) – гемоліз 25 % еритроцитів (за зберігання надосадова рідина блідо-рожевого кольору, на дні осад у вигляді гудзика);

++ (2 хрести) – гемоліз 50 % еритроцитів (за зберігання надосадова рідина рожевого кольору, на дні осад у вигляді гудзика);

+ (1 хрест) – гемоліз 75 % еритроцитів (за зберігання надосадова рідина рожевого кольору, на дні незначний осад у вигляді нечіткого гудзика);

(мінус) – повний гемоліз еритроцитів, осад відсутній.

Реакцію вважають позитивною у разі затримки гемолізу еритроцитів на 2–4 хрести у одному або у двох розведеннях сироватки (1:5; 1:10) за умов відсутності антикомплементарних властивостей дослідної проби (1:5 без антигену) та коректного спрацьовування контролів. У випадку затримки гемолізу на 1 хрест у розведенні сироватки 1:5 реакцію вважають сумнівною. Негативна – повний гемоліз еритроцитів в обох розведеннях сироватки.

За умови одержання сумнівного результату – сироватку крові від тварин повторно відбирають та досліджують через 15–30 днів [51].

Результати дослідження виражають словами: «позитивно», «сумнівно», «негативно» з оцінкою розведення у хрестах (Наприклад, «позитивно 1:10++»; «сумнівно 1:5+»; «негативно»)

Для полегшення інтерпретації результатів реакції рекомендовано готувати стандарти гемолізу від 25 до 100% (таблиця 9).

Таблиця 9

Виготовлення стандартів для визначення відсотка гемолізу

№ пробірки	1	2	3	4	5
Фізіологічний розчин, см ³	1,0	0,75	0,5	0,25	–
Гемолізована рідина*, см ³	–	0,25	0,5	0,75	1,0
% гемолізу (хрести)	100 (–)	75 (+)	50 (++)	25 (+++)	0 (++++)

*Примітка: готують із вмістимого пробірок з повним гемолізом (наприклад, негативного контролю)

Ступінь гемолізу в пробірках з досліджуваними сироватками визначають порівняно з гемолізом у пробірках шкали.

2.3.4. ФПА. Методика постановки. Інтерпретація результатів

Флуоресцентно-поляризаційний аналіз дозволяє швидко виявляти взаємодію антигену з антитілом. Це гомогенний метод, за постановки якого компоненти не розділяються. Проте, на відміну від інших експрес-методів діагностики (наприклад, РБТ), для кожного зразка перед додаванням антигену необхідно виконати попереднє зчитування фону / бланку. Таким чином, ФПА – це двоетапний аналіз. Через дорогу вартість наборів цей метод застосовується головним чином у референсних лабораторіях переважно з науковою метою.

Для діагностики бруцельозу використовується фрагмент з невеликою молекулярною масою (в середньому 22 кДа) ОПС (О-полісахаридний ліпополісахарид) штаму *Brucella abortus* 1119-3, мічений ізотіюціанатом флуоресцеїну (FITC), як антиген. Після проведення фонових / бланкових вимірювань (2–3 хвилини), цей антиген додають до розведеної сироватки, і вже приблизно через 2 хвилини після додавання антигену вміст антитіл визначається за допомогою флуоресцентного поляризаційного аналізатора (FPM) [34].

Компоненти реакції.

- **Антиген** – фрагмент з невеликою молекулярною масою (в середньому 22 кДа) ОПС (О-полісахаридний ліпополісахарид) штаму *Brucella abortus* 1119-3, мічений ізотіоціанатом флуоресцеїну (FITC).
- **Сильно позитивна, слабо позитивна та негативна сироватки** – контрольні сироватки, стандартизовані відповідно до референтних сироваток WOAH.
- **Трис буфер (0,01M)** – 1,21 г трису амінометану, 0,15 М хлориду натрію (8,5 г), 0,05% ігепалу СА630 (500 мкл), 10 мМ ЕДТА (3,73 г) на 1 літр очищеної дистильованої води з рН 7,0–7,4.

Обладнання.

- Центрифуга з частотою обертання 3000 об./хв;
- автоклав;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл та накірники до них;
- скляні пробірки та штативи для них або полістеролові планшети на 96 лунок;
- вортекс;
- флуоресцентний поляризаційний аналізатор.

Постановка ФПА. Реакцію проводять відповідно до настанови та листівки-вкладки до набору. ВООЗТ рекомендує проводити постановку в пробірках або в мікропланшетах.

Загальні принципи постановки відповідно до рекомендацій ВООЗТ.

1. Сироватку ВРХ розводять у співвідношенні 1:10 для планшетного методу або 1:100 для пробіркового. Сироватку овець, кіз і свиней розводять 1:10 для планшетного методу або 1:25 (кози та свині) і 1:40 (вівці) – для пробіркового. Розведення готують із застосуванням 0,01М трис буферу.

2. Спочатку проводять зчитування розсіювання світла за допомогою FPM після змішування. Далі додають мічений титрований антиген, перемішують, і

приблизно через 2 хвилини проводять друге зчитування за допомогою флуоресцентного поляризаційного аналізатора.

Облік та інтерпретація результатів. Показник у міліполяризаційних одиницях (mP), що перевищує встановлений пороговий рівень, свідчить про позитивну реакцію. Типовий пороговий рівень складає 90–100 mP, однак тест слід стандартизувати локально з використанням відповідних референтних сироваток WOAH.

Примітка! До кожної серії тестів мають входити сильно позитивна, слабо позитивна та негативна робочі контрольні сироватки, стандартизовані відповідно до референтних сироваток WOAH [31].

2.3.5. ІФА. Методика постановки. Інтерпретація результатів

ІФА набув широкої популярності як загальноприйнятий діагностичний метод за багатьох інфекційних захворювань, у тому числі і бруцельозу. Він володіє високими діагностичними чутливістю та специфічністю, дозволяє розрізняти гостру та хронічну форми захворювання, а також застосовується для скринінгу великих популяцій тварин щодо наявності антитіл до збудників бруцельозу. Нині, за допомогою ІФА можна виявити всі чотири типи антитіл (IgG1, IgG2, IgA та IgM), що мають діагностичну цінність за бруцельозу [12].

Принцип методу. На сьогодні розроблена та комерційно доступна низка імуноферментних тест-систем. Їх принцип базується на взаємодії антигена із антитілом у лунках спеціальних полістиролових планшетів з подальшим ферментативним виявленням утвореного специфічного імунного комплексу за допомогою ферментного субстрату. Для діагностики бруцельозу застосовуються непрямий та конкурентний варіанти ІФА.

