Утверждаю

Начальник Главного управления

ветеринарии Министерства

сельского хозяйства СССР

А.Д.ТРЕТЬЯКОВ

30 декабря 1982 г. N 115-6а

Согласовано

Начальник Главного управления

карантинных инфекций Министерства

здравоохранения СССР

В.П.СЕРГИЕВ

7 декабря 1982 года

Начальник Главного

санитарно-эпидемиологического

управления Министерства

здравоохранения СССР

В.Е.КОВШИЛО

16 декабря 1982 года

ИНСТРУКЦИЯ

О МЕРОПРИЯТИЯХ ПО ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛИКВИДАЦИИ

БРУЦЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

Настоящая Инструкция предусматривает систему мероприятий по профилактике бруцеллеза и оздоровлению от него стад (отар), ферм, хозяйств, населенных пунктов и административных территорий, основанную на современном уровне научных знаний и опыте, с применением специальных средств и методов диагностики болезни, ветеринарной санитарии и специфической защиты животных.

Инструкция разработана Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР и Всесоюзным ордена Ленина научно-исследовательским институтом экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко при участии Всесоюзного научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, Всесоюзного ордена Трудового Красного Знамени государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов, главных управлений ветеринарии министерств сельского хозяйства союзных республик, республиканских и зональных научно-исследовательских ветеринарных учреждений.

С утверждением настоящей Инструкции утрачивает силу "Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных", утвержденная Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 16 апреля 1970 г., с изменениями и дополнениями, внесенными 7 апреля 1977 г.

**1. Общие положения**

1.1. Бруцеллез - инфекционная, хронически протекающая болезнь животных. Наиболее частое клиническое проявление болезни - аборт.

Возбудитель - бактерии из рода бруцелла, в который входит шесть самостоятельных видов: мелитензис (козье-овечий), абортус (крупного рогатого скота), суис (свиной), овис (бараний), канис (собачий) и неотома (кустарниковых крыс).

От животных могут заражаться люди, для которых наиболее опасен возбудитель бруцеллеза овец и коз. Бруцеллы вида овис вызывают заболевание, называемое инфекционным эпидидимитом баранов (ИЭ).

1.2. Диагноз на бруцеллез у животных ставят на основании результатов бактериологических, серологических и аллергических исследований (см. раздел 2) с учетом эпизоотологических данных и клинических признаков болезни.

1.3. В зависимости от эпизоотического состояния поголовья животных по бруцеллезу с целью определения комплекса профилактических и оздоровительных мероприятий стада животных, фермы, хозяйства, населенные пункты и административные территории (районы, области, края, республики) подразделяют соответственно на благополучные и неблагополучные по этой болезни.

1.3.1. К благополучным по бруцеллезу относят стада, фермы, хозяйства, населенные пункты, районы, области, края и республики, в которых при исследованиях на бруцеллез не выявляются больные животные.

1.3.2. К неблагополучным по бруцеллезу относят хозяйства и хозяйственно обособленные части их (фермы, бригады, отделения), населенные пункты, в которых выявлены животные, больные этой болезнью, а районы, области, края и республики - при наличии в них хозяйств, населенных пунктов, неблагополучных по бруцеллезу животных того или иного вида. Продолжительность неблагополучия хозяйств, населенных пунктов определяется сроком действия ограничений по бруцеллезу, введенных исполкомами соответствующих районных (городских) Советов народных депутатов.

1.3.3. Степень неблагополучия в отношении бруцеллеза хозяйства (фермы), поголовья животных в населенном пункте определяют с учетом характера течения инфекции в стаде, на ферме (острое, хроническое) и уровня распространения заболевания среди животных (ограниченное, то есть при заболевании в течение последних 12 мес. до 10 процентов животных от среднегодового их наличия в хозяйстве, на ферме, в стаде; значительное - при заболевании до 25 процентов и массовое - при заболевании более 25 процентов животных).

1.3.4. По степени неблагополучия в отношении бруцеллеза животных районы считают:

с ограниченным распространением бруцеллеза, то есть при наличии в них единичных неблагополучных по этой болезни скота пунктов, в которых содержится в общем до 10 процентов поголовья животных от имеющихся в районе;

со значительным распространением бруцеллеза, то есть при наличии в районе нескольких неблагополучных пунктов с общим поголовьем до 30 процентов животных от имеющихся в районе.

1.3.5. Эпизоотическое состояние по бруцеллезу животноводства области (края, республики) определяют с учетом степени распространения болезни среди скота соответственно в отдельных районах или группе районов, входящих в состав области (края, республики), и в зависимости от этого относят область (край, республику) к категории территорий с ограниченным или значительным распространением бруцеллеза.

1.4. Благополучие по бруцеллезу животноводческих ферм, хозяйств, населенных пунктов, районов, областей, краев и республик обеспечивается:

охраной ферм, стад животных в населенных пунктах от заноса в них возбудителей болезни с животными или через предметы внешней среды путем осуществления комплекса организационно-хозяйственных, зоогигиенических и ветеринарно-санитарных профилактических мер, а также плановых диагностических исследований на бруцеллез животных;

оздоровлением неблагополучных по бруцеллезу ферм, хозяйств, населенных пунктов и предотвращением распространения возбудителя болезни из очагов инфекции.

1.5. Оздоровление неблагополучных по бруцеллезу животных пунктов проводят методами:

а) систематических диагностических исследований животных, выделения из стад (отар) больных животных или отдельных неблагополучных групп животных с последующим их убоем;

б) единовременной полной замены поголовья неблагополучного стада (отары), ферм здоровыми животными при установлении впервые заболевания у животных в благополучных районах (областях, краях, республиках), при остром течении инфекции или массовом поражении болезнью животных в стаде (на ферме), а также в случаях, когда оздоровление стада (фермы) не достигается методом, указанным в подпункте "а".

В обоих случаях обязательным является осуществление комплекса организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мер, предусмотренных настоящей Инструкцией.

1.5.1. Обязательной мерой является предупреждение заражения бруцеллезом людей.

1.6. В качестве средства специфической защиты от бруцеллеза в комплексе ветеринарных мер по профилактике и ликвидации этой болезни животных (см. п. п. 1.4 и 1.5) допускается применение противобруцеллезных вакцин для иммунизации крупного и мелкого рогатого скота.

Иммунизация крупного и мелкого рогатого скота против бруцеллеза разрешается в случаях, предусмотренных настоящей Инструкцией, только вакцинами, принятыми в практику или допущенными для применения в широком производственном опыте Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР. Порядок вакцинации и исследования животных до и после иммунизации регламентируется наставлениями по применению соответствующих вакцин, утвержденными Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР.

Перечень республик, краев и областей, в которых допускается иммунизация животных против бруцеллеза в комплексе других ветеринарных мероприятий, устанавливает Главное управление ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР. В республиках, краях и областях, в которых допущено использование вакцин, разрешение на применение препаратов в районах и хозяйствах выдают соответственно ветеринарные отделы областных (краевых) управлений сельского хозяйства, министерств сельского хозяйства автономных республик, главные управления (управления) ветеринарии министерств сельского хозяйства союзных республик, не имеющих областного деления, а на применение вакцины из штамма N 19 для прививки коров - только главные управления (управления) ветеринарии министерств сельского хозяйства союзных республик.

1.7. Характер, комплекс и объем профилактических и оздоровительных мероприятий как в благополучных, так и в неблагополучных по бруцеллезу животных хозяйствах (фермах), населенных пунктах, районах, областях, краях и республиках определяют и осуществляют в плановом порядке в зависимости от эпизоотической обстановки и с учетом условий ведения животноводства.

1.8. Руководители хозяйств (предприятий) и владельцы животных в соответствии с Ветеринарным уставом Союза ССР несут ответственность за организацию и своевременное выполнение предусмотренных настоящей Инструкцией организационно-хозяйственных и других мероприятий по предупреждению заболевания животных бруцеллезом, а также по его ликвидации в случае возникновения.

1.9. Ветеринарные врачи и ветеринарные фельдшеры колхозов, совхозов и других сельскохозяйственных предприятий, специалисты учреждений и организаций государственной ветеринарии обязаны разрабатывать и своевременно проводить в хозяйствах (на предприятиях) и в населенных пунктах ветеринарно-санитарные и другие специальные ветеринарные мероприятия по предупреждению и ликвидации бруцеллеза животных, а также постоянно следить за состоянием животных, проверять выполнение в хозяйствах, на фермах профилактических и оздоровительных мероприятий и соблюдение ветеринарно-санитарного режима, вносить необходимые предложения руководителям хозяйств (предприятий) по улучшению этой работы.

1.10. Ветеринарные органы областей (краев, республик), главные ветеринарные врачи районов (городов) обязаны осуществлять постоянное руководство специальными мероприятиями по профилактике и ликвидации заболевания животных бруцеллезом, следить за качеством и полнотой этих мероприятий, осуществлять государственный контроль за выполнением профилактических мер, ходом оздоровления хозяйств, населенных пунктов от бруцеллеза животных, выполнением требований ветеринарного законодательства, информировать о результатах этой работы местные советские, сельскохозяйственные и вышестоящие ветеринарные органы.

1.11. Ветеринарные и медицинские организации обязаны взаимно представлять информацию о случаях появления заболеваний животных и людей бруцеллезом.

При выявлении в животноводческом хозяйстве, населенном пункте случаев заболевания людей бруцеллезом ветеринарные работники немедленно проводят эпизоотологические, а медицинские - эпидемиологические обследования с целью установления источника и путей заражения людей. Проводят поголовное исследование на бруцеллез животных и при установлении заболевания организуют мероприятия по ликвидации очага инфекции.

1.12. Медицинские работники участвуют в разработке планов противобруцеллезных мероприятий в хозяйствах, населенных пунктах и на административных территориях, организуют и проводят в животноводческих хозяйствах, на предприятиях, перерабатывающих продукты и сырье животного происхождения, в населенных пунктах медико-санитарные мероприятия по профилактике и лечению людей от бруцеллеза, а также осуществляют контроль в порядке государственного санитарного надзора за проведением противобруцеллезных мероприятий и соблюдением противоэпидемического режима.

1.13. Местные органы здравоохранения и ветеринарии организуют и осуществляют комиссионную проверку полноты и качества проводимых противобруцеллезных мероприятий в животноводческих хозяйствах и на предприятиях по переработке продуктов и сырья животного происхождения, дают руководителям хозяйств и предприятий официальные предписания по улучшению этой работы, являющиеся обязательными для исполнения.

**2. Диагностика бруцеллеза**

2.1. Для диагностики бруцеллеза у животных применяют бактериологический, серологический и аллергический методы исследования.

2.2. Бактериологическое и серологическое исследования материала от животных и аллергическое исследование животных проводят согласно указаниям и наставлениям по диагностике бруцеллеза у животных, утвержденным Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР.

2.3. Для исследования на бруцеллез животных разных видов применяют следующие методы:

крупного рогатого скота и буйволов - серологический: реакцию агглютинации в пробирках (РА), реакцию связывания комплемента (РСК) или реакцию длительного связывания комплемента (РДСК), пластинчатую реакцию агглютинации с роз бенгал антигеном - роз бенгал пробу (РБП), кольцевую реакцию с молоком (КР); аллергический;

овец, коз, оленей - серологический: РА в пробирках, РСК (РДСК), РБП; аллергический;

свиней - серологический: РСК (РДСК), РБП; аллергический;

лошадей - серологический: РА в пробирках, РСК (РДСК), РБП;

верблюдов - серологический: РА в пробирках, РСК, РБП;

собак и животных других видов - серологический: РА в пробирках, РСК.

2.3.1. Повторно животных исследуют на бруцеллез серологическими методами через 15 - 30 дней, аллергическим - через 25 - 30 дней.

2.3.2. Коров (нетелей), буйволиц, верблюдиц исследуют на бруцеллез независимо от периода беременности, овец и свиней - через 1 - 2 мес. после окота или опороса. Молодняк животных всех видов исследуют с 3 - 4-месячного возраста. Крупный и мелкий рогатый скот, подвергавшийся прививкам противобруцеллезными вакцинами, исследуют в сроки согласно наставлениям по применению вакцин.

2.4. Бактериологическому исследованию (включая постановку биологической пробы) подвергают материал от животных всех видов в случае наличия у них признаков, вызывающих подозрение на заболевание бруцеллезом. Абортированные плоды, поступающие в ветеринарную лабораторию для исследования на трихомоноз, вибриоз, паратиф, лептоспироз, вирусный аборт, подлежат также обязательному исследованию на бруцеллез.

2.5. Если в благополучном по бруцеллезу стаде (на ферме) произошли аборты у животных или у них появились другие признаки, вызывающие подозрение на бруцеллез, диагностику болезни проводят в следующем порядке.

2.5.1. В ветеринарную лабораторию направляют на бактериологическое исследование абортированный плод (или желудок плода), кусочки плодовых оболочек или иной материал от абортировавших и других животных, подозрительных по заболеванию бруцеллезом. Одновременно от таких животных направляют сыворотки крови на серологическое исследование (РА, РСК или РДСК). При отрицательном результате первого серологического исследования от животных берут кровь повторно через 15 - 20 дней.

2.5.2. При выделении культуры бруцелл или при получении положительного результата биологической пробы диагноз на бруцеллез считают установленным.

Если при бактериологическом исследовании материала культура бруцелл не выделена, получен отрицательный результат биопробы и при двукратном серологическом исследовании сыворотки крови проверяемых животных получен отрицательный результат, животных признают здоровыми в отношении бруцеллеза.

2.5.3. При получении положительного результата серологического исследования сыворотки крови одного или нескольких подозрительных по заболеванию животных, при незаконченном бактериологическом исследовании, этих животных через 15 - 20 дней дополнительно исследуют на бруцеллез комплексно серологическими (РА и РСК или РДСК) и аллергическим (крупный и мелкий рогатый скот, буйволы, свиньи) методами. Одновременно этими же методами исследуют остальных животных стада (фермы) и учитывают результат.

Если в данном стаде (отаре) при исследовании не выявлено других реагирующих животных и получен отрицательный результат бактериологического исследования материала, серологического и аллергического исследований подозрительных по заболеванию животных, их признают здоровыми, а стадо считают благополучным в отношении бруцеллеза.

В тех случаях, когда получен отрицательный результат бактериологического исследования материала от подозрительных по заболеванию животных, при сохранении у них положительных на бруцеллез показаний серологических реакций (или проявлении аллергической реакции), и в стаде (отаре) при исследовании выявлены другие реагирующие животные (по серологии или аллергии), диагноз на бруцеллез считают установленным, реагирующих животных признают больными (см. п. 2.8) и стадо (отару), ферму, в которых эти животные выявлены, объявляют неблагополучными по бруцеллезу.