Непрямий ІФА (I-ELISA) одержав свою назву через те, що виявлення антитіл відбувається не напряду, а через застосування мічених антитіл другого порядку. Суть полягає у тому, що до лунок планшету із сорбованим антигеном додають досліджувані зразки і, якщо вони містять антитіла, утворений комплекс після інкубації та відмивання зв'язується із антитілами другого

порядку (містяться в кон'югаті), які асоційовані з ферментною міткою (пероксидаза хрому). Утворений комплекс за рахунок ферменту окиснює бензидин, що міститься у ферментному субстраті. На певному етапі ферментативну реакцію зупиняють шляхом додавання стоп-реактиву і проводять облік реакції на ридері. У випадку відсутності специфічних антитіл у досліджуваних зразках, ферментативна реакція не запускається.

Конкурентний ІФА (C-ELISA) є подібним, але у кон'югаті замість антитіл другого порядку містяться специфічні антитіла (такої ж природи, як і у досліджуваних пробах), які мічені ферментом. Тому, у випадку наявності антитіл у досліджуваному зразку, вони утворюють комплекси з антигеном у лунках і при додаванні кон'югату мічені антитіла відповідно не зв'язуються з сорбованим антигеном і ферментна реакція відсутня. Тому позитивні контролю і проби мають низькі значення ОГ. І навпаки, якщо проби не містять специфічних антитіл (є негативними), то з сорбованим антигеном зв'язуються мічені антитіла кон'югату і показники ОГ є високими.

Метод одержав назву через конкуренцію між антитілами із зразків та кон'югату за зв'язування із антигеном. У випадку наявності специфічних антитіл у досліджуваних зразках, ферментативна реакція не запускається.

Необхідні реактиви та обладнання для проведення аналізу.

- набір діагностичної імуоферментної тест-системи;
- деіонізована або дистильована вода;
- розчин етилового спирту (70 %);
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- одноканальні дозатори з перемінним об'ємом на 1–20 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл та накінечники до них;
- багатоканальні дозатори (8 – або 12 – каналні) з перемінним об'ємом на 50–300 мкл та накінечники до них;
- мірні циліндри та стакани;
- ванночки для реагентів;

- мікропробірки для попереднього розведення сироваток (за необхідності);
- термостат, з температурою $21\pm 5^{\circ}\text{C}$ або $+37^{\circ}\text{C}$ (залежно від необхідних умов інкубації);
- вошер для промивання мікропланшетів;
- 96-луночний електрофотометр (імуноферментний аналізатор) з довжиною хвилі 450–620 нм;
- вортекс;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливання відпрацьованих забруднених рідин (деякі компоненти реакції є канцерогенами, тому їхні залишки необхідно обережно відбирати в контейнери для утилізації).

Підготовка до проведення дослідження. Перед початком роботи всі компоненти набору та зразки сироваток крові необхідно довести до кімнатної температури ($20\text{--}25^{\circ}\text{C}$). Після цього реагенти ретельно збовтати до однорідності за допомогою вортекса або обертальними рухами, перевертаючи вміст флаконів.

У таблицю, секції якої відповідають номерам лунок мікропланшетів, вноситься нумерація досліджуваних проб. У таблиці 10 наведено приклад такого внесення за досліджень 92 зразків та 4 контролів.

Таблиця 10

**Приклад внесення нумерації досліджуваних
зразків перед постановкою ІФА**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K-	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
B	K-	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
C	K+	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
D	K+	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
E	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
F	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
G	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
H	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92

Примітка: K- – негативний контроль; K+ – позитивний контроль; 1–92 – досліджувані зразки.

Всі реагенти, необхідні для проведення ІФА потрібно готувати у ході постановки, щоб мінімізувати їхній контакт зі світлом та повітрям приміщення, враховуючи необхідний об'єм для кількості досліджуваних зразків.

Правила, яких необхідно дотримуватися під час проведення досліджень методом ІФА.

1. Не використовувати для постановки реакції реагенти, у яких закінчився термін придатності або реагенти з інших тест-наборів.

2. Під час проведення досліджень використовувати засоби індивідуального захисту (одноразові рукавички, халати тощо), оскільки деякі реагенти у своєму складі містять токсичні сполуки (хромоген) та кислоти (стоп-реактив).

3. Для роботи бажано використовувати одноразовий посуд для усунення сторонніх фонових реакцій, адже ферментативна реакція дуже чутлива до домішок, особливо, до металів. Відповідно, металеві предмети не повинні контактувати з розчинами реактивів.

4. Не допускати підсихання лунок мікропланшету на всіх етапах постановки ІФА.

5. Всі компоненти реакції необхідно вносити в центр лунки мікропланшету, щоб попередити потрапляння реагентів на його поверхню або навколо лунок.

6. Для внесення реагентів та сироваток необхідно використовувати одноразові накінечники.

7. Необхідно звести до мінімуму контакт розчину хромогену зі світлом та повітрям приміщення для уникнення його окиснення.

8. По завершенню роботи всі використані матеріали слід зібрати у спеціальний контейнер та знешкодити автоклавуванням впродовж 1 год за температури 121°C. Обладнання та робочі поверхні обробити 70% розчином етилового спирту [50].

Проведення дослідження. Постановка тест-систем ІФА, облік та інтерпретація одержаних результатів проводиться згідно настанов та листівок-вкладок до наборів і включає наступні загальні етапи:

1. Внесення у лунки із сорбованим антигеном досліджуваних проб, а також негативного та позитивного контролів з послідуною інкубацією.

Примітка: досліджувані зразки та контролі (за необхідності) розводяться спеціальними буферними розчинами, що входять до тест-наборів згідно листівок-вкладок (англ. *Dilution buffer*).

2. Відмивання лунок від антитіл та антигенів, що не утворили імунний комплекс із застосуванням спеціального буфера, що містить детергент (поверхнево-активну речовину) (англ. *Wash solution*).

Примітка: розчин для відмивання лунок мікропланшету готується із концентрату, що входить до набору тест-системи згідно листівки-вкладки до неї.

3. Внесення розчину кон'югату (вторинні антитіла, або антитіла 2-го порядку, кон'юговані з ферментом (АТ II)) (англ. *Conjugate*) та послідуона інкубація.

Примітка: розчин кон'югату готується із концентрату, що входить до набору тест-системи згідно листівки-вкладки до неї (англ. *Concentrated conjugate*) або може бути готовим до використання.

4. Повторне відмивання лунок із застосуванням спеціального буфера (англ. *Wash solution*).

5. Додавання проявника (субстрату-хромогену чи ферментного субстрату) (англ. *Chromogen solution* або *Substrate solution*).

6. Зупинення ферментативної реакції стоп-реактивом.

Облік та інтерпретація результатів. Детекція утвореного продукту шляхом вимірювання оптичної густини вмісту лунок мікропланшету на спектрофотометрі за довжини хвилі, що зазначена у листівці-вкладці до набору.

2.4. Методи досліджень антитіл у молоці

Ефективним методом скринінгу молочних стад є дослідження збірного (резервуарного) молока. Відповідно до рекомендацій ВООЗТ, у разі одержання позитивного результату, необхідно додатково провести серологічне дослідження крові від всіх корів, від яких відбиралося молоко у пул. ІФА для молока є чутливим і специфічним тестом, який особливо цінний для обстеження великих стад. Якщо цей метод недоступний, альтернативою може бути кільцева реакція з молоком. Проте, вона володіє низькою чутливістю та специфічністю і є непридатною для дослідження молока від дрібної рогатої худоби [31]. У разі виявлення позитивно реагуючих тварин серологічно, необхідно провести бактеріологічне та/або молекулярно-генетичне дослідження для підтвердження діагнозу.

2.4.1. ІФА

Як і у випадку з ІФА для сироваток крові, існує багато варіацій тест-систем для досліджень молока. На ринку доступні кілька комерційних тест-систем ІФА, які пройшли валідацію у великих польових дослідженнях і широко застосовуються. З метою міжнародної гармонізації три стандартні сироватки ІФА від WOAH мають використовуватися національними референс-лабораторіями для перевірки або стандартизації конкретного тесту для ВРХ.

Стандартизація ІФА для виявлення антитіл у молоці ВРХ

проводиться таким чином, щоб сильнопозитивна стандартна сироватка WOAH для ELISA, розведена 1/125 у негативній сироватці та далі розведена 1/10 у негативному молоці, стабільно давала позитивний результат [11].

Зразки молока із резервуара зазвичай тестуються у значно нижчих розведеннях, ніж сироватка – від нерозведених до 1/2 чи 1/10 у буфері для розведення; решта етапів тесту аналогічна процедурі для сироватки. Варто зазначити, що хибнопозитивні реакції зазвичай відмічаються рідше, ніж за досліджень сироваток крові.

ІФА для виявлення антитіл до бруцел у молоці овець або кіз загалом виконується так само, як і для ВРХ, однак поріг позитивності повинен бути правильно встановлений для кожного виду за допомогою відповідних методів валідації. Наразі не існує міжнародних рекомендацій щодо стандартизації таких тест-систем для ДРХ на основі Міжнародної стандартної антисироватки проти *Brucella melitensis* (ISaBmS).

Необхідні матеріали та обладнання, а також методика постановки описані у пункті 2.3.5. цих методичних вказівок.

2.4.2. Кільцева реакція з молоком

КР з молоком є скринінговим тестом для молочних стад. Методика є простою, проте вона обмежена лише використанням з коров'ячим молоком [16].

Принцип методу. Суть полягає у змішуванні забарвленого цілюноклітинного антигену бруцели (штам S99 або S1119-3) зі свіжим молоком у пробірці. У присутності специфічних антитіл утворюються комплекси антиген-антитіло, які мігрують до поверхневого шару, утворюючи на поверхні фіолетове кільце.

Для цього у скляній або пластиковій пробірці змішують краплю антигену, забарвленого гематоксилином, і невелику кількість молока [35].

Відповідно до даних ВООЗТ у великих стадах (> 100 лактуючих корів) чутливість реакції стає меншою. Реакція може бути скоригована для компенсації фактора розведення в пробах об'єднаного молока з великих стад. Об'єм зразка регулюється за наступною формулою: для стада менш як 150 тварин використовують 1 см³ об'єднаного молока; для 150–450 тварин – 2 см³; для 451–700 тварин — 3 см³ молока.

Постановка реакції не потребує застосування додаткового обладнання, крім пластикових або скляних пробірок. З реактивів необхідний лише специфічний антиген, забарвлений гематоксилином.

Загальні принципи постановки та інтерпретації одержаних результатів відповідно до рекомендацій ВООЗТ.

Дослідження проводиться на зразках об'єднаного молока. За потреби зразки можуть бути попередньо оброблені консервантом (0,1% формалін або 0,02% бромпол) протягом 2–3 днів за температури $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ до використання.

1. Довести зразки молока та антиген до кімнатної температури ($22^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$); з холодильника слід діставати лише необхідну кількість антигену на день дослідження.

2. Обережно збовтати флакон із антигеном.

3. Додати 30–50 мкл антигену до 1–2 см³ цільного молока (об'єм молока може бути збільшено для об'ємних зразків від великих стад).

4. Висота стовпчика молока у пробірці повинна становити 20–25 мм. Досліджувані зразки не повинні бути заморожені, нагріті, інтенсивно струшені чи зберігатися понад 72 години.

5. Суміш молока і антигену інкубують за температури $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 1 год разом із позитивними та негативними контрольними зразками. Проте інкубація впродовж ночі за температури $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ підвищує чутливість тесту та полегшує зчитування результату.

6. Сильнопозитивна реакція проявляється утворенням темно-синього кільця над білим стовпчиком молока. Будь-яке синє забарвлення на межі між вершками і молоком вважається позитивною реакцією, особливо для великих стад.

7. Результат вважається негативним, якщо забарвлення нижнього шару молока інтенсивніше, ніж вершкового (поверхневого) шару.

8. Якщо реакція коригується для великих стад (використовується 2 або 3 см³ молока), до пробірки додають 0,1 см³ об'єднаних негативних вершків, а потім – 30–50 мкл кільцевого тест-антигену. Після перемішування пробірку інкубують і зчитують результат так само, як і у стандартній реакції. Негативні вершки збирають шляхом сепарації об'єднаного непастеризованого молока від стада, вільного від бруцельозу, чисельністю щонайменше 25 корів.

2.5. Методи досліджень клітинного імунітету

2.5.1. Шкірний тест на бруцельоз

Шкірна проба з бруцеліном є альтернативним імунологічним методом, що може використовуватись для скринінгу невакцинованих стад за умови використання очищеного (вільного від S-LPS) і стандартизованого антигенного препарату. Ця проба має дуже високу специфічність, тому серонегативних невакцинованих тварин, які дають позитивну реакцію на бруцелін, слід вважати інфікованими [40]. Відповідно до даних ВООЗТ цей тест також характеризується високою чутливістю для діагностики інфекції *B. melitensis* у дрібної рогатої худоби і, за відсутності вакцинації, вважається одним з найспецифічніших діагностичних тестів [31].

Бруцелін був розроблений для використання у жуйних, але також ефективний для підтвердження хвороби на рівні стада у свиней. Польові випробування показали його добру чутливість у свиней, інфікованих бруцельозом [9]. Крім того, результати цього тесту можуть допомогти в інтерпретації серологічних реакцій, які вважаються хибнопозитивними через інфекції збудниками, що перехресно реагують, оскільки тварини з хибнопозитивними реакціями завжди дають негативний результат у шкірній пробі [9, 40]. Попередні дослідження свідчать, що бруцелін може використовуватись як підтверджувальний тест у верблюдів [22].