Если получен отрицательный результат бактериологического исследования материала от подозрительных по заболеванию животных при сохранении у них положительных на бруцеллез показаний серологических реакций, а в стаде (отаре) при проверке не выявлены другие реагирующие, изолированных ранее животных сдают на убой, а остальное поголовье стада (фермы) через 25 - 30 дней повторно исследуют серологическим и аллергическим методами, как указано выше. В зависимости от полученных результатов дают окончательную оценку эпизоотического состояния по бруцеллезу стада (фермы).

2.5.4. В местностях, где распространен бруцеллез овец (коз), культуры бруцелл, выделенные из материала от крупного рогатого скота, направляют в областную (краевую, республиканскую, зональную) ветеринарную лабораторию для определения вида возбудителя.

2.5.5. Для бактериологического исследования на инфекционный эпидидимит баранов в ветеринарную лабораторию направляют семенники с придатками, абортированные плоды, кусочки плодовых оболочек и другой материал. Для серологического исследования применяют РДСК с овисным антигеном.

Баранов (овец) признают больными инфекционным эпидидимитом, если при бактериологическом исследовании материала от животных выделена культура возбудителя болезни или с сывороткой крови животных получена положительная РДСК с овисным антигеном.

2.6. В случае, когда в благополучном по бруцеллезу стаде (на ферме) при плановом исследовании от отдельных животных сывороток крови в РА (в том числе при переисследовании проб, положительных по РБП, но отрицательных по РСК) получен положительный результат - у крупного рогатого скота и лошадей в титре не более 200 международных единиц (МЕ), у буйволов, овец, коз и свиней - 100 МЕ, таких животных немедленно изолируют и через 15 - 20 дней дополнительно исследуют на бруцеллез комплексно серологическими (РА и РСК или РДСК) и аллергическим (кроме лошадей) методами. Одновременно этими же методами исследуют остальных животных стада (фермы).

Если при повторном исследовании в стаде (отаре) не выявлено реагирующих и отсутствуют другие признаки, вызывающие подозрение на заболевание животных бруцеллезом (аборты и проч.), а у исследованных ранее животных титр антител в РА не повысился, РСК (РДСК) и аллергическая проба окажутся отрицательными, то стадо считают благополучным в отношении бруцеллеза.

При повышении титра антител сыворотки крови, определяемых в РА, или при получении положительного результата РСК (РДСК), или по аллергической пробе (то есть по одной или нескольким диагностическим пробам) у изолированных животных их признают больными, а стадо (отару), в котором эти животные ранее находились, объявляют неблагополучным по бруцеллезу и проводят мероприятия по его оздоровлению согласно настоящей Инструкции.

2.7. Если в благополучном по бруцеллезу хозяйстве у отдельных животных получена положительная реакция на аллерген, их немедленно изолируют и сыворотку крови от них исследуют на бруцеллез (РА, РСК или РДСК), а от овец - и на ИЭ (РДСК) для уточнения диагноза. Одновременно этими же способами исследуют остальных животных отары (стада).

При получении положительных результатов исследования сывороток крови от изолированных животных или от других животных отары (стада) всю отару (стадо) признают неблагополучной по бруцеллезу (или по ИЭ) и с ней поступают в соответствии с настоящей Инструкцией.

Если получены отрицательные результаты серологического исследования и у животных отсутствуют признаки, вызывающие подозрение на заболевание бруцеллезом или ИЭ (аборты и проч.), то ранее реагировавших на аллерген животных подвергают убою, а остальных считают благополучными по бруцеллезу (или по ИЭ баранов).

2.8. В неблагополучных по бруцеллезу стадах (фермах, хозяйствах, населенных пунктах) реагирующих при серологических исследованиях или на введение аллергена животных признают больными бруцеллезом.

2.9. Ветеринарные органы областей (краев, республик), главные ветеринарные врачи районов обязаны осуществлять контроль за соблюдением санитарного режима при исследовании патологического материала и проб крови на бруцеллез в ветеринарных лабораториях.

**3. Организация противобруцеллезных мероприятий**

3.1. Мероприятия по профилактике и ликвидации заболевания животных бруцеллезом организуют и осуществляют в соответствии с планами, разрабатываемыми для районов, областей, краев и республик, а в районах - по каждому хозяйству и населенному пункту.

3.2. Животноводческую ферму (бригаду, отделение хозяйства), населенный пункт или часть его (отдельное стадо), в которых выявлены больные бруцеллезом животные, по представлению главного ветеринарного врача района (города) решением исполкома районного (городского) Совета народных депутатов объявляют неблагополучными по бруцеллезу и в них вводят ветеринарные ограничения (см. раздел 5 настоящей Инструкции). Одновременно утверждают план оздоровления неблагополучных пунктов от бруцеллеза, согласованный с медицинскими и другими заинтересованными организациями.

3.3. Планы мероприятий по профилактике бруцеллеза и оздоровлению от него поголовья крупного и мелкого рогатого скота, свиней и животных других видов составляют по хозяйствам руководители и специалисты хозяйств и согласовывают их с местными советскими и сельскохозяйственными органами, с главным ветеринарным врачом района и главным государственным санитарным врачом района, а по населенным пунктам и административным территориям - соответствующие районные, областные (краевые), республиканские сельскохозяйственные органы и органы здравоохранения.

3.3.1. Планы противобруцеллезных мероприятий по району, области, краю, республике согласовывают с заинтересованными организациями, министерствами, ведомствами, плановыми и финансовыми органами и вносят на рассмотрение соответственно рай(гор)исполкомов, обл(край)исполкомов, Советов Министров автономных республик, Советов Министров союзных республик.

3.4. В плане оздоровительных мероприятий:

отражают эпизоотическое состояние хозяйства и его обособленных частей (ферм, отделений), населенного пункта по бруцеллезу (характер течения инфекции и степень распространения болезни, наличие больных и привитых противобруцеллезными вакцинами животных и т.д.);

предусматривают характер, объем и сроки хозяйственных (строительные и санитарно-ремонтные работы на фермах; организация изолированного выращивания молодняка; порядок и сроки сдачи больных животных на убой; источники и сроки завоза на оздоровленные фермы здоровых животных для замены неблагополучного поголовья; организация обеззараживания молока и обрата; устройство ветеринарно-санитарных объектов, выделение строительных материалов, оборудования и др.), противоэпидемических и других необходимых мероприятий;

намечают специальные ветеринарные противобруцеллезные меры (порядок и сроки проведения диагностических исследований и иммунизации животных против бруцеллеза, дезинфекции, дератизации и т.д.);

определяют методы и сроки оздоровления стад (отар), ферм, хозяйств, населенных пунктов, выделяют ответственных лиц за исполнение отдельных видов работ, предусмотренных планом.

Если в хозяйстве установлено заболевание крупного рогатого скота бруцеллезом и туберкулезом, оздоровительные мероприятия планируют с учетом наличия этих двух болезней.

3.4.1. В план по району, области, краю, АССР включают перечень подлежащих оздоровлению неблагополучных хозяйств, населенных пунктов, а по союзной республике перечень неблагополучных по бруцеллезу районов и областей с учетом степени распространения болезни и поражения поголовья животных.

Предусматривают первоочередность оздоровления племенных хозяйств (ферм), племенных заводов, станций и предприятий по искусственному осеменению животных, животноводческих комплексов, хозяйств, расположенных в курортных зонах, вокруг крупных городов и промышленных центров, а также меры по оказанию помощи неблагополучным хозяйствам материалами, оборудованием для ферм и другими средствами, организации выращивания здорового молодняка в благополучных хозяйствах и использованию его для замены неблагополучного поголовья оздоравливаемых ферм.

3.5. При изменении формы течения бруцеллеза (обострение инфекции) методы борьбы, интенсивность и сроки проведения мероприятий могут изменяться, что отражают в плане оздоровления хозяйства, населенного пункта, района (области, края, республики) от этой болезни скота.

3.6. Руководители колхозов, совхозов и других сельскохозяйственных предприятий должны:

обеспечить выполнение в намеченные сроки всего комплекса противобруцеллезных мер, предусмотренных в планах мероприятий по профилактике и оздоровлению от него стад (ферм), хозяйств;

организовывать строительство (или реконструкцию) необходимых животноводческих, бытовых помещений и ветеринарно-санитарных объектов на фермах, регулярное проведение работ по санации животноводческих помещений и территории ферм, правильное использование пастбищных угодий и водопойных сооружений для раздельного выпаса и поения животных неблагополучных и благополучных стад, исключающее распространение заболевания скота бруцеллезом;

обеспечивать размещение здорового скота, завозимого для комплектования стада оздоравливаемых хозяйств, только на фермах, полностью отвечающих ветеринарно-санитарным требованиям, и при наличии соответствующего разрешения ветеринарного органа области, края, республики, не имеющей областного деления;

создавать условия для изолированного содержания неблагополучных стад (отар) животных и обеспечивать надежное обеззараживание получаемой молочной продукции;

соблюдать необходимые меры предосторожности при заготовке кормов в местностях, неблагополучных по бруцеллезу животных, исключающие инфицирование этих кормов и заражение бруцеллезом животных при их использовании;

оказывать необходимую помощь ветеринарным специалистам в проведении диагностических исследований и прививок животных против бруцеллеза, дезинфекционных работ, выделять им транспорт и подсобных рабочих, а также обеспечивать доставку патологического материала на исследование в ветеринарную лабораторию;

приобретать специальную одежду и спецобувь, предметы личной гигиены, необходимые для защиты работников ферм от заражения бруцеллезом;

принимать меры к оздоровлению от бруцеллеза скота личных подсобных хозяйств граждан, проживающих на территории колхозов, совхозов и в сельских населенных пунктах, с целью недопущения распространения болезни и заражения животных хозяйства.

3.7. Сельскохозяйственные и ветеринарные органы областей, краев и республик:

организуют обучение ветеринарных и зоотехнических специалистов по вопросам организации и проведения профилактических и оздоровительных мероприятий, а также освоению ими новых средств и методов диагностики бруцеллеза и специфической защиты животных;

организуют внедрение передового опыта борьбы с бруцеллезом;

при необходимости создают в районах, неблагополучных по бруцеллезу, специальные группы ветеринарных работников для выполнения работы по массовым исследованиям на бруцеллез животных;

организуют совместно с медицинскими организациями разъяснительную работу среди животноводов и населения о мерах борьбы с бруцеллезом животных и правилах личной гигиены, издание в этих целях соответствующих плакатов, листовок, передачи по местному радио и телевидению.

3.8. Животноводческую ферму (бригаду, отделение хозяйства), населенный пункт признают оздоровленными от бруцеллеза при отсутствии в них больных животных и при условии выполнения мероприятий, предусмотренных настоящей Инструкцией. Об этом составляют акт, на основании которого главный ветеринарный врач района (города) вносит в исполком районного (городского) Совета народных депутатов представление о снятии с неблагополучного пункта ограничений по бруцеллезу.

Проверку выполнения оздоровительных мероприятий в неблагополучном по бруцеллезу хозяйстве (населенном пункте) перед снятием ограничений проводят комиссионно с участием представителя ветеринарного органа области (края, республики, не имеющей областного деления) и главного государственного санитарного врача района.

3.9. Неблагополучные по бруцеллезу пункты берут на учет и сведения о них указывают в отчетах о заразных болезнях животных формы N 1-вет (месячная).

Пункт считают неблагополучным с момента установления в нем бруцеллеза животных и до момента его ликвидации и снятия ограничений.

Количество неблагополучных по бруцеллезу пунктов показывают отдельно по каждому виду животных (крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи, верблюды, олени, пушные звери). Например, если в одном и том же пункте имеет место заболевание крупного рогатого скота и овец (коз) бруцеллезом, то в отчете указывают один пункт, неблагополучный по бруцеллезу крупного рогатого скота (в разделе "Болезни крупного рогатого скота"), и один пункт, неблагополучный по бруцеллезу овец (в разделе "Болезни овец").

3.10. Для оперативного решения вопросов, связанных с оздоровлением животноводства от бруцеллеза при возникновении заболевания животных в благополучных районах (областях, краях, республиках), а также при организации мероприятий в местностях, оздоравливаемых от этой болезни скота, рекомендуется создавать в установленном порядке районные, областные, краевые, республиканские комиссии из числа ответственных работников советских, сельскохозяйственных и планирующих органов, здравоохранения, мясо-молочной промышленности и других организаций.

**4. Профилактика бруцеллеза**

4.1. В благополучных по бруцеллезу хозяйствах (фермах), населенных пунктах, районах, областях, краях и республиках планомерно осуществляют комплекс профилактических мер, направленных на создание высокой санитарной культуры ведения животноводства, недопущение заноса возбудителей бруцеллеза в стада животных и обеспечение их благополучия, устанавливают постоянный ветеринарный надзор за состоянием поголовья, перегруппировками, поступлением и выбытием скота, выполнением на фермах ветеринарно-санитарных правил.

4.2. В целях предотвращения заболевания животных бруцеллезом в благополучных хозяйствах (на фермах) и в населенных пунктах правления колхозов, директора совхозов, руководители животноводческих комплексов и других хозяйств и предприятий, граждане - владельцы животных в соответствии с Ветеринарным уставом Союза ССР обязаны:

4.2.1. Не допускать ввода животных из других хозяйств и населенных пунктов, а также перемещения животных внутри хозяйства без разрешения ветеринарных специалистов.

Завоз животных из неблагополучных по бруцеллезу хозяйств в благополучные по этой болезни хозяйства (фермы), населенные пункты запрещается.

Благополучие поступающих животных должно быть подтверждено ветеринарным свидетельством или справкой ветеринарной службы (при поступлении из хозяйств того же административного района) с отметкой в них даты, метода и результатов исследования на бруцеллез перед выводом животных из хозяйств-поставщиков.

4.2.2. Всех поступающих в хозяйство животных содержать на карантине в течение 30 дней. В период карантина животные подлежат исследованию на бруцеллез серологическими методами (РБП или РА, РСК, РДСК), мелкий рогатый скот дополнительно исследуют аллергически, а баранов-производителей и пробников также на инфекционный эпидидимит. В общее стадо животных вводят только после установления благополучия всего поголовья по бруцеллезу (при получении у каждого из них отрицательных результатов лабораторного и клинического исследования) и с разрешения ветеринарного врача или фельдшера, обслуживающего хозяйство (населенный пункт).

В случае если в период карантина среди введенных в хозяйство животных выявлены реагирующие, принимают меры в соответствии с пунктом 2.6 к уточнению диагноза и при установлении бруцеллеза все поголовье группы подвергают убою. В порядке исключения, племенных (крупный рогатый скот) животных с отрицательными реакциями с разрешения ветеринарного органа области (края, республики, не имеющей областного деления) в неблагополучных по бруцеллезу районах передают в неблагополучное по бруцеллезу хозяйство, где их содержат обособленной группой и оздоравливают.

4.2.3. Не допускать контакта животных со скотом неблагополучных по бруцеллезу хозяйств (ферм), населенных пунктов, не разрешать персоналу, обслуживающему животных, посещать неблагополучные по бруцеллезу фермы (скотные дворы).

4.2.4. По требованию ветеринарных специалистов, обслуживающих хозяйство (населенный пункт), предъявлять животных для осмотра, диагностических исследований, предохранительных прививок, выделяя для этих целей рабочих, а также создавать ветеринарным работникам необходимые условия для проведения ветеринарных мероприятий.

4.2.5. Обеспечивать выполнение ветеринарно-санитарных и зоогигиенических норм и правил кормления, содержания, использования животных и ухода за ними.

4.2.6. В случае аборта, преждевременных родов или при появлении у животных признаков наступающего аборта, преждевременных родов и других признаков, вызывающих подозрение на бруцеллез, таких животных немедленно изолировать от общего стада в отдельное помещение и об этом сообщить ветеринарному врачу или фельдшеру, обслуживающему хозяйство.

4.3. Ветеринарный специалист, обслуживающий хозяйство или населенный пункт, при первом появлении у животных признаков, вызывающих подозрение на бруцеллез, обязан немедленно принять меры к установлению диагноза или к исключению заболевания этой болезнью (см. раздел 2), а также сообщить санэпидстанции о возникновении подозрения.

4.4. В целях своевременного выявления заболевания животных бруцеллезом в благополучных хозяйствах и населенных пунктах в плановом порядке проводят профилактические диагностические исследования животных.

Планы диагностических исследований ежегодно утверждает соответственно ветеринарный отдел областного (краевого) управления сельского хозяйства, министерства сельского хозяйства автономной республики, главное управление (управление) ветеринарии министерства сельского хозяйства союзной республики, не имеющей областного деления.

4.5. Обязательному исследованию на бруцеллез подвергают коров, телок перед осеменением и после него, овцематок, оставшихся без ягнят (РБП, или РА, или аллергеном), основных свиноматок (РБП, или РСК, или аллергеном), а также быков, хряков и баранов-производителей.

4.6. Профилактическим диагностическим исследованиям на бруцеллез подвергают животных, благополучных по этой болезни, в порядке, указанном в подпунктах 4.6.1 - 4.6.6.

4.6.1. Один раз в год:

1. крупный рогатый скот в хозяйствах всех категорий, кроме, случаев, предусмотренных подпунктами 4.6.2 - 4.6.4;

2. овец (коз и свиней) в племенных хозяйствах (на племенных заводах, фермах) и в хозяйствах (на фермах), поставляющих животных для комплектования стада животноводческих комплексов;

3. овец (коз) во всех хозяйствах при отгонном ведении овцеводства; в хозяйствах, расположенных в неблагополучных по бруцеллезу овец районах, а также в благополучных районах, - в хозяйствах, территориально граничащих с хозяйствами районов, неблагополучных по бруцеллезу мелкого рогатого скота.

Серологические исследования (РБП или РА) крупного рогатого скота в хозяйствах (за исключением племенных хозяйств, хозяйств, поставляющих животных для комплектования стада животноводческих комплексов, и хозяйств, поставляющих молоко в детские и лечебные медицинские учреждения, санатории, дома отдыха и торговую сеть по прямым связям), расположенных в районах, благополучных по бруцеллезу в течение четырех и более лет и находящихся в составе благополучных областей (краев, республик без областного деления), разрешается проводить один раз в два года. Коров, кроме того, рекомендуется периодически (один раз в полгода) проверять по кольцевой реакции с молоком.

4.6.2. Два раза в год:

крупный рогатый скот в хозяйствах всех категорий (кроме откормочных хозяйств), расположенных в неблагополучных по бруцеллезу районах; в хозяйствах всех категорий при отгонном ведении животноводства; в благополучных районах - в хозяйствах, территориально граничащих с неблагополучными по этой болезни скота пунктами соседних неблагополучных районов.

4.6.3. На благополучных фермах, входящих в состав неблагополучных хозяйств, исследованиям на бруцеллез подвергают коров, быков и баранов-производителей не реже двух раз в год, телок - перед осеменением и после него, ярок - один раз перед осеменением, взрослых овцематок - после окота. Взрослое откормочное поголовье крупного и мелкого рогатого скота, содержащееся на таких фермах, исследуют перед выводом на убой, но не более чем за 30 дней до вывода.

4.6.4. Откормочный крупный и мелкий рогатый скот, содержащийся в специализированных откормочных хозяйствах, на бруцеллез проверяют в хозяйствах, территориально граничащих с неблагополучными по бруцеллезу пунктами, а также расположенных в неблагополучных районах или в районах отгонного животноводства.

Исследованиям подвергают взрослое поголовье крупного рогатого скота и овец (коз), животных исследуют серологическим или аллергическим методом перед выводом на убой, но не более чем за 30 дней до вывода.

4.6.5. Мелкий рогатый скот и свиней в хозяйствах, не перечисленных выше, и в случаях, не предусмотренных настоящей Инструкцией, исследованиям на бруцеллез подвергают в зависимости от эпизоотологических показаний.

4.6.6. Крупный и мелкий рогатый скот, принадлежащий гражданам, проживающим на территории хозяйств и в отдельных населенных пунктах, исследуют на бруцеллез в том же порядке, как указано в пункте 4.5 и подпунктах 4.6.1 - 4.6.3 и 4.6.5.

4.6.7. Диагностическим исследованиям (РДСК) на инфекционный эпидидимит подвергают баранов-производителей один раз в год (перед началом случной кампании) в племенных хозяйствах, на племенных заводах, фермах, станциях и предприятиях по искусственному осеменению животных.

4.7. Для продажи или перевода в другие хозяйства при межхозяйственном обмене для племенных и производственных целей животных (крупный рогатый скот, буйволов, овец, коз, свиней, верблюдов, оленей) разрешается отбирать только в хозяйствах, благополучных по бруцеллезу не менее 12 месяцев. Отобранных животных до вывода отделяют от других животных хозяйства, ставят на месячный профилактический карантин и исследуют на бруцеллез однократно серологическими методами (РБП или РА, РСК, РДСК), мелкий рогатый скот дополнительно исследуют аллергически, а баранов, кроме того, исследуют на ИЭ (РДСК). Вывод животных разрешается не позднее чем через 30 дней после исследования и при получении отрицательных результатов исследования по всей выводимой группе.

Крупный и мелкий рогатый скот, привитый противобруцеллезными вакцинами, выводить (вывозить) для племенных целей из хозяйств запрещается.

**5. Ветеринарно-санитарные мероприятия**

5.1. В хозяйствах, неблагополучных по бруцеллезу животных, запрещается:

5.1.1. Ввод приобретенных и других вновь поступивших животных (за исключением производителей) на неблагополучные по бруцеллезу фермы, в неблагополучные стада, отары. Ввод производителей допускается в каждом отдельном случае с разрешения главного ветеринарного врача района и с соблюдением соответствующих требований настоящей Инструкции лишь в стада скота мясного направления и отары овец.

5.1.2. Перегруппировка стад (отар) без разрешения ветеринарного специалиста, обслуживающего хозяйство (населенный пункт).

5.1.3. Содержание больных бруцеллезом животных в стадах и в общих животноводческих помещениях, а также создание любого рода временных и постоянных пунктов концентрации и ферм-изоляторов для передержки таких животных в хозяйствах.

Животных (всех видов), реагирующих при исследовании на бруцеллез, а также абортировавших, немедленно изолируют от другого поголовья и в течение 15 дней сдают на убой независимо от их племенной или производственной ценности.

Для временного содержания бруцеллезного скота до сдачи его на убой используют типовой изолятор для заразно больных животных, имеющийся на ферме (в хозяйстве), а при его отсутствии оборудуют отдельное изолированное помещение в соответствии с ветеринарно-санитарными требованиями. Такие помещения должны быть удалены не менее чем на 200 м от животноводческих и других производственных помещений фермы, огорожены сплошным забором на высоту 2 м, оборудованы дезбарьером у въезда на территорию и входа в помещение, обеспечены водой и электроэнергией, иметь бытовые комнаты для работающих. Для ухода за больными животными закрепляют отдельный обслуживающий персонал.

Имеющиеся пункты концентрации или фермы-изоляторы бруцеллезного скота, которые были созданы в отдельных хозяйствах до издания настоящей Инструкции, подлежат ликвидации в сроки, установленные Министерством сельского хозяйства СССР.

5.1.4. Использование больных бруцеллезом животных и полученного от них приплода для воспроизводства стада.

5.1.5. Вывоз сырого молока, полученного от коров неблагополучного по бруцеллезу стада (фермы), для продажи на рынках, в столовые и т.д.

Молоко от коров, имеющих клиническое проявление болезни (аборт и проч.), обеззараживают путем добавления в него 5% формальдегида, креолина или другого дезинфицирующего вещества, имеющего запах. Использование этого молока на пищевые цели и в корм животным запрещается.

Молоко от коров, реагирующих при исследовании на бруцеллез, во всех случаях (см. раздел 2.6.11 настоящей Инструкции) подлежит обеззараживанию путем переработки на топленое масло-сырец или кипячением. Выработку масла в хозяйствах производят в отдельном помещении с соблюдением условий, исключающих инфицирование его возбудителем болезни и отвечающих санитарным требованиям на производство пищевых продуктов. Масло-сырец вывозят на маслозавод в закрытой маркированной таре с указанием на бирке: "Топленое масло-сырец, неблагополучное по бруцеллезу, подлежит переработке". Кипяченое молоко разрешается использовать на пищевые цели, при этом поставка его в лечебно-профилактические, детские и школьные учреждения не допускается.

Молоко (сливки) от не реагирующих при исследовании на бруцеллез коров неблагополучного стада (фермы) подлежит обеззараживанию непосредственно в хозяйстве путем пастеризации при температуре 70° в течение 30 минут или при температуре 85 - 90° в течение 20 секунд, а при отсутствии пастеризаторов - кипячению. После обеззараживания молоко вывозят на молокозавод или используют внутри хозяйства.

В отдельных случаях, когда молоко не может быть подвергнуто обеззараживанию в хозяйстве (на отгонных пастбищах, во временных летних лагерях), с разрешения ветеринарного отдела областного (краевого) управления сельского хозяйства (управления ветеринарии министерства сельского хозяйства республики, не имеющей областного деления) и главного государственного санитарного врача области (края, республики) по согласованию с областным (краевым) производственным управлением молочной промышленности (министерством мясной и молочной промышленности республики, не имеющей областного деления) допускают вывоз его в сыром виде непосредственно на молокозавод (маслозавод), где подвергают обеззараживанию путем пастеризации при температуре 70° в течение 30 минут или при температуре 85 - 90° в течение 20 секунд.

Хозяйства, которым разрешен вывоз молока на молокозаводы без предварительного обеззараживания, должны находиться на особом учете у главного ветеринарного врача района, санитарно-эпидемиологической станции и на молочном заводе, к которому прикреплены такие хозяйстве.

Для перевозки сырого молока на молокозаводы должны быть выделены специальные цистерны или бидоны, которые после наполнения их молоком пломбируют, а на бирках указывают: "Молоко, неблагополучное по бруцеллезу, подлежит обеззараживанию". Опломбирование молочных емкостей возлагают на заведующего фермой или на лицо, его замещающее. В сопроводительном документе (справке) установленной формы, выдаваемом ветеринарным специалистом, обслуживающим хозяйство, указывают, из какого хозяйства отправлено молоко, сколько и количество мест.

На молокозаводах цистерны или бидоны после слива из них молока подлежат промывке и дезинфекции в установленном порядке.

В хозяйствах, а также на молочных заводах (маслозаводах) ведут специальные журналы, в которых учитывают количество поступившего молока (обрата) и отмечают способ и режим его обеззараживания.

Доильные аппараты и молочную посуду ежедневно моют и дезинфицируют струей пара мощностью 200 г в минуту в течение 7 минут на флягопропаривателе или в ванне для дезинфекции доильных аппаратов или 0,5-процентным горячим раствором дезмола при экспозиции 5 минут.

Фильтрующий материал, полотенца и спецодежду обеззараживают кипячением в течение 5 минут. Для дезинфекции можно использовать гипохлорит кальция, хлорную известь, хлорамин в смеси с моющими средствами, один литр рабочего раствора этих препаратов должен содержать не менее 500 мг активного хлора.

5.1.6. Использование сырого молока (кроме молозива), полученного от коров неблагополучного стада (фермы), и обрата для кормления молодняка животных.

Молоко и обрат (в том числе поступающий с молочного завода), предназначенные для использования в корм животных, подлежат обеззараживанию путем пастеризации или термической обработки острым паром при температуре, как указано в п. 5.1.5.

Молочным заводам (маслозаводам) разрешается отпускать хозяйствам обрат только после повторного обеззараживания путем пастеризации или термической обработки острым паром при указанных выше режимах.

Районная ветеринарная лаборатория обязана не реже одного раза в декаду контролировать на молочных предприятиях качество обеззараживания обрата по методикам согласно ГОСТ 3523-73 "Молоко и молочные продукты. Методы определения пастеризации".

5.1.7. Доение овец и коз, обработка (сушка, чистка и пр.) недезинфицированных смушковых шкурок, а также заготовка сычугов и тушек ягнят на фермах, неблагополучных по бруцеллезу.

Смушковые шкурки сразу после снятия их с тушки подвергают дезинфекции и консервированию в соответствии с Инструкцией по дезинфекции сырья животного происхождения и предприятий по его заготовке, хранению и обработке, а тушки утилизируют на заводе по производству мясо-костной муки или сжигают.

5.1.8. Использование для здоровых животных пастбищных участков, на которых выпасались неблагополучные по бруцеллезу стада (отары), в течение двух месяцев в летнее время в южных районах и трех месяцев - в остальных районах СССР.

Сено, убранное с таких участков, подлежит хранению в течение двух месяцев, после чего его скармливают животным. Вывозу за пределы хозяйства это сено не подлежит.

5.1.9. Использование непроточных водоемов для водопоя здорового скота в течение трех месяцев после прекращения поения в них больных бруцеллезом животных.

5.1.10. Использование для кормления зверей мяса, мясных и других продуктов в необеззараженном виде, полученных при убое больных бруцеллезом животных в хозяйстве и на предприятиях мясоперерабатывающей промышленности.

5.1.11. Ввод здорового скота в помещения, в которых ранее содержались больные животные, до проведения тщательной механической очистки, санитарного ремонта, дезинфекции помещений, выгульных дворов и других объектов, а также дезинсекции и дератизации.

В летнее время скотные дворы (кошары, свинарники и др.) очищают от навоза, дезинфицируют и оставляют с открытыми окнами и дверями на все лето.

Здоровый скот в такие помещения допускается с разрешения главного ветеринарного врача района после проведения мероприятий по их санации.

5.1.12. Вывод (вывоз) крупного рогатого скота, буйволов, овец, коз, свиней, оленей, верблюдов (в том числе содержащихся в хозяйственно обособленных благополучных по бруцеллезу отделениях, бригадах, фермах) для племенных и производственных целей в другие хозяйства, а также для показа на выставках (выводках) животных до полной ликвидации бруцеллеза в хозяйстве и в течение 12 месяцев после снятия ограничений.