Проте, не всі інфіковані тварини реагують на тест, отже, він не може бути рекомендований як індивідуальний діагностичний метод або для цілей міжнародної торгівлі. Слабка чутливість (залежність від фізіологічного стану тварини, імунного статусу тощо) робить його лише допоміжним методом у комплексній діагностиці бруцельозу.

Принцип методу. Ін'єкція бруцеліну, білкового екстракту штаму бруцел, супроводжується місцевою запальною реакцією у сенсibiliзованої тварини. Ця реакція гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) вимірюється збільшенням товщини шкіри в місці введення.

Процедура тесту у ВРХ (рекомендації ВООЗТ).

1. Об'єм 0,1 см³ бруцеліну (2000 ОД/см³) вводиться внутрішньошкірно у підхвостову складку, шкіру на боці тулуба або на шії.
2. Результат оцінюється через 48–72 години.
3. Товщина шкіри у місці ін'єкції вимірюється штангенциркулем до ін'єкції та під час повторного огляду.
4. Сильна позитивна реакція легко розпізнається за місцевим набряком і ущільненням. Граничні реакції потребують уважної інтерпретації. Потовщення шкіри на 1,5–2 мм вважається позитивною реакцією.

Процедура тесту у ДРХ (рекомендації ВООЗТ).

1. Об'єм 0,1 см³ бруцеліну (2000 ОД/см³) вводиться внутрішньошкірно у нижню повіку.
2. Результат оцінюється через 48 годин.
3. Будь-яка видима або пальпована реакція гіперчутливості, така як набрякова реакція з підняттям шкіри або потовщенням повіки (≥ 2 мм), розцінюється як позитивна.

Процедура тесту у свиней (рекомендації ВООЗТ).

1. Як діагностичний засіб у свиней 0,1 см³ алергену (2000 ОД/см³) вводять внутрішньошкірно у шкіру біля основи вуха або, бажано, біля основи хвоста. Останній варіант вважається практичнішим і менш травматичним.
2. Реакція оцінюється шляхом візуального огляду та пальпації місця ін'єкції через 48 годин.
3. Позитивною реакцією вважається еритема непігментованої шкіри та набряк. В окремих випадках можуть бути також геморагії або некроз [31].

2.5.2. Гамма-інтерферон тест

Тест на вивільнення гамма-інтерферону (IGRA) полягає у стимуляції лімфоцитів у цільній крові відповідним антигеном (бруцеліном). Утворення гамма-інтерферону у відповідь на сенсibiлізацію, виявляється за допомогою імуноферментного аналізу.

В перспективі цей тест може бути корисним для диференціації позитивних на бруцельоз та хибнопозитивних серологічних реакцій, однак досі необхідні більш специфічні антигени, а також необхідно стандартизувати протокол і провести його належну валідацію для різних видів тварин і епідеміологічних умов. На даний момент повністю валідований протокол відсутній [31].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Alton G. G. Techniques for the Brucellosis Laboratory / G. G. Alton [et al.] // Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. – 1988.
2. Bahmani N. A review of brucellosis in the Middle East and control of animal brucellosis in an Iranian experience / N. Bahmani, A. Bahmani // Reviews and Research in Medical Microbiology. – 2022. – Vol. 33(1). P. 63–69.
3. Brangsch H. Genotypic peculiarities of a human brucellosis case caused by *Brucella suis* biovar 5 / H. Brangsch, M. A. Horstkotte, F. Melzer // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13(1). – 16586.
4. Brucellosis in Humans and Animals. – Geneva: World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Organisation for Animal Health, 2006. – 102 p.
5. Bustin S. A. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments / S. A. Bustin, V. Benes, J. A. Garson // Clinical Chemistry. – 2009. – Vol. 55(4). – P. 611–622.
6. Cárdenas L. Characterization and evolution of countries affected by bovine brucellosis (1996–2014) / L. Cárdenas [et al.] // Transboundary and Emerging Diseases. – 2019. – Vol. 66(3). – P. 1280–1290.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biological and Chemical Terrorism: Strategic Plan for Preparedness and Response. MMWR Recomm Rep. – 2000. – Vol. 49(RR-4). – 26 p.
8. Chisi S. L. An evaluation of serological tests in the diagnosis of bovine brucellosis in naturally infected cattle in KwaZulu-Natal province in South Africa / S. L. Chisi [et al.] // Journal of the South African Veterinary Association – 2017. – Vol. 88. – P. 1–7.
9. Dieste-Perez L. Performance of skin tests with allergens from *B. melitensis* B115 and rough *B. abortus* mutants for diagnosing swine brucellosis / L. Dieste-Perez [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2014. – Vol. 168. – P. 161–168.

10. European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road (ADR). Volume II. Part 2. Classification. Chapter 2.2.62. Infectious substances; Part 4. Packing and Tank Provisions. Packing Instructions P620 and P650. – 2025 Edition. – United Nations Economic Commission for Europe (UNECE). – 1340 p.
11. European Union. Commission Decision of 10 December 2008 amending Annex C to Council Directive 64/432/EEC and Decision 2004/226/EC as regards diagnostic tests for bovine brucellosis (notified under document number C [2008] 7642) (Text with EEA relevance) (2008/984/EC). Official Journal of the European Union, L 352/38-45.
12. Faustini S. E. Development of a high-sensitivity ELISA detecting IgG, IgA and IgM antibodies to the SARS-CoV-2 spike glycoprotein in serum and saliva / S. E. Faustini [et al.] // Immunology. – 2021. – Vol. 164(1). – P. 135–147.
13. Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances 2025–2026. – Geneva: World Health Organization, 2025. – 58 p.
14. Hull N. C. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine / N. C. Hull, B. A. Schumaker // Infection Ecology & Epidemiology. – 2018. – Vol. 8(1). – 1500846.
15. Ilhan Z. Detection of *Brucella melitensis* DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay / Z. Ilhan [et al.] // Archivos de Medicina Veterinaria. – 2008. – Vol. 40(1). – P. 141–146.
16. Islam M. S. Presence of *Brucella* spp. in milk and dairy products: a comprehensive review and its perspectives / M. S. Islam [et al.] // Journal of Food Quality. – 2023. – Vol. 2023(1). – 2932883.
17. Jamil T. Spatio-temporal distribution of brucellosis in European terrestrial and marine wildlife species and its regional implications / T. Jamil [et al.] // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10(10). – 1970 p.
18. Janowicz A. Evolutionary history and current distribution of the West Mediterranean lineage of *Brucella melitensis* in Italy / A. Janowicz [et al.] // Microb. Genom. – 2020. – Vol. 6(11) – mgen000446.