5.2. Все животные должны быть пронумерованы.

Животных неблагополучного по бруцеллезу стада (отары) содержат изолированно от поголовья благополучных стад (отар) хозяйства, фермы, отделения. Ведут учет всех случаев абортов, преждевременных родов, задержания последа.

Отелы (окот) проводят в родильном отделении. При отсутствии типового помещения для проведения отелов (окота) выделяют и оборудуют отдельное помещение или отводят часть скотного двора, изолированную капитальной стеной.

В случае абортов место, загрязненное околоплодной жидкостью, после предварительной дезинфекции засыпают опилками (торфом, сенной трухой и т.п.), а затем опилки собирают вместе с плодом (после взятия материала для лабораторного исследования) и последом, убирают в непроницаемую тару (железный ящик и т.п.) для последующего сжигания или закапывания на скотомогильнике. Абортировавшее животное переводят в изолятор и место, где оно содержится, ежедневно тщательно дезинфицируют.

5.3. Животных, реагирующих при исследовании на бруцеллез, разрешается перевозить на мясокомбинаты по железной дороге, водным транспортом и на автомашинах с непроницаемым кузовом при строгом соблюдении ветеринарно-санитарных правил и под контролем ветеринарного специалиста, руководствуясь ветеринарно-санитарными требованиями при перевозке животных на особых условиях, утвержденными Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР. Животных, принадлежащих гражданам, перевозят на мясокомбинат на автомашинах. Перегон животных на мясокомбинаты, а также сдача на скотоприемные базы и в скотооткормочные хозяйства запрещается. После перевозки животных на мясокомбинат (убойный пункт) транспорт подвергают дезинфекции в установленном порядке.

Убой больных бруцеллезом животных на месте (в хозяйстве) проводят на оборудованном убойном пункте (площадке) под контролем ветеринарного врача с соблюдением рабочими мер личной профилактики и выполнением требований, обеспечивающих недопущение разноса инфекции.

По вопросам убоя этих животных и использования мяса, мясных и других продуктов, полученных при убое, руководствуются Правилами ветеринарно-санитарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясопродуктов, а по вопросам обработки и использования шкур, шкурок (смушковых), шерсти - Инструкцией по дезинфекции сырья животного происхождения и предприятий по его заготовке, хранению и обработке.

5.4. Стрижку овец и коз неблагополучных отар проводят в последнюю очередь. Для выполнения работы подбирают лиц, привитых против бруцеллеза, подростков до 18 лет, беременных и кормящих женщин не допускают. Помещения, площадки и стригальный инструмент, спецодежду персонала после окончания стрижки очищают и дезинфицируют. Рабочие (стригали и др.) после работы проходят санитарную обработку.

Шерсть, полученную от овец (коз) неблагополучных по бруцеллезу отар (стад), подвергают в хозяйстве обеззараживанию бромистым метилом под пленкой в соответствии с Инструкцией по дезинфекции шерсти, неблагополучной по бруцеллезу и ящуру, бромистым метилом, после чего ее вывозят без ограничений.

При отсутствии в хозяйстве условий для обеззараживания шерсти допускается вывоз ее непосредственно на фабрику первичной обработки шерсти для горячей мойки или для дезинфекции бромистым метилом. При этом шерсть упаковывают в двойную тару, к каждому тюку прикрепляют бирку, на которой делают надпись: "Шерсть, неблагополучная по бруцеллезу, подлежит обеззараживанию". В ветеринарном свидетельстве указывают, что шерсть получена от овец (коз) неблагополучной по бруцеллезу отары (стада). Горячую мойку производят без предварительной сортировки шерсти при температуре не ниже 55 °C с последующей сушкой при температуре 75 - 80 °C. После горячей мойки или дезинфекции бромистым метилом шерсть допускается к обработке без ограничений.

5.5. В животноводческих помещениях и на территории вокруг них, где содержится неблагополучное поголовье, необходимо соблюдать чистоту и строго выполнять правила содержания животных и ухода за ними, проводить текущую, а перед снятием ограничений - заключительную дезинфекцию помещений, загонов, выгульных площадок, оборудования, инвентаря и других объектов, а также дезинсекцию, дератизацию, санитарный ремонт животноводческих помещений и другие ветеринарно-санитарные мероприятия в соответствии с Инструкцией по проведению ветеринарной дезинфекции, дезинвазии, дезинсекции и дератизации.

5.5.1. Для дезинфекции в хозяйствах применяют: 20-процентную взвесь свежегашеной извести; осветленный раствор хлорной извести, содержащий 2% активного хлора; 2-процентный горячий раствор едкого натра; 3-процентный горячий раствор сернокарболовой смеси; 5-процентную эмульсию ксилонафта (комнатной температуры); 5-процентную эмульсию нафтализола; 2-процентный раствор формальдегида - эти средства применяют при экспозиции 1 час; 5-процентный горячий раствор кальцинированной соды; 0,5-процентный раствор глутарового альдегида; 3-процентную водную эмульсию феносмолина; 1,5-процентный раствор метафора, 5-процентный раствор технического фенолята натрия; раствор тексанита, содержащий 5% активного хлора, - при экспозиции 3 часа.

Для дезинфекции помещений в условиях минусовых температур (до -20 °C) применяют 6-процентную эмульсию феносмолина, подогретую до 70 °C, из расчета 1 л/кв. м, двукратно с интервалом между обработками 30 мин. при общей экспозиции 5 часов.

Для аэрозольной дезинфекции помещений в отсутствие животных применяют 40-процентный водный раствор формальдегида из расчета 20 мл/куб. м при экспозиции 24 часа, а для дезинфекции ограниченных площадей (боксов, станков и т.п.) - препарат глак согласно наставлению по его применению.

Навоз подлежит обеззараживанию биотермическим способом. Жидкий навоз обеззараживают химическим способом (с помощью формальдегида - 3 кг на 1 куб. м жидкого навоза при экспозиции 72 часа и гомогенизации в течение 6 часов) или тепловой обработкой с помощью пароструйных установок при температуре 130° и давлении 2 атм. в течение 10 минут. Навоз из кошар, если он предназначен для изготовления кизяка, вырезают и складывают в огороженное место для высушивания на солнце, после чего используют на топливо без ограничения.

Для дезинфекции поверхностного слоя почвы применяют: 10-процентный водный раствор керола или гудронола из расчета 10 л на 1 кв. м, или 3-процентный раствор формальдегида из расчета 5 л на 1 кв. м, или дуст тиазона из расчета 200 г на 1 кв. м при экспозиции 5 суток.

**6. Оздоровление хозяйств, неблагополучных**

**по бруцеллезу крупного рогатого скота**

6.1. Методы оздоровления (см. пункт 1.5) неблагополучных по бруцеллезу ферм, хозяйств, населенных пунктов избирают в зависимости от течения бруцеллеза в стаде, на ферме с учетом эпизоотического состояния по бруцеллезу района, области, края, республики, в которых находится данный неблагополучный пункт.

6.2. При установлении впервые бруцеллеза у крупного рогатого скота в благополучных районах, областях, краях и республиках (не имеющих областного деления) оздоровление ферм осуществляют путем полной замены неблагополучного поголовья здоровым скотом. Всех животных стада (фермы), в котором выявлены больные, вместе с молодняком в течение 30 дней (не более) сдают на убой. Остальное поголовье животных, которые содержатся на других фермах данного хозяйства, двукратно с промежутком в 30 дней исследуют на бруцеллез серологическими методами (РБП или РА и РСК (РДСК)). Одновременно исследуют на бруцеллез теми же методами весь крупный рогатый скот в хозяйствах и населенных пунктах, смежных с неблагополучным хозяйством.

После вывода неблагополучного поголовья животных на убой на ферме проводят санацию помещений и территории (дезинфекция, механическая очистка, санитарный ремонт, дератизация, заключительная дезинфекция) и осуществляют комплекс других оздоровительных мер, предусмотренных настоящей Инструкцией, проверяют выполнение мероприятий, снимают ограничения по бруцеллезу с фермы (бригады, отделения хозяйства) и только затем на ферму вводят здоровых животных.

Вакцинацию против бруцеллеза животных в хозяйствах области (края, республики) не проводят.

6.3. В областях, краях и республиках с ограниченным распространением бруцеллеза, за исключением районов со значительным распространением бруцеллеза (см. пункт 6.4), оздоровление крупного рогатого скота проводят без применения противобруцеллезных вакцин в следующем порядке.

6.3.1. Поголовье стада (фермы) с острым течением бруцеллеза (аборты, значительное количество реагирующих) сдают на убой вместе с молодняком; в данном и других хозяйствах и населенных пунктах проводят мероприятия, как указано в пункте 6.2.

6.3.2. При оздоровлении неблагополучных стад (ферм), в которых отмечается хроническое течение бруцеллеза, применяют метод полной замены неблагополучного поголовья здоровым скотом. При отсутствии такой возможности проводят однократное аллергическое и одновременно серологическое исследование животных и затем у животных каждые 25 - 30 дней берут кровь для исследования на бруцеллез (РБП или РА и РСК (РДСК)); положительно реагирующих животных изолируют вместе с полученным от них молодняком (см. пункт 5.1.3), метят и затем сдают на убой. При получении по всему стаду двукратного подряд отрицательного результата исследования животных оставляют под контрольным наблюдением в течение 6 месяцев. За этот период проводят 2 контрольных исследования (РБП или РА и РСК (РДСК)) на бруцеллез с промежутком в 3 месяца. При отсутствии в течение этого времени абортов бруцеллезного происхождения и при отрицательных результатах контрольных исследований стадо считают благополучным по бруцеллезу.

В случае если при контрольных исследованиях вновь выявляются положительно реагирующие животные, их удаляют из стада, а остальных продолжают исследовать в порядке, указанном выше, и оставляют еще раз под контрольным наблюдением в течение 6 месяцев или животных всего стада вместе с молодняком подвергают убою.

Если в стаде произошли аборты бруцеллезной этиологии, животных всего стада исследовать прекращают и вместе с молодняком сдают на убой.

Телок и бычков, родившихся от условно здоровых коров оздоравливаемого стада до постановки стада под контрольное наблюдение, содержат изолированными группами, ставят на откорм, на бруцеллез не исследуют и затем подвергают убою. Телок осеменять запрещается.

Молодняк, полученный от условно здоровых коров в период контрольного наблюдения за стадом, содержат изолированно от взрослого скота. В случае признания стада оздоровленным молодняк выращивают в обычном порядке.

6.4. В областях, краях, республиках (без областного деления) со значительным распространением бруцеллеза и в таких районах, находящихся в областях (краях, республиках) с ограниченным распространением этого заболевания, оздоровительные мероприятия проводят в следующем порядке.

6.4.1. Стада (фермы) с хроническим течением бруцеллеза оздоравливают путем систематических диагностических исследований неблагополучного поголовья с удалением из стада и убоем больных. Исследования животных проводят в порядке, указанном в пункте 6.3.2.

Молодняк, полученный от больных коров, передержке не подлежит, его подвергают убою вместе с коровами-матерями.

Бычков, родившихся от условно здоровых коров, содержат изолированной группой, откармливают и сдают на убой.

Телок, родившихся от условно здоровых коров оздоравливаемого стада, содержат в изолированном телятнике и выкармливают 10 дней молоком матери, а потом молоком от здоровых коров (благополучного стада) или пастеризованным молоком. С 3 - 4-месячного возраста телят исследуют на бруцеллез однократно комплексно серологическим и аллергическим методами и далее через каждые 25 - 30 дней - серологическим методом (РБП или РА и РСК (РДСК)) до получения отрицательных результатов по группе, после чего их выводят на отдельную ферму. При выделении положительно реагирующих их сдают на убой. Допускается телок иммунизировать противобруцеллезной вакциной в порядке, предусмотренном наставлением по применению соответствующей вакцины.

6.4.2. Поголовье стада (фермы) с острым течением бруцеллеза (аборты у коров и нетелей) или массовым поражением болезнью вместе с молодняком сдают на убой. После санации помещений и территории, проведения других оздоровительных мероприятий и снятия ограничений по бруцеллезу на ферму вводят здоровых животных.

В районах и областях (краях, республиках без областного деления) со значительным распространением бруцеллеза при отсутствии возможности скорой замены неблагополучного поголовья здоровым скотом и в целях предотвращения абортов у животных в таком стаде (на ферме) всех коров прививают противобруцеллезной вакциной из штамма 19 и затем их сдают на убой в течение ближайшего времени. В этот период бычков доращивают и сдают на убой, телок прививают 2 раза также вакциной из штамма 19 (в возрасте 3 - 6 мес. и за 2 мес. до осеменения) и используют только на данной ферме до замены всего неблагополучного поголовья здоровыми животными. Коров допускается ревакцинировать этой же вакциной через 2 года после прививки (без исследования на бруцеллез). Молоко, полученное от коров стада (фермы), подлежит обеззараживанию путем переработки на топленое масло-сырец или кипячением и использованию в порядке, как указано в подпункте 5.1.5.

6.5. В благополучных хозяйствах (на фермах) и населенных пунктах принимают меры по профилактике бруцеллеза. Исследования на бруцеллез животных проводят в порядке, как указано в пунктах 4.5 и 4.6. В районах со значительным распространением бруцеллеза телок на фермах допускается прививать противобруцеллезной вакциной согласно наставлению по применению соответствующей вакцины.

6.6. В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах, занимающихся мясным скотоводством, оздоровление проводят, как указано в пунктах 6.3 и 6.4. Телок прививают противобруцеллезной вакциной в возрасте 3 - 6 месяцев однократно (до отъема) или двукратно (в возрасте 3 - 6 мес. за 2 мес. до случки).

6.7. На комплексах по производству молока, мяса и других продуктов животноводства на промышленной основе, а также на комплексах, в специализированных хозяйствах и на фермах по направленному выращиванию телок (нетелей) строго выполняют ветеринарно-санитарные правила для таких предприятий, утвержденные Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР. При установлении бруцеллеза оздоровительные мероприятия проводят в следующем порядке.

6.7.1. На комплексах по производству молока оздоровление стада осуществляют в порядке, указанном в подпунктах 6.3.2 или 6.4.1. При этом при проведении исследований на бруцеллез животных из общего стада немедленно удаляют положительно реагирующих и целиком отдельные неблагополучные группы животных.

При остром течении болезни (аборты) и в случае массового выделения положительно реагирующих животных все поголовье комплекса подлежит замене здоровыми животными. Ветеринарные мероприятия проводят в порядке, указанном в подпунктах 6.3.1 или 6.4.2 (в районах со значительным распространением бруцеллеза).

6.7.2. На комплексах, фермах и в специализированных хозяйствах по направленному выращиванию телок (нетелей) телят с 4-месячного возраста исследуют на бруцеллез серологическими методами (РБП или РА и РСК (РДСК)) и аллергически. Положительно реагирующих животных сдают на убой, остальных животных продолжают исследовать и с ними в дальнейшем поступают в порядке, предусмотренном подпунктом 6.3.2 (абзацы 1 и 2). В районах со значительным распространенном болезни телок допускается прививать противобруцеллезной вакциной (см. подпункт 6.4.1).

6.7.3. На комплексах по производству говядины и в других откормочных хозяйствах при установлении бруцеллеза все поголовье неблагополучного стада (группы) сдают на убой. На комплексе (в хозяйстве) проводят санацию помещений и территории и после снятия ограничений вводят здоровых животных.

6.8. При установлении у крупного рогатого скота заболеваний бруцеллезом и туберкулезом (двойная инфекция) оздоровление стада (фермы) проводят в зависимости от степени поражения поголовья животных этими болезнями, руководствуясь настоящей Инструкцией и Инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации туберкулеза животных.

6.9. Коров и телок случного возраста в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах осеменяют искусственно спермой здоровых производителей, за исключением животных мясного направления, в отношении которых допускается естественное осеменение.

6.10. Перед снятием ограничений с неблагополучной по бруцеллезу фермы (бригады, отделения хозяйства), населенного пункта весь крупный рогатый скот (в т.ч. животных, подвергающихся вакцинации против бруцеллеза, за исключением случая, предусмотренного подпунктом 6.4.2), находящийся на данной ферме (в бригаде, на отделении), в населенном пункте, а также животных других видов (включая собак), имевших контакт с животными неблагополучного стада (фермы), исследуют на бруцеллез серологическими методами (РА и РСК (РДСК)). Ограничения снимают только по получении отрицательных результатов исследований и выполнении всех мероприятий, предусмотренных настоящей Инструкцией.

**7. Оздоровление хозяйств, неблагополучных**

**по бруцеллезу овец (коз)**

7.1. При установлении впервые заболевания овец и коз бруцеллезом в благополучных по бруцеллезу районах, областях, краях, республиках (без областного деления) всех животных неблагополучной отары (стада) вместе с молодняком подвергают немедленному убою. Проводят санацию помещений и территории фермы. Оставшееся в хозяйстве поголовье овец (коз) двукратно с промежутком в 30 дней исследуют на бруцеллез серологическими (РБП или РА и РСК (РДСК)) и аллергическим методами. В крупных овцеводческих хозяйствах (поголовье более 30 тыс.) допускается проведение исследований не менее 10 процентов поголовья каждой отары, а также всех овцематок, оставшихся без ягнят, и баранов-производителей.

В данном хозяйстве в течение последующих двух лет проводят исследование овцематок (коз) после окота и производителей (серологически или аллергически).

Вакцинацию против бруцеллеза овец (коз) в хозяйствах области, края, республики (за исключением районов отгонного овцеводства) не проводят.

7.2. В областях, краях и республиках (без областного деления) с ограниченным распространением бруцеллеза (за исключением районов со значительным распространением болезни) овец (коз) неблагополучных отар сдают на убой вместе с молодняком. В первую очередь сдают на убой животных отар (стад), в которых наблюдается острое течение инфекции. В хозяйствах поступают, как указано в пунктах 7.1 и 4.6.

Оздоровление неблагополучного поголовья овец (коз) в крупных хозяйствах допускается проводить методом систематических исследований животных в порядке, указанном ниже в подпунктах 7.2.1 - 7.2.5.

7.2.1. Овец (коз) исследуют серологически (РБП или РА, РСК (РДСК)) и аллергически 2 - 4 раза через каждые 30 дней. Нереагирующих животных осеменяют и отару (стадо) оставляют под контрольным наблюдением до окончания следующего окота. Реагирующих при исследовании животных подвергают убою.

При отсутствии клинических проявлений бруцеллеза у овец (коз) и при отрицательных результатах серологического исследования, проведенного по окончании окота, отару (стадо) считают оздоровленной от бруцеллеза.

7.2.2. Из ярок (козочек), полученных от овец (коз) оздоравливаемых отар, формируют самостоятельные отары. Через 1 - 2 месяца после отбивки от маток ярок исследуют серологически (РБП или РА и РСК (РДСК)) и аллергически и затем каждые 30 дней аллергическим методом до получения по отаре отрицательных результатов исследований. Нереагирующих животных осеменяют и оставляют под контрольным наблюдением до первого окота. При отсутствии клинических признаков болезни у овец (коз) и при отрицательных результатах серологического исследования на бруцеллез животных, проведенного по окончании окота, отару считают благополучной по бруцеллезу.

7.2.3. Баранчиков, полученных от овец неблагополучных отар, для воспроизводства не оставляют, их доращивают и сдают на убой.

7.2.4. При установлении бруцеллеза в отарах (группах) баранов-производителей или пробников всех животных сдают на убой или подвергают убою только реагирующих, а остальных животных исследуют через каждые 30 дней серологически (РБП или РА и РСК (РДСК)) и аллергически до получения двукратного подряд отрицательного результата по отаре (группе). После этого всю отару (группу) содержат обособленно и через 6 месяцев исследуют на бруцеллез теми же методами. При отсутствии у животных клинических признаков болезни и при отрицательных результатах исследований отару (группу) признают благополучной по бруцеллезу.

7.2.5. Овец и коз в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах осеменяют искусственно спермой здоровых производителей.

В отары для покрытия овец допускают здоровых баранов (козлов), которых после окончания случной кампании формируют в самостоятельные отары (группы). Через 30 - 45 дней после отбивки из маточных отар животных исследуют на бруцеллез серологически (РБП или РА и РСК (РДСК)) и аллергически два раза с интервалом в 30 дней. При отсутствии клинических проявлений бруцеллеза у животных и при двукратных подряд отрицательных результатах исследования отару (группу) считают благополучной по бруцеллезу и в дальнейшем баранов исследуют за 1 месяц до использования их в случной кампании.

Если у баранов при исследовании на бруцеллез будут получены положительные реакции, то с животными поступают, как указано в подпункте 7.2.4.

7.3. В районах со значительным распространением бруцеллеза мелкого рогатого скота, в том числе находящихся в составе областей (краев, республик, не имеющих областного деления) с ограниченным распространением этой болезни, оздоровление поголовья овец (коз) в неблагополучных пунктах проводят в порядке, как указано в пункте 7.2.

7.3.1. В таких районах, а также в областях (краях, республиках, не имеющих областного деления) со значительным распространением бруцеллеза мелкого рогатого скота и в районах отгонного овцеводства в борьбе с бруцеллезом допускается применять противобруцеллезные вакцины для иммунизации овец (коз). При использовании вакцин в хозяйствах и населенных пунктах осуществляют полный комплекс мер, предусмотренный настоящей Инструкцией.

7.3.2. В районах, где применяют вакцину из штамма Рев-1, этой вакциной иммунизируют только ярок (козочек).

В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах овец (коз) отар, где произошла острая вспышка бруцеллеза (аборты, массовое выделение реагирующих), сдают на убой, а животных других неблагополучных отар данного хозяйства реиммунизируют вакциной из штамма 19 за 2 месяца до осеменения, но не ранее чем через 2 года после иммунизации их вакциной из штамма Рев-1. Овец (коз) в дальнейшем прививают вакциной из штамма 19 ежегодно, перед прививкой и после нее на бруцеллез не исследуют, содержат обособленно и по мере хозяйственной выбраковки сдают на убой. Ярок в этих хозяйствах иммунизируют вакциной из штамма Рев-1 против бруцеллеза.

7.3.3. Противобруцеллезные вакцины используют, соблюдая условия, указанные в наставлениях по применению соответствующих вакцин.

7.4. Перед снятием ограничений с неблагополучной по бруцеллезу мелкого рогатого скота фермы (бригады, отделения хозяйства), населенного пункта исследуют серологическим методом всех овец и коз (в т.ч. подвергавшихся вакцинации против бруцеллеза), находящихся на территории хозяйства, населенного пункта. Ограничения снимают только после получения отрицательных результатов исследований мелкого рогатого скота всего хозяйства или хозяйственно обособленной части его (при снятии ограничений с отделения, бригады, фермы), населенного пункта и выполнения других мероприятий, предусмотренных Инструкцией (в т.ч. исследования приотарных собак и животных других видов, имевших контакт с овцами или козами неблагополучных отар). В хозяйствах, в которых проводили реиммунизацию взрослых овец (коз) вакциной из штамма 19, все такое поголовье должно быть сдано на убой.

В крупных овцеводческих хозяйствах (поголовье более 30 тыс.) перед снятием ограничений допускается проведение исследований на бруцеллез не менее 10% поголовья каждой отары, а также всех овцематок, оставшихся без ягнят, и баранов-производителей.

**8. Оздоровление хозяйств, неблагополучных**

**по инфекционному эпидидимиту баранов**

8.1. При установлении в племенном овцеводческом хозяйстве (на ферме), на станции или предприятии по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных заболевания баранов инфекционным эпидидимитом (ИЭ) ферму (станцию, предприятие) объявляют неблагополучной, животных неблагополучной отары (группы) содержат обособленно.

8.1.1. Баранов с клиническими признаками болезни (эпидидимит, орхит) изолируют, а остальных животных неблагополучной отары (группы) исследуют клинически и серологически (РДСК) 1 раз в месяц до получения двукратных подряд отрицательных результатов, затем оставляют под контрольным наблюдением на 6 месяцев, в течение которых животных исследуют 2 раза. Молодых баранов исследуют на ИЭ с 12-месячного возраста.

8.1.2. Баранов, имеющих клинические признаки болезни или положительно реагирующих при исследовании, сдают на убой.

8.1.3. При отсутствии в течение контрольного наблюдения клинического проявления болезни и при отрицательных результатах исследований отару (группу) баранов признают оздоровленной от инфекционного эпидидимита, животных допускают к использованию для воспроизводительных целей.

8.2. Если установлено заболевание инфекционным эпидидимитом баранчиков в ремонтных группах или среди отобранных к продаже для племенных целей, в племенных хозяйствах проводят исследование на это заболевание овцематок в отарах, в которых получены баранчики, а также в отарах, в которых использовались больные ИЭ бараны-производители.

8.2.1. Овцематок исследуют серологическим методом (РДСК) двукратно через 1 и 2 мес. после окота и за 2 - 4 недели до осеменения. Абортированные плоды направляют на бактериологическое исследование на ИЭ в ветеринарную лабораторию.

8.2.2. Овцематок, при исследовании сыворотки крови которых в РДСК или при бактериологическом исследовании абортированных плодов и патологического материала получен положительный результат, признают больными и сдают на убой, а отару объявляют неблагополучной по ИЭ.

8.2.3. Неблагополучную отару овцематок содержат изолированно от других отар хозяйства, овец исследуют серологическим методом в порядке, как указано выше, нереагирующих животных осеменяют искусственно спермой здоровых производителей и оставляют под наблюдением до следующего окота.

8.2.4. Отару овцематок признают оздоровленной, если у овец в течение двух лет наблюдения не было абортов, вызываемых возбудителем - бруцеллой овис, и при исследовании сыворотки крови животных получены отрицательные результаты, а при исследовании баранчиков предыдущего года рождения, выращенных от овец данной отары, среди них не выделены больные ИЭ животные.

8.2.5. В неблагополучные отары для покрытия овец допускают здоровых баранов, которых после окончания случной кампании через 1 - 2 мес. исследуют клинически и серологически на ИЭ. Использование этих баранов для воспроизводительных целей в других отарах хозяйства в этот период не разрешается.

8.2.6. Молодняк (баранчиков и ярок), родившийся от овец неблагополучной отары, содержат отдельной группой и в возрасте 12 мес. исследуют на ИЭ серологическим методом (РДСК), а баранчиков и клинически реагирующих (больных) выделяют. Вывод такого молодняка в другие хозяйства для племенных целей не разрешается.

**9. Оздоровление хозяйств, неблагополучных**

**по бруцеллезу буйволов, верблюдов, свиней,**

**пушных зверей и лошадей**

9.1. Неблагополучные по бруцеллезу буйволоводческие и верблюдоводческие фермы (стада) оздоравливают в таком же порядке, как и стада крупного рогатого скота (раздел 6). Прививкам вакцинами против бруцеллеза буйволов и верблюдов не подвергают.

9.2. В свинарнике, в котором установлено заболевание бруцеллезом, все поголовье, в том числе молодняк, полученный от маток данного свинарника, содержат изолированно, откармливают и сдают на убой. Супоросных маток сдают на убой после окончания опороса и отъема поросят.

После санации свинарника и территории и снятия ограничений завозят здоровых свиней.

9.3. В звероводческих хозяйствах в целях охраны от заноса возбудителя бруцеллеза выполняют ветеринарно-санитарные правила для этих хозяйств, утвержденные Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР.

Особое внимание обращают на недопущение скармливания клеточным зверям мясных продуктов из хозяйств, неблагополучных по бруцеллезу, без термической обработки.

9.3.1. В целях диагностики бруцеллеза у пушных зверей проводят бактериологическое исследование абортированных плодов, а в весенне-летний период - исследование серологическими методами (РА, РСК или РДСК) всех пропустовавших, абортировавших самок и неработавших самцов.

9.3.2. При установлении бруцеллеза всех пушных зверей хозяйства исследуют на бруцеллез (РА и РСК (РДСК)) с целью определения степени зараженности поголовья.

При значительном количестве реагирующих (более 10 процентов) все поголовье пушных зверей заменяют. После санации фермы и снятия ограничений завозят здоровых животных.

При незначительном проценте реагирующих пушных зверей исследуют на бруцеллез 1 раз в мес. (РА и РСК (РДСК)) до получения отрицательных результатов. Реагирующих самок вместе с пометом содержат в изоляторе до убоя на мех.

9.4. Лошадей исследуют на бруцеллез (РБП или РА и РСК (РДСК)) при выявлении у них признаков, дающих основание подозревать наличие болезни (бурсит, нагнет холки), а также перед снятием ограничений с хозяйств, оздоровленных от бруцеллеза крупного рогатого скота и овец (см. пункты 6.8 и 7.7). Положительно реагирующих подвергают убою.

**10. Профилактика заболевания и оздоровление хозяйств,**

**неблагополучных по бруцеллезу северных оленей**

10.1. В целях предотвращения заноса бруцеллеза в оленеводческих хозяйствах выполняют соответствующие меры, указанные в разделе 4, и по недопущению контакта между благополучными и неблагополучными по бруцеллезу стадами.

Устанавливают маршруты движения стад в каждом хозяйстве (бригаде).

10.2. Для выявления очагов бруцеллеза северных оленей следят за их состоянием, проводят клинический осмотр и животных с признаками заболевания (аборты, орхиты, эпидидимиты, бурситы и др.) выделяют из стада. Их исследуют на бруцеллез серологическими методами (РБП или РА и РСК (РДСК)) и затем подвергают убою.