19. Joint food and agriculture organization of the United Nations (FAO) / world health organization (WHO) expert committee on brucellosis. Technical Report Series 740, Sixth Report. WHO, Geneva, Switzerland. – 1986.
20. Kang S. I. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species / S. I. Kang [et al.] // Applied and Environmental Microbiology Journal. – 2011. – Vol. 77. P. 6726–6728.
21. Khairullah A. R. Brucellosis: Unveiling the complexities of a pervasive zoonotic disease and its global impacts / A. R. Khairullah [et al.] // Open veterinary journal. – 2024. – Vol. 14(5). – P. 1081–1097.
22. Khalafalla A. I. Preliminary Comparative Assessment of Brucellergene Skin Test for Diagnosis of Brucellosis in Dromedary Camels *Camelus dromedaries* / A. I. Khalafalla [et al.] // Vector Borne Zoonotic Disease. – 2020. – Vol. 20. – P. 412–417.
23. Khurana S. K. Bovine brucellosis – a comprehensive review / S. K. Khurana [et al.] // Veterinary Quarterly. – 2021. – Vol. 41(1). – P. 61–88.
24. Laboratory Biosafety Manual. – 4th Edition. – Geneva: World Health Organization, 2020. – 124 p.
25. Legesse A. Comparative evaluation of RBPT, I-ELISA, and CFT for the diagnosis of brucellosis and PCR detection of *Brucella* species from Ethiopian sheep, goats, and cattle sera / A. Legesse [et al.] // BMC Microbiology – 2023. – Vol. 23(1). – P. 216.
26. Lopez-Goni I. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis* / I. Lopez-Goni [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2011. – Vol. 154. – P. 152–155.
27. López-Santiago R. Immune response to mucosal brucella infection / R. López-Santiago [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10(1). – 1759 p.
28. Lounes N. Identification, geographic distribution and risk factors of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* infection in cattle in Algeria / N. Lounes [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2021. – Vol. 254(1). – 109004.

29. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Ch. 1.1.3. Transport of biological materials (NB: Version adopted in 2018). – 2024. – 13th Edition. – 25 p.
30. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Ch. 1.1.4. Biosafety and biosecurity: Standard for managing biological risk in the veterinary laboratory and animal facilities (NB: Version adopted in 2015). – 2024. – 13th Edition. – 16 p.
31. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Ch. 3.1.4. Brucellosis (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (NB: Version adopted in 2022). – 2024. – 13th Edition. – 47 p.
32. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Ch. 1.1.2. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases (NB: Version adopted in 2015). – 2024. – 13th Edition. – 18 p.
33. Morgan W. J. The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis / W. J. Morgan [et al.] // *Veterinary Record*. – 1969. – Vol. 85. – P. 636–641.
34. Nielsen K. A homogenous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus* / K. Nielsen [et al.] // *Journal of Immunological Methods*. – 1996. – Vol. 195. – P. 161–168.
35. Novoa M. B. Development, validation and field evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies against *Brucella abortus* in bulk and individual milk samples in dairy cattle / M. B. Novoa [et al.] // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2022. – Vol. 208(1). – 105740.
36. Ocampo–Sosa A. A. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3 / A. A. Ocampo–Sosa, J. Agüero–Balbín, J. M. García–Lobo // *Veterinary Microbiology*. – 2005. – Vol. 110. – P. 41–51.
37. Occhialini A. The retrospective on atypical brucella species leads to novel definitions / A. Occhialini [et al.] // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10(4). – 813 p.

38. Olsen S. C. Swine Brucellosis. In: Diseases of Swine, Zimmerman J. J., Karriker A. L., Ramirez A., Schwartz K. J. & Stevenson G.W. eds, 10th Edition, John Wiley & Sons, USA. – 2012. – P. 697–708.
39. Perletta F. Evaluation of three serological tests for diagnosis of canine brucellosis / F. Perletta [et al.] // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11(9). – 2162 p.
40. Pouillot R. The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis / R. Pouillot [et al.] // Veterinary Research. – 1997. – Vol. 28. – P. 365–374.
41. Rossetti C. A. Comparative review of brucellosis in small domestic ruminants / C. A. Rossetti, E. Maurizio, U. A. Rossi // Frontiers in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 9(1). – 887671.
42. Scholz H. C. Molecular characterisation of Brucella species / H. C. Scholz, G. Vergnaud // Revue scientifique et technique. – 2013. – Vol. 32. – P. 149–162.
43. Staggemeier R. Quantitative vs. conventional PCR for detection of human adenoviruses in water and sediment samples / R. Staggemeier [et al.] // Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo. – 2015. – Vol. 57(4). – P. 299–303.
44. Verger J. M. B. melitensis infection in cattle. In: Brucella melitensis, Plommet M. & Verger J. M., eds. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, Netherlands. – 1985. – P. 197–203.
45. Warioba J. P. Occurrence and risk factors of brucellosis in commercial cattle farms from selected districts of the Eastern Coast Zone, Tanzania / J. P. Warioba [et al.] // Veterinary Medicine International. – 2023. – Vol. 2023. – 4904931.
46. Whatmore A. M. & Gopaul K. K. Recent advances in molecular approaches to Brucella diagnostics and epidemiology. In: Brucella: Molecular Microbiology and Genomics, López-Goñi I. & O’Callaghan D., eds, Caister Academic Press, Norfolk, UK. – 2011. – P. 57–88.
47. Whatmore A. M. Emerging diversity and ongoing expansion of the genus Brucella / A. M. Whatmore, J. T. Foster // Infection, Genetics and Evolution. – 2021. – Vol. 16. – 104865.

48. Yazdani R. Construction of a novel recombinant vector as *Brucella melitensis* vacB gene knockout candidate / R. Yazdani, A. Doosti, P. G. Dehkordi // African Journal of Microbiology Research. – 2012. – Vol. 6(4). – P. 802–808.

49. Yu W. L. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction / W. L. Yu, K. Nielsen // Croatian Medical Journal. – 2010. – Vol. 51(4). – P. 306–313.

50. Методичні рекомендації «Відбір та пулування сироваток крові і молока від ВРХ за імуноферментних досліджень на бруцельоз та лейкоз» від 04.10.2019 р.

51. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин № 15-14/55 від 10.02.1998 р.

52. Широбоков В. П., Виноград Н. О., Войцеховський В. Г., Дзюблик І. В., Климнюк С. І. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія, Видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011 – 389 с.

Диференційна характеристика видів бруцел

Вид	Морфологія колоній ^b	Потреба в сироватці крові	Лізис фагами ^a					Оксидаза	Уреаза активність	Основний господар
			Tb		Wb	Iz ₁	R/C			
			RTD ^c	10 ⁴ RTD	RTD	RTD	RTD			
<i>B. abortus</i>	S	— ^d	+	+	+	+	—	(+) ^e	(+) ^f	ВРХ, буйволи
<i>B. melitensis</i>	S		—	—	(—) ^g	+	—	(+)	+ ^h	ДРХ
<i>B. suis</i>	S	—	—	+	(+) ⁱ	(+) ⁱ	—	+	+ ^j	Бв.1: свині
										Бв.2: свині, зайці
										Бв.3: свині
										Бв.4: олені
										Бв.5: гризуни
<i>B. neotomae</i>	S	—	— ^k	+	+	+	—	—	+ ^j	щурі ^l
<i>B. ovis</i>	R	+	—	—	—	—	+	—	—	вівці
<i>B. canis</i>	R	—	—	—	—	—	+	+	+ ^j	собаки
<i>B. ceti</i>	S	НВ	(—)		(+)	(+)	—	(+)	+	китоподібні
<i>B. pinnipedialis</i>	S	НВ	(—)		(+)	(+)	—	+	+ ^h	ластоногі
<i>B. microti</i>	S	—	—	+	+	+	НВ	+	+ ^h	невідомий ⁿ
<i>B. inopinata</i>	S	НВ	—	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ	+ ^j	невідомий
<i>B. rapionis</i>	S		ЧЛ ^m	ЧЛ ^m	+	НВ	—	—	+ ^j	невідомий
<i>B. vulpis</i>	S		+		+	+	—	—	+	невідомий

Примітки:

(+)/(-) Більшість ізолятів позитивних / негативних;

a Фаги: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz1) and R/C;

b Форма колоній: S – гладенькі, R – шорсткі;

c RTD: стандартне розведення;

d *B. abortus* біовар 2 потребує наявності сироватки для росту при первинній ізоляції;e Деякі африканські ізоляти *B. abortus* біовар 3 є негативними;

f Середній рівень, за винятком штаму 544 та деяких польових штамів, які є негативними;

g Деякі ізоляти лізуються фагом Wb;

h Повільний рівень, за винятком деяких штамів, які швидко розвиваються;

i Деякі ізоляти *B. suis* біовар 2 зовсім не лізуються або лізуються лише частково фагами Wb or Iz1;

j Швидкий рівень;

k Дрібні фагові бляшки;

l Вид *Neotoma lepida*;

m Частковий лізис;

n Штами, ізольовані від багатьох видів диких ссавців (гризуни, лисиці, дикі свині), амфібій і зовнішнього середовища;

НВ Невизначені.

Диференційна характеристика біоварів бруцел

Вид	Біовар	Потреба в CO ₂	Продуктування H ₂ S	Ріст з барвниками ^а		Аглютинація з моноспецифічними сироватками			Референтний штам		
				Тіонін	Основний фуксин	A	M	R	Штам	ATCC	NCTC
B. abortus	1	(+) ^b	+	–	+	+	–	–	544	23448	10093
	2	(+) ^b	+	–	–	+	–	–	86/8/59	23449	10501
	3 ^c	(+) ^b	+	+	+	+	–	–	Tulya	23450	10502
	4	(+) ^b	+	–	(+)	–	+	–	292	23451	10503
	5	–	–	+	+	–	+	–	B3196	23452	10504
	6 ^c	–	(–)	+	+	+	–	–	870	23453	10505
	9	+/-	+	+	+	–	+	–	C68	23455	10507
B. melitensis	1	–	–	+	+	–	+	–	16M	23456	10094
	2	–	–	+	+	+	–	–	63/9	23457	10508
	3	–	–	+	+	+	+	–	Ether	23458	10509
B. suis	1	–	+	+	(–)	+	–	–	1330	23444	10316
	2	–	–	+	–	+	–	–	Thomsen	23445	10510
	3	–	–	+	+	+	–	–	686	23446	10511
	4	–	–	+	(–)	+	+	–	40	23447	11364
	5	–	–	+	–	–	+	–	513	HB	11996
B. neotomae		–	+	– ^d	–	+	–	–	5K33	23459	10084
B. ovis		+	–	+	(–)	–	–	+	63/290	25840	10512
B. canis		–	–	+	(–)	–	–	+	RM6/66	23365	10854
B. ceti		(–)	–	(+)	(+)	+	(–)	–	B1/94 BCCN 94-74	HB	12891
B. pinnipedialis		(+)	–	+	(+)	(+)	(–)	–	B2/94 BCCN 94-73	HB	12890
B. microti		–	–	+	+	(–)	(+)	–	CCM4915 BCCN 07-01 CAPM 6434	HB	HB
B. inopinata		–	+	+	+	–	+ ^e		B01 BCCN 09-01 CAPM 6436	HB	HB
B. papionis		–	–	–	–	+	–	–	F8/08-60 CIRMBP 0958	HB	13660
B. vulpis		–	–	+	+	+	–		F60 BCCN 09-2 DSM 101715	HB	HB

Примітки:

(+)/(-) Більшість ізолятів позитивних / негативних;

а Концентрація барвника в сироватково-декстрозному агарі: 20 мкг/мл;

b Зазвичай позитивний результат первинної ізоляції;

c Для більш специфічної диференціації біоварів 3 та 6 застосовується тіонін в кількості 40 мкг/мл: біовар 3 = +, біовар 6 = – ;

d Ріст за концентрації тіоніну 10 мкг/мл;

e Слабка аглютинація;

HB Невизначені.

Методи фарбування мазків

I. Метод Стампа

1. Фіксація:

Мазок фіксують над полум'ям.

2. Фарбування:

Фарбують розчином карболового фуксина Циля в розведенні 1:10 впродовж 10 хв, промивають водою, обробляють 0,5% розчином оцтової кислоти впродовж 30 с. Ретельно промивають водою, дофарбовують 1% розчином метиленового синього – 20–30 с. Промивають водою, просушують фільтрувальним папером.

3. Мікроскопічна картина:

Бруцели червоні, інша мікрофлора і фон препарату сині.

II. Метод Козловського

1. Фіксація:

Мазок висушують на повітрі, а потім фіксують над полум'ям.

2. Фарбування:

На мазок наносять 2% розчин сафраніну та підігрівають над полум'ям до появи пухирців, швидко промивають водою, додатково фарбують 0,75–1% водним розчином малахітового зеленого (або 1% р-ном метиленового синього, брильянтового зеленого) впродовж 0,5–1 хв. Фарбу зливають і ретельно промивають мазок. Просушують фільтрувальним папером.

3. Мікроскопічна картина:

Бруцели яскраво-червоні, інша мікрофлора і фон препарату зелені.

III. Метод Шуляк-Шина

1. Фіксація:

Мазок висушують на повітрі, а потім фіксують над полум'ям.