Кроме того, от взрослых оленей, поступивших на убой, берут кровь для серологического исследования, как указано выше.

10.3. При оздоровлении неблагополучных по бруцеллезу стад все поголовье стада 1 раз в год исследуют серологическими методами и 1 раз в квартал подвергают клиническому осмотру. Транспортных оленей, кроме того, исследуют аллергическим методом не реже 2 раз в год. Самцов-производителей (хоров) при разделении стада перед отелом на плодовое и транспортное исследуют серологическими методами.

Животных, реагирующих при исследовании или имеющих клинические признаки болезни, подвергают убою.

В период отелов последы и абортированные плоды уничтожают, оленей перегоняют на свежие участки пастбища.

10.4. Хозяйство (стадо оленей) признают оздоровленным, если в течение последних двух лет в нем не было выявлено животных с клиническими признаками бруцеллеза, при серологическом исследовании получены отрицательные результаты, а в хозяйстве проведены необходимые ветеринарно-санитарные мероприятия.

**11. Оздоровление от бруцеллеза животных в хозяйствах граждан**

11.1. Ликвидацию бруцеллеза животных, принадлежащих населению, осуществляют по плану оздоровления неблагополучного населенного пункта в соответствии с разделом 3 настоящей Инструкции.

11.2. При установлении заболевания крупного рогатого скота, а также буйволов и верблюдов в отдельных хозяйствах граждан все поголовье животных, содержащихся в этих хозяйствах, подвергают систематическим исследованиям серологическими методами до получения двукратных отрицательных результатов. Транспортных оленей 1 раз в квартал исследуют серологическими или аллергическими методами. Реагирующих или имеющих клинические признаки болезни животных считают больными и подвергают убою.

Если заболевание установлено у крупного рогатого скота (буйволов, верблюдов), содержавшегося в общем стаде, все поголовье скота в данном населенном пункте исследуют на бруцеллез каждые 25 - 30 дней серологическими методами до получения двукратного подряд отрицательного результата по всему стаду и при отсутствии новых случаев заболевания животных стадо считают оздоровленным от бруцеллеза.

11.3. При выявлении больных бруцеллезом овец или коз все неблагополучное поголовье животных этих видов, принадлежащее отдельным владельцам, подлежит немедленному убою. В данном населенном пункте всех овец и коз, принадлежащих другим индивидуальным владельцам, каждые 25 - 30 дней исследуют на бруцеллез серологическими методами (РБП или РА и РСК (РДСК)) до получения двукратного подряд отрицательного результата и при отсутствии новых случаев заболевания поголовье животных считают благополучным по бруцеллезу.

11.4. При установлении бруцеллеза у свиней все неблагополучное свинопоголовье, содержащееся в хозяйстве данного владельца, подвергают убою.

11.5. В районах, областях, краях и республиках (без областного деления) со значительным распространением бруцеллеза крупный и мелкий рогатый скот, принадлежащий населению, в целях профилактики допускается иммунизировать противобруцеллезными вакцинами в порядке, предусмотренном наставлениями по применению соответствующих вакцин.

11.6. Ветеринарно-санитарные и другие мероприятия в населенных пунктах проводят в соответствии с настоящей Инструкцией. При этом содержание больных животных в общем стаде (отаре) и на участках, отведенных для выпаса стада (отары), запрещается.

**12. Охрана людей от заражения бруцеллезом**

12.1. Все работники, непосредственно обслуживающие животных неблагополучных по бруцеллезу хозяйств, должны строго выполнять правила личной гигиены, с которыми их обязаны ознакомить медицинские и ветеринарные специалисты.

12.2. Все работники животноводства должны быть обеспечены спецодеждой и спецобувью. В каждом животноводческом помещении должны быть умывальники, мыло, полотенце и аптечки первой помощи, а также оборудованное помещение для хранения спецодежды и спецобуви.

12.3. К обслуживанию отар овец (коз), неблагополучных по бруцеллезу, допускают только лиц, вакцинированных против бруцеллеза.

12.4. С целью своевременного выявления заболевания бруцеллезом людей медицинские работники должны подвергать диспансеризации лиц, занятых обслуживанием животных.

12.5. На каждой ферме должны быть санитарные журналы для записи в них указаний и предложений медицинских и ветеринарных специалистов.

Утверждены

Главным управлением ветеринарии

Министерства сельского хозяйства СССР

30 декабря 1982 г. N 115-6а

УКАЗАНИЯ

ПО ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

**1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

1.1. Бруцеллез - инфекционная, хронически протекающая болезнь животных.

Возбудитель - бактерии из рода бруцелла, в который входят шесть самостоятельных видов: мелитензис (козье-овечий), абортус (крупного рогатого скота), суис (свиней), овис (бараний), канис (собачий) и неотома (кустарниковых крыс).

Микроорганизмы первых трех видов вызывают бруцеллез; бруцеллы вида овис - заболевание, называемое инфекционным эпидидимитом баранов (ИЭ).

От животных, больных бруцеллезом, могут заражаться люди, для которых наиболее опасен возбудитель бруцеллеза овец и коз.

1.2. Диагноз на бруцеллез у животных ставят на основании результатов бактериологических, серологических и аллергических исследований с учетом эпизоотологических данных и клинических признаков болезни, руководствуясь при этом Инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных.

1.2.1. При установлении диагноза на бруцеллез необходимо учитывать следующее:

различные виды возбудителя являются патогенными, в основном, для животных соответствующего вида, однако бруцеллы видов мелитензис и абортус могут мигрировать и на животных других видов;

клинические признаки бруцеллеза у животных не характерны. Наиболее частое клиническое проявление болезни у маточного поголовья - аборт, у свиноматок наблюдается мумификация плодов. При абортах отмечается утолщение плодовых оболочек, образование на них фибринозных или гнойных хлопьев. Бруцеллез нередко сопровождается поражением суставов (артриты), синовиальной системы (тендовагиниты, бурситы), половой системы (у самок - эндометрит, вагинит, у самцов - орхит, эпидидимит);

патологоанатомическая картина при бруцеллезе не имеет характерных особенностей, позволяющих использовать их для диагностики этой болезни. Только у свиней на слизистой оболочке матки иногда находят желтовато-гнойные или казеозные узелки величиной с просяное зерно (так называемый "миллиарный бруцеллез матки").

1.2.2. У баранов, больных инфекционным эпидидимитом, в семенниках и придатках обнаруживают воспалительно-некротические или гнойные очаги различной величины; отмечают заполнение полости мошонки серозно-гнойным транссудатом, разрастание фиброзной ткани, сращение придатка с семенником и общей влагалищной оболочкой, иногда атрофию семенника.

1.3. Диагностика бруцеллеза включает лабораторные (бактериологическое и серологическое) исследования материала и аллергические исследования животных в хозяйствах.

Плановые серологические и аллергические исследования являются основными методами выявления больных и подозрительных по заболеванию животных.

Бактериологическую диагностику проводят в случае аборта или при появлении у животных других признаков (бурситы, гигромы, орхиты, эпидидимиты и проч.), вызывающих подозрение на данное заболевание. Одновременно проводят серологическое исследование сывороток крови этих животных.

1.4. При отборе проб крови, молока и патологического материала, а также при проведении лабораторных исследований необходимо соблюдать меры, предупреждающие заражение людей и обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями по данному вопросу.

**2. ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНЫХ И ПЕРЕСЫЛКА ЕГО**

**ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

2.1. Материал для лабораторных исследований отбирают от каждого животного в отдельности.

2.2. На бактериологическое исследование на бруцеллез в лабораторию направляют абортированный плод с плодовыми оболочками (от свиноматок берут не менее 3 плодов) или желудок плода с содержимым (желудок перевязывают со стороны пищевода и со стороны двенадцатиперстной кишки), а также кусочки печени и селезенки.

При взятии содержимого гигром, бурс в области поражения выстригают шерсть, кожный покров дезинфицируют 70-градусным спиртом и смазывают настойкой йода. Затем стерильным шприцем с иглой большого диаметра делают пункцию, отсасывают содержимое гигромы (бурсы) и переносят его в стерильную пробирку с резиновой пробкой.

Перед взятием проб молока у коров вымя обмывают теплой водой, соски обрабатывают 70-градусным спиртом. Для исследования из каждой доли вымени берут последние порции молока в количестве 10 - 15 мл в отдельные стерильные пробирки с резиновыми пробками.

У овец и коз пробы молока берут путем пункции цистерны вымени. Для этого животное фиксируют в боковом положении, вымя у основания соска протирают 70-градусным спиртом и смазывают настойкой йода. Стерильным шприцем с иглой делают пункцию у основания соска и после попадания иглы в цистерну (о чем судят по свободному движению конца иглы) набирают в шприц молоко и переносят его в стерильную пробирку с резиновой пробкой.

Молоко должно быть доставлено в лабораторию и исследовано в день взятия пробы. Если это невозможно, молоко консервируют сухой борной кислотой (0,1 г на 10 мл) или генцианвиолетом (0,4 мл 1-процентного спиртово-водного раствора краски на 10 мл молока). Консервированное молоко пригодно для исследования в течение 10 дней.

2.2.1. Для исследования на инфекционный эпидидимит в лабораторию направляют: от баранов - семенники с придатками; от овцематок - абортированные плоды с плодовыми оболочками, выделения из половых путей, взятые в первые 5 дней после аборта.

2.2.2. Отобранные для бактериологического исследования пробы упаковывают в целлофан или пергаментную бумагу, помещают в непроницаемую тару (ящик, банка, полиэтиленовый пакет) и в тот же день направляют в лабораторию. От абортировавшего животного одновременно с патологическим материалом направляют кровь на серологическое исследование на бруцеллез.

Если в течение 24 - 30 часов взятый материал доставить в лабораторию не представляется возможным, его консервируют стерильным 30-процентным водным раствором химически чистого глицерина.

Материал заливают консервирующей жидкостью в количестве, превышающем его объем в 4 - 5 раз. Крупные плоды направляют в неконсервированном виде.

2.3. На серологическое исследование в лабораторию направляют кровь (или сыворотку крови) и молоко.

2.3.1. Кровь у животных берут из яремной вены (у свиней - из ушной или хвостовой, у лисиц и песцов - из бедренной вены, у норок - путем отсечения подушечки среднего пальца задней лапы или кончика хвоста) в стерильные пробирки по 5 - 7 мл (от пушных зверей по 1 - 2 мл). Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

Сыворотку крови получают методом отстоя. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают 30 - 60 мин. при 20 - 30 °С, сгусток крови от стенок отделяют стальной спицей, а затем пробирки выдерживают при 4 - 10 °С. Через 20 - 24 часа отстоявшуюся сыворотку сливают в сухие стерильные пробирки (лучше в пробирки Флоринского) и направляют на исследование в лабораторию в свежем или консервированном виде.

Консервирование сывороток проводят:

добавлением 0,05 мл (1 капля) 5-процентного раствора фенола на каждый миллилитр сыворотки при постоянном перемешивании;

сухой борной кислотой (2 - 4% к объему сыворотки) до получения насыщенного раствора и образования на дне пробирки небольшого осадка кристаллов;

путем однократного замораживания.

Неконсервированная сыворотка пригодна для исследования в течение 6 дней со дня взятия крови с сохранением ее при 4 - 8 °С.

Сыворотки, консервированные фенолом или борной кислотой, пригодны для исследования в течение 30 дней; замороженные сыворотки - в течение 3 дней после однократного оттаивания.

Мутные, проросшие, гемолизированные сыворотки исследованию на бруцеллез не подлежат.

2.3.2. Для исследования на бруцеллез в кольцевой реакции пробу (10 - 15 мл) цельного свежего молока берут из одного удоя от коровы (буйволицы) в стерильную пробирку. Пробы молока на рынках берут из каждой отдельной посуды (бидон, фляга и проч.) после тщательного его перемешивания. Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

При направлении молока на исследование в лабораторию каждую пробу консервируют добавлением одной капли 10-процентного раствора формалина на 5 - 10 мл молока. Консервированное молоко пригодно для исследования в течение 2 - 3 суток. Перед исследованием его необходимо тщательно перемешать для равномерного распределения сливок.

При массовом исследовании молока работу по отбору проб и постановке кольцевой реакции следует проводить непосредственно на ферме в специально отведенном помещении.

Не разрешается исследовать в кольцевой реакции молоко от коров (буйволиц), страдающих маститом или болезнями, сопровождающимися повышением температуры тела, а также молоко животных в первые 2 недели после родов.

2.4. На направляемый в лабораторию материал заполняют сопроводительный документ установленной формы.

**3. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА**

3.1. Бактериологическую диагностику бруцеллеза проводят в случае аборта или при появлении у животных других признаков (бурситы, гигромы, орхиты, эпидидимиты и проч.), вызывающих подозрение на данное заболевание.

3.2. Бруцеллы обнаруживают тремя методами: бактериоскопией мазков из патологического материала, выделением культуры бруцелл на питательных средах и, при необходимости, путем постановки биологической пробы на морских свинках.

3.3. Бактериоскопическое исследование.

Из доставленного на исследование патологического материала делают по 2 мазка из каждого объекта. При исследовании абортированных плодов мазки готовят из содержимого желудка, жидкости брюшной и грудной полостей, печени, селезенки, а также котиледонов плодовых оболочек. Из паренхиматозных органов, котиледонов и другого плотного материала делают мазки-отпечатки, жидкий материал наносят на предметные стекла пипеткой.

Мазки, фиксированные на пламени, окрашивают по Граму и одному из следующих специальных методов: по Стампу (модифицированный метод Циль-Нильсена), Козловскому или Шуляку-Шин (см. Приложение N 1, п. 1). При микроскопии мазков учитывают, что бруцеллы - мелкие, грамотрицательные, расположенные отдельно, попарно или кучно кокко-бактерии, окрашивающиеся по Стампу, Козловскому или Шуляку-Шин в красный цвет.

3.4. Бактериологическое исследование.

3.4.1. Для культивирования бруцелл используют мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ), печеночно-глюкозно-глицериновый бульон (ПГГБ), мясо-пептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГГА), печеночно-глюкозно-глицериновый агар (ПГГА), картофельный агар, эритрит-агар или сывороточно-декстрозный агар (см. Приложение N 1, п. 2).

Культивирование возбудителя инфекционного эпидидимита баранов (бруцелла овис) проводят на плотных или полужидких печеночно-сывороточном или печеночно-аминопептидном агарах, а также на сывороточно-декстрозном агаре (см. Приложение N 1, п. 2).

3.4.2. Перед посевом материала кожу абортированного плода с поверхности по белой линии протирают тампонами, смоченными 5-процентным раствором фенола. Стерильными ножницами вскрывают брюшную стенку и грудную клетку плода, содержимое грудной и брюшной полостей набирают пастеровскими пипетками и высевают в 1 пробирку с бульоном и 2 пробирки с агаром, а содержимое желудка - в 2 пробирки с бульоном и не менее 5 пробирок с агаром.