2. Фарбування:

Мазок забарвлюють розчином карболового фуксину Циля у розведенні 1:5 впродовж 2 хв, промивають водою і дофарбовують 2% водним розчином метиленового синього впродовж 5 хв. Підсушують фільтрувальним папером.

3. Мікроскопічна картина:

Бруцели яскраво-червоні, інша мікрофлора і фон препарату фарбується в синьо-блакитний колір.

IV. Фарбування за Грамом

1. Фіксація:

Мазок фіксують над полум'ям.

2. Фарбування:

На фіксований препарат-відбиток кладуть смужку фільтрувального паперу, на який наносять розчин генціанвіолету. Через 1–2 хв фарбу зливають, паперову смужку прибирають, а на препарат наносять розчин Люголя, який через 1–2 хв зливають і знебарвлюють мазок 96 % спиртом впродовж 30 секунд. Мазок-відбиток промивають водою, покривають фільтрувальним папером та фарбують робочим розчином фуксину протягом 1–2 хв. Препарат промивають водою і просушують фільтрувальним папером.

3. Мікроскопічна картина:

Грам-позитивні бактерії після обробки спиртом залишають фіолетове забарвлення генціанвіолету, а грам-негативні – втрачають первинне забарвлення (фіолетовий колір) та забарвлюються у червоний колір після додаткового фарбування фуксином.

Бруцели є грамнегативними бактеріями, забарвлюються у червоний колір.

Селективні поживні середовища

• М'ясна вода

Свіже м'ясо ВРХ відділяють від кісток, жиру, сухожилок та пропускають через м'ясорубку. Потім 500,0 г фаршу заливають 1 л водопровідної води, витримують 15–16 год у прохолодному місці. Настій кип'ятять впродовж 30–40 хв, додають дистильовану воду до первинного об'єму та фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Одержану м'ясну воду стерилізують автоклавуванням за температури 120°C впродовж 20 хв.

• Печінкова вода

Свіжу печінку ВРХ відділяють від жиру, плівок, жовчних каналів і пропускають через м'ясорубку. Потім 500,0 г фаршу заливають 1 л водопровідної води, настоюють впродовж 1 год та кип'ятять, помішуючи 30 хв. Після відстоювання фарш видаляють, а до рідини додають дистильовану воду до первинного об'єму та фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Розливають у флакони, стерилізують автоклавуванням за температури 112°C (0,5 атм) впродовж 30–40 хв.

• М'ясо-пептонний печінково-глюкозо-гліцеринний агар (МППГГА)

До 610 см³ м'ясної води додають 300 см³ печінкової води, 10,0 г пептону, 5,0 г х/ч натрію хлориду та 20–30 г агар-агару. Суміш готують впродовж 1 год за 100°C в автоклаві, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, вирівнюють рН 7,2, додають 10,0 г глюкози і 20 см³ гліцерину. Середовище розливають у пробірки або флакони та стерилізують за температури 110°C (0,4 атм) впродовж 30 хв. Показник рН до стерилізації 7,3–7,4, а після стерилізації – 6,8–7,0.

Для виготовлення сироваткового МППГГА в розплавлене середовище після охолодження до 50°C додають 10–20% стерильної сироватки крові ВРХ або вівці, розмішують та розливають у пробірки.

• М'ясо-пептонний печінково-глюкозо-гліцеринний бульйон (МППГБ)

Готують аналогічно МППГГА, але без додавання агар-агару, глюкози та гліцерину.

• Печінково-глюкозо-гліцеринний агар (ПГГА)

До печінкової води додають 1% пептону, 0,5% х/ч натрію хлориду та 2–3% агар-агару. Суміш варять 1 год за температури 100°C в автоклаві. Фільтрують через ватно-марлевий фільтр, доводять рН 7,0–7,2 та додають 1% глюкози і 2–3% гліцерину. Середовище розливають по пробірках або флаконах та стерилізують за температури 110°C (0,4 атм) впродовж 30 хв.

• Печінково-глюкозо-гліцеринний бульйон (ПГБ)

Готують аналогічно ПГГА, але без агар-агару.

• Твердий печінково-сироватковий і печінково-амінопептидний агар

Беруть м'ясну та печінкову воду по 500,0 см³, додають 10,0 г пептону, 5,0 г х/ч натрію хлориду, 20,0 г агар-агару. До цієї суміші додають 17 см³ 10% розчину двовуглекислої соди та автоклавують за температури 115°C (0,7 атм) впродовж 20–25 хв, фільтрують через ватний фільтр, доводять рН 7,0–7,2 та додають 10,0 г глюкози і 20 см³ гліцерину. Середовище розливають по пробірках або флаконах та стерилізують за температури 110°C (0,4 атм) впродовж 20 хв та зберігають в прохолодному місці. Перед застосуванням суміш розплавляють, охолоджують до 50°C та додають 10–20% стерильної сироватки ВРХ або вівці 10–15%; амінопептиду і розливають у пробірки або чашки Петрі.

Продовження додатку Г

• Напіврідкий печінково-сироватковий і печінково-амінопептидний агар

Беруть м'ясну та печінкову воду по 500,0 см³, додають 10,0 г пептону, 5,0 г х/ч натрію хлориду, 1,5–2,0 г агар-агару. До цієї суміші додають 17 см³ 10% розчину двовуглекислої соди та автоклавують за температури 115°C (0,7 атм) впродовж 20–25 хв, фільтрують через ватний фільтр, доводять рН 7,0–7,2. Суміш кип'ятять, розливають у флакони та стерилізують в автоклаві за температури 115°C (0,7 атм) впродовж 30 хв та зберігають в прохолодному місці. Перед застосуванням суміш розплавляють, охолоджують до 50°C та додають 10–20% стерильної сироватки ВРХ або вівці 10%; амінопептиду і розливають у пробірки.

• Промислові середовища

Brucella-Agar-Basis (Агар для бруцел) – це живильне середовище, що використовується для вирощування та виділення бактерій роду *Brucella*, що викликають бруцельоз. Середовище містить поживні речовини і фактори росту, що робить його придатним для культивування вибагливих мікроорганізмів, включаючи бруцел.

Склад та властивості:

Основа: Зазвичай містить м'ясний та казеїновий пептон, дріжджовий екстракт, бісульфіт натрію, хлорид натрію, декстрозу та агар.

Додаткові добавки: Для поліпшення росту бруцел можуть додаватися кров, гемін та вітамін К1.

Роль компонентів: Пептони є джерелом поживних речовин, таких як азот, вітаміни, мінеральні солі та амінокислоти. Дріжджовий екстракт багатий на вітаміни, особливо групи В. Бісульфіт натрію – відновник. Хлорид натрію забезпечує осмотичний та транспортний баланс. Декстроза - джерело вуглецю та енергії. Кров та інші добавки забезпечують додаткові фактори росту.