Из печенки и селезенки вырезают кусочки размером не менее 2,0 х 1,5 х 2,5 см, увлажняют их спиртом, обжигают с поверхности и растирают в стерильной ступке с песком. Затем в ступку добавляют равное количество стерильного физиологического раствора и вновь растирают. Полученную взвесь пастеровской пипеткой по 0,1 - 0,2 мл высевают на поверхность предварительно подсушенных плотных сред (в пробирках или чашках). Допускается высев материала пастеровской пипеткой непосредственно из органов (место прокола органа предварительно прижигают раскаленным шпателем). Из каждого органа делают посев на 1 пробирку с бульоном и 2 пробирки с агаром.

Если в лабораторию доставлен только желудок плода, высев проводят не менее чем на 10 пробирок агара.

При поступлении нескольких плодов от одного животного посевы делают из органов и тканей каждого плода отдельно.

Из плодовой оболочки, плаценты вырезают кусочки тканей с утолщенными ворсинками и стенками, наличием на поверхности фибрина или гнойного экссудата (выбирают менее загрязненные участки без некротических изменений). Для уничтожения посторонней микрофлоры кусочки плаценты помещают в чашку Петри и заливают 3-процентным раствором гидроокиси калия на 30 минут. Затем их обмывают стерильным физиологическим раствором, готовят из этого материала суспензию в ступке со стерильным песком и делают посев пастеровской пипеткой на чашки со средой, содержащей бактериостатические препараты: генцианвиолет 1:200000 (0,1 мл 0,5-процентного спиртового раствора на 100 мл среды) или кристаллвиолет 1:100000, генцианвиолет и малахитовую зелень в концентрации каждой краски 1:200000, уксуснокислый натрий из расчета 0,125 мг на 1 мл среды.

Содержимое бурс, гигром высевают на 3 - 4 чашки с плотной питательной средой, содержащей бактериостатические препараты.

Пробы молока центрифугируют 30 минут при 3000 оборотов в минуту. Верхний слой (сливки) и осадок набирают в пастеровскую пипетку и по 0,1 - 0,2 мл вносят на 3 - 4 чашки с агаром, содержащим бактериостатические препараты. Молоко, консервированное генцианвиолетом, высевают на среды без бактериостатических веществ.

3.4.3. Для выращивания культур посевы помещают в термостат при 37 - 38 °С.

При исследовании материала от крупного рогатого скота половину засеянных пробирок и чашек инкубируют в атмосфере с повышенным содержанием углекислого газа (10 - 15%), другую - в обычных атмосферных условиях.

Для выделения возбудителя инфекционного эпидидимита баранов (бруцелла овис) все посевы инкубируют в атмосфере, содержащей 10 - 15% углекислого газа.

Для создания атмосферы с повышенным содержанием углекислого газа засеянные пробирки заливают парафином или помещают в эксикатор (микроанаэростат).

Перед парафинированием пробирки закрывают горящими ватными пробками, пронося последние над пламенем горелки. Затем верхнюю часть пробки обрезают, а оставшуюся часть углубляют на 0,5 - 1 см внутрь пробирки и заливают расплавленным парафином.

Необходимое содержание углекислого газа в эксикаторе можно получить путем:

заполнения части объема углекислым газом из баллона или аппарата Киппа;

внесения бикарбоната натрия и серной или соляной кислоты (0,48 г бикарбоната натрия и 5 мл 25-процентного раствора серной кислоты или 0,4 г бикарбоната натрия и 0,35 мл концентрированной соляной кислоты на 1 л объема);

сжигания ваты, смоченной спиртом. При этом пробирки и чашки с посевами должны занимать не более половины объема эксикатора.

Для определения концентрации углекислого газа в эксикаторе можно использовать химический метод (см. Приложение N 1, п. 3).

3.4.4. Посевы выдерживают в термостате при 37 - 38 °С в течение 30 дней. Первый просмотр посевов проводят через 18 - 24 часа. Пробирки с агаром и бульоном, заросшие посторонней микрофлорой, отбраковывают.

В дальнейшем для обнаружения роста бруцелл посевы просматривают каждые 3 - 4 дня визуально, при необходимости через лупу или при малом увеличении микроскопа. При отсутствии роста часть поверхности агара орошают конденсационной жидкостью.

При значительном росте посторонней микрофлоры (80% и более засеянных пробирок) бактериологическое исследование прекращают.

При просмотре посевов обращают внимание на характер роста микробов. На поверхности агара бруцеллы образуют мелкие, блестящие, выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью просвечивающиеся колонии, имеющие в отраженном свете голубоватый оттенок, в падающем - сероватый. С возрастом колонии мутнеют и приобретают более темную окраску, что связано с появлением пигмента.

В бульоне бруцеллы образуют равномерное помутнение и пристеночное кольцо, возвышающееся над уровнем бульона, а в дальнейшем небольшой осадок на дне пробирки. В отраженном свете пристеночное кольцо имеет голубоватый оттенок.

При обнаружении роста на жидких средах и отсутствии характерного роста на агаре из каждой пробирки готовят мазки, которые окрашивают одним из специальных методов и делают пересев на чашку с плотной средой для выделения чистой культуры. Пересевы на чашках культивируют так же, как и высевы из патологического материала.

Выделенные культуры идентифицируют по тинкториальным (окраска мазков по Граму и одним из специальных методов), морфологическим, культуральным свойствам и в реакции агглютинации на стекле с позитивной бруцеллезной сывороткой.

При постановке реакции агглютинации на обезжиренное предметное стекло наносят каплю бруцеллезной сыворотки в разведении 1:50 и каплю той же сыворотки в разведении 1:2 (для выявления слабоагглютинабельных культур). В каждую каплю сыворотки бактериологической петлей вносят агаровую культуру и тщательно растирают ее. Одновременно ставят контроль с негативной сывороткой в тех же разведениях.

При положительной реакции через 1 - 3 мин. в капле позитивной сыворотки образуются хлопья или комочки, а сама жидкость просветляется, что особенно заметно при покачивании стекла. В контроле наблюдается равномерное помутнение без образования хлопьев.

При отрицательной реакции агглютинации с культурой из одной колонии дополнительно исследуют не менее трех-четырех подозрительных колоний.

Культуры, обладающие типичными для бруцелл морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами и дающие положительную реакцию агглютинации с позитивной сывороткой, относят к бруцеллам.

Первичные культуры возбудителя инфекционного эпидидимита баранов подвергают серологической идентификации. Для этого проводят гипериммунизацию двух кроликов массой 2 - 3 кг путем двукратного с интервалом 7 - 8 дней внутривенного введения им по 2 мл взвеси двухсуточной исследуемой культуры, содержащей 3 - 4 млрд. микробных клеток в 1 мл физиологического раствора. Через 10 - 12 дней после второго введения от кроликов получают сыворотку крови и исследуют ее в реакции длительного связывания комплемента (РДСК) с овисным антигеном.

Культура возбудителя инфекционного эпидидимита баранов вызывает образование антител в крови кроликов (положительная РДСК). Отрицательный результат РДСК с овисным антигеном означает, что изучаемая культура не относится к возбудителю инфекционного эпидидимита баранов.

3.5. Биологическое исследование.

3.5.1. Биологическое исследование проводят на морских свинках (не менее двух) массой 350 - 400 г, предварительно проверенных на бруцеллез исследованием сыворотки их крови в РА с отрицательным результатом в разведении 1:5.

3.5.2. Для постановки биологической пробы используют тот же материал, что и для бактериологического исследования.

Из органов и содержимого желудка абортированного плода готовят суспензию на стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:10 и вводят подкожно с внутренней стороны бедра морской свинке в дозе 1 мл.

Из плаценты и плодовых оболочек (предварительно обработанных тампонами, смоченными дезинфицирующим раствором, и подсушенных сухими стерильными тампонами) вырезают кусочки размером 0,5 х 0,5 см, фламбируют их на пламени горелки, растирают в ступке со стерильным песком и заливают физиологическим раствором в соотношении 1:10. Полученную суспензию вводят морской свинке в дозе 1 мл.

Содержимое гигром, бурс вводят морской свинке подкожно в дозе 0,2 - 0,3 мл. При этом необходимо учитывать возможность гибели животного от сопутствующей микрофлоры, особенно стрептококков.

Пробы молока центрифугируют 30 минут при 3000 об./мин. Морской свинке вводят подкожно 2 - 3 мл материала из верхнего слоя (сливки) и осадка молока после центрифугирования.

3.5.3. На 15-й, 25-й и 40-й дни после заражения у морских свинок берут кровь в количестве 1 - 2 мл из ушной вены путем надреза или из сердца - путем пункции и сыворотку крови исследуют в пробирочной РА в разведениях от 1:10 до 1:80.

При положительной реакции агглютинации (в разведении 1:10 и выше) морских свинок убивают, в случае необходимости получения культуры возбудителя материал от них исследуют бактериологически. Высевы делают пастеровскими пипетками в 1 пробирку бульона и 2 пробирки агара из паховых, парааортальных лимфатических узлов (правых и левых), селезенки (2 высева), печени и костного мозга. Посевы культивируют, как описано в подпунктах 3.4.3 и 3.4.4.

При отрицательной РА у морских свинок в указанные выше сроки биопробу считают отрицательной, подопытных животных убивают.

3.5.4. При выделении культуры бруцелл на питательных средах из исходного материала биологическое исследование по данной экспертизе прекращают, а ранее зараженных морских свинок убивают.

3.6. Результат исследования на бруцеллез считают положительным при выделении культуры возбудителя или при получении у морской свинки положительной РА в разведении сыворотки крови 1:10 и выше, если из исходного материала культура не выделена.

При положительных результатах бактериоскопии и отрицательных результатах бактериологического исследования и биопробы материал считают подозрительным на бруцеллез.

3.7. Сроки исследования:

бактериологического - до 1 месяца;

биологического - до 2 месяцев.

3.8. В районных и межрайонных ветеринарных лабораториях все выделенные культуры бруцелл после их идентификации подлежат уничтожению путем автоклавирования при 1,5 атмосферах в течение 1 часа.

3.9. При необходимости определения вида бруцелл, а также в целях дифференциации полевых штаммов от вакцинных выделенные от животных культуры направляют в республиканские, областные, зональные ветеринарные лаборатории или ветеринарные научно-исследовательские учреждения, в которых имеются лаборатории или отделы, занимающиеся изучением бруцеллеза животных и имеющие разрешение органов здравоохранения на работу с микроорганизмами второй группы.

**4. МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА**

4.1. Серологическая диагностика бруцеллеза заключается в обнаружении специфических антител в сыворотке крови животных с помощью реакции агглютинации в пробирках (РА), реакции связывания комплемента (РСК), реакции длительного связывания комплемента на холоде (РДСК), пластинчатой реакции агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба - РБП) и в молоке коров - кольцевой реакции (КР).

4.2. Постановка и учет результатов реакции агглютинации в пробирках (РА).

4.2.1. Реакцию агглютинации в пробирках с бруцеллезным антигеном применяют при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, буйволов, верблюдов, оленей, собак, пушных зверей и животных других видов.

4.2.2. Компоненты реакции агглютинации:

испытуемые сыворотки крови (см. подпункт 2.3.1);

позитивная бруцеллезная сыворотка, изготовленная биопредприятием или полученная от больного бруцеллезом животного. На этикетке флакона с такими сыворотками указывают титры в РА и РСК и дату изготовления;

негативная сыворотка (сыворотка крови здоровых животных), изготовленная биопредприятием или полученная в лаборатории;

антиген бруцеллезный единый для РА, РСК и РДСК (см. Приложение N 2, п. 6);

раствор хлорида натрия. При исследовании сывороток крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, собак, пушных зверей и морских свинок для разведения испытуемых сывороток и антигена используют фенолизированный (0,5-процентный) физиологический раствор хлорида натрия (0,85-процентный), при исследовании сывороток крови овец, коз, буйволов - 5-процентный и оленей - 10-процентный фенолизированный раствор хлорида натрия (см. Приложение N 2, п. 1).

4.2.3. Постановка реакции агглютинации.

Реакцию агглютинации проводят в объеме 1 мл в четырех разведениях:

при исследовании сывороток крови овец, коз, буйволов, оленей и собак - 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200;

крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов - 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400;

пушных зверей и морских свинок - 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80.

При массовых исследованиях допускается постановка реакции в первых двух разведениях.

Разлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками или групповыми дозаторами Флоринского.

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок. В пробирках первого ряда делают основное разведение. Для этого сыворотку крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов берут в дозе 0,1 мл, вносят в пробирки и добавляют к ней 2,4 мл соответствующего раствора хлорида натрия, получают разведение сыворотки 1:25. Сыворотку крови овец, коз, буйволов, оленей и собак берут в дозе 0,2 мл и добавляют 2,3 мл соответствующего раствора хлорида натрия (разведение 1:12,5), а сыворотку крови пушных зверей и морских свинок берут в дозе 0,3 мл и добавляют 1,2 мл соответствующего раствора хлорида натрия (разведение 1:5). Таким образом делают основное разведение испытуемых сывороток в пробирках первого ряда штатива (по 10 проб в ряду).

После приготовления основного разведения сывороток в первом ряду в пробирки третьего, четвертого и пятого рядов вливают по 0,5 мл соответствующего раствора хлорида натрия. Затем из пробирок первого ряда при помощи группового дозатора Флоринского переносят в пробирки второго и третьего рядов по 0,5 мл основного разведения сывороток (1:25, 1:12,5 или 1:5). В пробирках третьего ряда сыворотки смешивают с раствором хлорида натрия, по 0,5 мл этого разбавления переносят в пробирки четвертого ряда и так же из пробирок четвертого ряда - в пятый. Из пробирок пятого ряда по 0,5 мл жидкости удаляют. Таким образом делают последовательные двукратные разведения одновременно 10 сывороток.

После этого в каждую пробирку второго, третьего, четвертого и пятого рядов с разведенными сыворотками вносят при помощи группового дозатора Флоринского или другого дозирующего устройства по 0,5 мл антигена, предварительно разбавленного в соотношении 1:10 соответствующим раствором хлорида натрия. После добавления антигена разведение сывороток в каждой пробирке удваивается и в зависимости от вида исследуемых животных будет составлять соотношения: 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400; 1:25, 1:50, 1:100 и 1:200 или 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80.

В пробирки первого ряда бруцеллезный антиген не вносят, и они служат контролем качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрина, эритроцитов и посторонних примесей результаты реакции агглютинации не учитывают.

При массовых исследованиях сыворотки разливают индивидуальной микропипеткой (с грушей) или групповыми дозаторами Флоринского в две пробирки в дозах 0,02 и 0,01 мл (сыворотки крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов) или 0,04 и 0,02 мл (при исследовании сывороток овец, коз, буйволов, оленей и собак). Затем в каждую пробирку добавляют по 1,0 мл антигена, разведенного соответствующим раствором хлорида натрия в соотношении 1:20. При этом разведения сывороток будут соответствовать соотношениям 1:50 и 1:100 или 1:25 и 1:50.