Характер росту: Бруцели утворюють дрібні, прозорі колонії з рівними краями.

Застосування: Виділення бруцел з клінічних зразків (кров, кістковий мозок, сеча тощо) та харчових продуктів. Кількісне визначення бруцел. Часткова ідентифікація бруцел. Вирощування анаеробів, у тому числі бруцел. Отримання токсинів клостридій.

Додатково: Для культивування бруцел необхідна інкубація за температури 37°C продовж 2–3 діб. Для оптимального зростання бруцел необхідні мікроаерофільні умови (знижений вміст кисню).

Еритрит-агар – спеціалізоване поживне середовище, що використовується для селективного культивування бруцел.

Основні характеристики: Містить необхідні для зростання бруцел поживні речовини, такі як пептони, дріжджовий екстракт. Тіамін та еритрит є факторами росту. Селективність забезпечується додаванням антибіотиків: поліміксин В, бацитрацин, циклогексимід, налідиксова кислота, ванкоміцин.

Застосування: Використовується для виділення бруцел із різних зразків, таких як клінічний матеріал та харчові продукти.

Додаткові компоненти та модифікації: Додавання крові (наприклад, кінської) може збагатити середовище та покращити зростання деяких штамів бруцел.

Бульйон для бруцел – середовище багате на поживні речовини та фактори росту. Використовується для вирощування вибагливих мікроорганізмів. М'ясний і казеїновий пептон забезпечують їх азотом, вітамінами, мікроелементами. Дріжджовий екстракт є джерелом вітамінів групи В. Декстроза забезпечує вуглецем та енергією. Хлорид натрію забезпечує осмотичний та транспортний баланс.

Бульйон триптозний – середовище багате на поживні речовини та фактори росту. Використовується для виділення, росту та диференціації бруцел. Декстроза забезпечує вуглецем та енергією. Хлорид натрію забезпечує осмотичний та транспортний баланс. Триптоза слугує джерелом енергії, вітамінів, амінокислот. Хлорид тіаміну стимулює ріст.

Культуральні та біохімічні властивості бруцел

Властивості	S-форми	R-форми
Ріст на агарі	Нижній, вологий	Сухий, більш грубий
Вид колоній	Круглі, опуклі, правильно контуровані, гомогенні	Менш опуклі, іноді неправильно контуровані, грубозернисті із зеленуватим відтінком
Ріст на бульйоні	Гомогенні, без просвітлення, мають пристінкове кільце	Бавовняний, з осадом та просвітленням, мають пристінкове кільце
завись в 0,15 % NaCl	Стійка гомогенна суспензія	Суспензія нерівномірною, нестійка
Термопреципітація суспензії за 90°C	Негативна	Позитивна
Аглютинабельність	Виразена	Слабка
Вірулентність	Висока	Практично відсутня
Ріст в умовах наявності 10–15 % вуглекислого газу	(<i>B. abortus</i> і <i>B. ovis</i>) дрібні, блискучі, випуклі колонії з рівними краями, поверхня, злегка блакитна, або сірувата.	-

Відношення до атмосферного CO₂

Вид бруцел	Потреба в CO ₂
<i>B. melitensis</i>	-
<i>B. abortus</i>	+
<i>B. suis</i>	-
<i>B. ovis</i>	+
<i>B. canis</i>	+

Біохімічні властивості бруцел

М.О.	Глюкоза	Ксилоза	Арабіноза	Декстроza	Індол	H ₂ S	Розрідження желатину	Аміак	Ріст на середовищах з:	
									фуксином	тіаміном
<i>B. abortus</i>	+	+	+	+	-	±	-	+	+	-
<i>B. melitensis</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>B. suis</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+

**ОДЕРЖАННЯ ТА ПІДГОТОВКА ЕРИТРОЦИТІВ БАРАНА
ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЗК І РТЗК**

Кров у барана відбирають із яремної вени у посуд зі скляними або фарфоровими бусами для дефібринування або у посуд з розчином Альсівера у рівному об'ємі по відношенню до крові. Для консервування дефібринованої крові застосовують розчин стрептоміцину (1г стрептоміцину у 20 см³ фізіологічного розчину на 100 см³ крові).

Дефібринована кров придатна для виконання досліджень впродовж 3-х днів, консервована стрептоміцином або розчином Альсівера – впродовж 12 днів.

Приготування розчину Альсівера. У 1000 см³ дистильованої води розчиняють 18,7 г глюкози, 4,2 г натрію хлориду, 8,0 г натрію лимонно-кислого, 0,5 г лимонної кислоти. Розчин доводять до кипіння, охолоджують, фільтрують через паперовий фільтр, розливають у флакони і стерилізують в автоклаві при 103–105 °С впродовж 30 хв або фільтрують через фільтр Зейтца.

Суспензію еритроцитів барана для використання у реакціях готують у такий спосіб: дефібриновану або консервовану кров у необхідній кількості центрифугують при 2000 об/хв протягом 15 хв, рідку частину зливають, а осад ще 3 рази відмивають у фізіологічному розчині у співвідношенні 1:10–1:20 до повного знебарвлення надосадової рідини. Після останнього центрифугування рідину обережно зливають, а осад перемішують і з нього вібирають необхідну кількість відмитих еритроцитів для приготування гемолітичної системи.

ПІЩАНСЬКИЙ Олександр Вікторович

кандидат ветеринарних наук,
директор ДНДІЛДВСЕ

АЛЕКСЕЄВА Галина Борисівна

кандидат ветеринарних наук, старший дослідник,
заступник директора з наукового забезпечення лабораторної діагностики
заразних хвороб тварин ДНДІЛДВСЕ

ПІСКУН Антон Володимирович

кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник
науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

КРАВЦОВА Оксана Леонідівна

начальник лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології
науково-дослідного бактеріологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

ОРДИНСЬКА Діана Олександрівна

науковий співробітник лабораторії діагностики захворювань бактеріальної
етіології науково-дослідного бактеріологічного відділу

МУСІЄЦЬ Ірина Володимирівна

завідувач науково-дослідного бактеріологічного відділу

ПОЛІЩУК Олеся Дмитрівна

завідувач науково-дослідного відділу імунологічних досліджень ДНДІЛДВСЕ

МЄТОЛАПОВА Галина Миколаївна

молодший науковий співробітник науково-дослідного відділу імунологічних
досліджень ДНДІЛДВСЕ

ПРИДЮК Олена Василівна

провідний лікар ветеринарної медицини лабораторії діагностики захворювань
бактеріальної етіології науково-дослідного бактеріологічного відділу
ДНДІЛДВСЕ

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА БРУЦЕЛЬОЗУ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Методичні рекомендації