При постановке реакции агглютинации одновременно с испытуемыми сыворотками ставят контроли:

с негативной сывороткой в тех же разведениях, как с испытуемыми;

с позитивной бруцеллезной сывороткой в разведениях до ее предельного титра.

После добавления к испытуемым и контрольным сывороткам антигена штативы с пробирками осторожно встряхивают и помещают в термостат при 37 - 38 °С на 16 - 20 часов, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего проводят учет реакции.

4.2.4. Учет реакции агглютинации. Результаты реакции учитывают визуально и определяют в крестах по следующей схеме:

++++ (4 креста) - полное просветление жидкости, микробные тела антигена

                  осели на дно пробирки в виде "зонтика", при легком

                  встряхивании "зонтик" разбивается на хлопья и комочки,

                  а жидкость остается прозрачной (100% агглютинации);

+++ (3 креста)  - неполное просветление жидкости и хорошо выраженный

                  "зонтик" (75% агглютинации);

++ (2 креста)   - просветление жидкости, "зонтик" умеренно выражен (50%

                  агглютинации);

+ (1 крест)     - едва заметное просветление жидкости, "зонтик" выражен

                  слабо, при встряхивании заметно небольшое [количество](http://www.alppp.ru/kol-vinogradn/)

                  хлопьев или комочков (25% агглютинации);

- (знак минус)  - просветления жидкости и образования "зонтика" не

                  наступило, на дне пробирки виден "пунктик" осевших

                  микробов антигена, при легком встряхивании образуется

                  равномерная взвесь.

За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на 2 креста (++), что соответствует количеству международных единиц (ME) антител в 1 мл сыворотки (например, сыворотка с конечным титром РА 1:100 содержит 100 ME, 1:200 - 200 ME и т.п.).

Для более объективной оценки результатов РА в крестах готовят стандарты мутности, соответствующие 0 (нулю), 25, 50 и 75% просветления жидкости.

В четыре пробирки последовательно наливают 1, 2, 3 и 4 мл антигена, разведенного 1:10. Затем в том же порядке в три первые пробирки добавляют 3, 2 и 1 мл фенолизированного физиологического раствора. В четвертую пробирку раствор не добавляют. После встряхивания пробирок жидкость из каждой из них переносят по 0,5 мл в серологические пробирки и добавляют по 0,5 мл фенолизированного физиологического раствора. Полученные стандарты соответствуют 75, 50 и 25% просветления жидкости. В последней, четвертой пробирке просветление отсутствует. Стандарты мутности готовят каждый раз при постановке РА и выдерживают в термостате одновременно с основной реакцией.

Степень просветления в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют визуально путем сравнения со стандартами и результаты реакции выражают в крестах.

При массовых исследованиях сывороток в двух разведениях все сыворотки, давшие агглютинацию с оценкой не менее чем на 2 креста (++) в каком-либо из указанных разведений, исследуют повторно в четырех разведениях.

4.2.5. Диагностическая оценка реакции агглютинации.

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сыворотками крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов начиная с разведения 1:100 (100 ME - международных единиц антител), коз, овец, буйволов, оленей и собак - с разведения 1:50 (50 ME), пушных зверей и морских свинок - с разведения 1:10 (10 ME) с оценкой не менее чем на 2 креста.

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении 1:50 (50 ME) с сыворотками крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов и в разведении 1:25 (25 ME) с сыворотками овец, коз, буйволов, оленей и собак с оценкой не менее чем на 2 креста.

При получении сомнительного результата реакции сыворотку крови данного животного исследуют повторно через 3 - 4 недели.

На неблагополучных по бруцеллезу фермах животных, при исследовании которых будет получена дважды сомнительная РА, относят к положительно реагирующим.

В заключении лаборатории о результатах исследования должна быть сообщена диагностическая оценка каждой пробы (положительная, сомнительная, отрицательная) и конечное разведение (титр) сыворотки, в котором получен соответствующий результат, выраженное в международных единицах (например: конечный титр сыворотки крови крупного рогатого скота 1:100 с оценкой 2 креста или более - "положительная 100 ME"; конечный титр сыворотки 1:50 с оценкой 2 креста или более - "сомнительная 50 ME").

Суммарные результаты исследования испытуемых сывороток, серию антигена, срок его годности, а также предельный титр позитивной сыворотки записывают в журнал серологических исследований.

4.3. Постановка и учет реакции связывания комплемента (РСК) и реакция длительного связывания комплемента на холоде (РДСК).

4.3.1. Реакцию связывания комплемента применяют при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, лошадей, оленей, собак, пушных зверей и животных других видов.

Реакцию длительного связывания комплемента, как более чувствительную, применяют вместо РСК при исследовании на бруцеллез сывороток животных указанных видов, а также при диагностике инфекционного эпидидимита баранов.

4.3.2. Компоненты реакций и их подготовка к работе:

испытуемые сыворотки крови (см. подпункт 2.3.1);

позитивная бруцеллезная или овисная сыворотка, изготовленная на биофабрике или полученная от больного животного. На этикетках флаконов с сыворотками указывают титр в РСК (РДСК) и дату изготовления;

негативная сыворотка (сыворотка крови здоровых животных), изготовленная на биофабрике или полученная в лаборатории.

Испытуемые и контрольные (позитивную и негативную) сыворотки инактивируют в водяной бане в день постановки реакции: для РСК - при 60 - 62 °С в течение 30 мин. (сыворотки крови ослов и мулов - при 64 - 65 °С, буйволов - при 62 - 64 °С в течение 30 мин., свиней - при 60 - 62° в течение 50 мин.); для РДСК сыворотки крови животных всех видов - при 63 - 64 °С в течение 30 мин.;

антиген бруцеллезный единый для РА, РСК и РДСК или овисный для РДСК в рабочем титре, указанном предприятием, его изготовившим (см. Приложение N 2, п. 6);

комплемент - сыворотка крови морской свинки (свежая, консервированная добавлением 4% борной кислоты или лиофильно высушенная). При использовании в качестве комплемента свежей или консервированной сыворотки и при получении каждой новой серии сухого комплемента проводят титрование его в гемолитической системе для определения активности (см. Приложение N 2, п. 4).

Сухой биофабричный комплемент растворяют в физиологическом растворе, как указано на этикетке. Берут такое количество ампул (флаконов), в которых содержится необходимое для проведения всего опыта количество комплемента. Содержимое ампул (флаконов) сливают в одну пробирку, осторожно смешивают, берут 0,5 мл и разводят физиологическим раствором 1:20 для титрования. Остальное количество комплемента хранят в холодильнике при плюс 2 - 4 °С;

гемолитическая сыворотка (гемолизин) - для РСК в удвоенном титре, для РДСК - в утроенном. Титрование гемолизина проводят периодически один раз в 3 месяца и при использовании каждой новой серии (см. Приложение N 2, п. 5);

эритроциты барана - 2,5-процентная от осадка взвесь эритроцитов в физиологическом растворе для РСК и 3-процентная для РДСК (см. Приложение N 2, п. 3).

Для приготовления гемолитической системы соответствующую взвесь эритроцитов и гемолитическую сыворотку в рабочем разведении смешивают в равных объемах и выдерживают в термостате при 37 °С в течение 15 - 20 мин. При смешивании гемолизин вливают во взвесь эритроцитов;

физиологический раствор - 0,85-процентный раствор химически чистого хлорида натрия в дистиллированной воде рН = 7,3 - 7,4 или физиологический раствор, содержащий ионы магния и кальция (см. Приложение N 2, п. 2).

Рабочие разведения всех компонентов для РСК или РДСК готовят перед постановкой реакции и проверяют их на антикомплементарность и гемотоксичность по следующей схеме:

--------------------------T-----------------------------------------------¬

¦       Компоненты        ¦                 Проверка на:                  ¦

¦                         +-----------T-----------------------------------+

¦                         ¦антикомпле-¦          гемотоксичность          ¦

¦                         ¦ментарность+-------T-------T--------T----------+

¦                         ¦           ¦компле-¦гемоли-¦антигена¦физиологи-¦

¦                         ¦           ¦мента  ¦зина   ¦        ¦ческого   ¦

¦                         ¦           ¦       ¦       ¦        ¦раствора  ¦

+-------------------------+-----------+-------+-------+--------+----------+

¦Комплемент в разведении  ¦0,2        ¦0,2    ¦-      ¦-       ¦-         ¦

¦1:20                     ¦           ¦       ¦       ¦        ¦          ¦

¦Гемолизин в рабочем титре¦0,2        ¦-      ¦0,2    ¦-       ¦-         ¦

¦Антиген в рабочем титре  ¦0,4        ¦-      ¦-      ¦0,4     ¦-         ¦

¦Эритроциты (2,5% или 3%) ¦0,2        ¦0,2    ¦0,2    ¦0,2     ¦0,2       ¦

¦Физиологический раствор  ¦-          ¦0,6    ¦0,6    ¦0,2     ¦0,8       ¦

¦                    водяная баня 10 минут при 37 - 38°                   ¦

+-------------------------------------------------------------------------+

¦Результат:          гемолиз   полная задержка гемолиза                   ¦

L--------------------------------------------------------------------------

В реакциях используют компоненты, не обладающие антикомплементарными и гемотоксическими свойствами.

4.3.3. Постановка реакции связывания комплемента.

Реакцию проводят в водяной бане при 37 - 38 °С в объеме 1 мл (по 0,2 мл каждого компонента - сыворотки, антигена, комплемента, гемолизина и эритроцитов).

Перед постановкой главного опыта проводят титрование комплемента в бактериолитической системе на позитивной (бруцеллезной) сыворотке, негативной сыворотке крови того вида животных, которых исследуют, и одной сыворотке, взятой из исследуемой партии.

Каждую сыворотку разводят 1:5 физиологическим раствором (1 мл сыворотки + 4 мл физиологического раствора), инактивируют, как указано в подпункте 4.3.2, и разливают по 0,2 мл в два ряда по 10 пробирок. Затем в пробирки каждого ряда вносят комплемент (разведенный 1:20) в возрастающих дозах от 0,02 мл до 0,2 мл с интервалом 0,02 мл и недостающее до 0,2 мл (в каждой пробирке) количество физиологического раствора.

После разлива комплемента в первый ряд пробирок с каждой сывороткой вносят по 0,2 мл антигена в рабочем разведении, а во второй ряд - по 0,2 мл физиологического раствора. Пробирки ставят в водяную баню при 37 - 38 °С на 20 мин. Затем во все пробирки добавляют по 0,4 мл гемолитической системы, встряхивают их и вновь ставят в водяную баню на 20 мин., после чего учитывают результат.

Схема титрования комплемента в бактериолитической системе (на примере негативной сыворотки) представлена в таблице 1.

Таблица 1

**СХЕМА ТИТРОВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА В БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ**

--------------------T--------T-------------------------------------------------¬

¦Компоненты реакции ¦Ряд про-¦                 Номера пробирок                 ¦

¦                   ¦бирок в +----T----T----T----T----T----T----T----T----T----+

¦                   ¦штативе ¦ 1  ¦ 2  ¦ 3  ¦ 4  ¦ 5  ¦ 6  ¦ 7  ¦ 8  ¦ 9  ¦ 10 ¦

+-------------------+--------+----+----+----+----+----+----+----+----+----+----+

¦Негативная         ¦первый  ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦

¦сыворотка 1:5      ¦второй  ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦

¦                   ¦        ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦Антиген в рабочем  ¦первый  ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦

¦титре              ¦второй  ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦

¦                   ¦        ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦Физиологический    ¦первый  ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦

¦раствор            ¦второй  ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦

¦                   ¦        ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦Комплемент в разве-¦первый  ¦0,02¦0,04¦0,06¦0,08¦0,10¦0,12¦0,14¦0,16¦0,18¦0,20¦

¦дении 1:20         ¦второй  ¦0,02¦0,04¦0,06¦0,08¦0,10¦0,12¦0,14¦0,16¦0,18¦0,20¦

¦                   ¦        ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦Недостающее коли-  ¦первый  ¦0,18¦0,16¦0,14¦0,12¦0,10¦0,08¦0,06¦0,04¦0,02¦-   ¦

¦чество физиологи-  ¦второй  ¦0,18¦0,16¦0,14¦0,12¦0,10¦0,08¦0,06¦0,04¦0,02¦-   ¦

¦ческого раствора   ¦        ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦                                                                              ¦

¦                      Водяная баня 20 минут при 37 - 38°                      ¦

¦                                                                              ¦

¦Гемолитическая     ¦первый  ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦

¦система            ¦второй  ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦

¦                                                                              ¦

¦                      Водяная баня 20 минут при 37 - 38°                      ¦

¦                                                                              ¦

¦Примерный результат¦первый  ¦НГ  ¦НГ  ¦ЧГ  ¦ЧГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦

¦                   ¦второй  ¦НГ  ¦НГ  ¦ЧГ  ¦ЧГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦

L-------------------+--------+----+----+----+----+----+----+----+----+----+-----

Обозначения: ПГ - полный гемолиз, ЧГ - частичный гемолиз, НГ - нет гемолиза.

Примечание. Для удобства в работе и более точной дозировки вначале рекомендуется приготовить необходимые разведения комплемента в 10-кратных объемах в отдельных пробирках. Для этого в дополнительный ряд пробирок вносят комплемент, разведенный 1:20, в дозах 0,2; 0,4; 0,6 мл и т.д. до 2 мл, добавляют в каждую пробирку недостающее до 2 мл количество физиологического раствора, то есть соответственно 1,8; 1,6; 1,4 мл и т.д. Из первой пробирки этого ряда переносят по 0,2 мл жидкости в первые пробирки с сыворотками, взятыми для титрования, из второй пробирки - соответственно во вторые пробирки с сыворотками и т.д. Работу можно выполнять аппаратом Флоринского.

Титром комплемента в бактериолитической системе считают минимальное его количество, вызывающее полный гемолиз взвести эритроцитов в пробирках с негативной и испытуемой сыворотками с антигеном и без антигена, а также в пробирках с позитивной сывороткой без антигена в течение 20 мин. в водяной бане при 37 - 38°, при задержке гемолиза в пробирках с бруцеллезной сывороткой и антигеном.

Примечание. Если в пробирках с испытуемой сывороткой и антигеном отмечают задержку гемолиза более чем на один интервал по сравнению с этой же сывороткой без антигена, это означает, что для титрования была взята положительная сыворотка. В таких случаях определение титра комплемента проводят по ряду пробирок без антигена.

В примере, приведенном в таблице 2, титр комплемента в бактериолитической системе равен 0,1. Рабочий титр комплемента для главного опыта на 0,02 больше, в данном случае 0,12.

Таблица 2

**СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА КОМПЛЕМЕНТА**

---------------T--------T-------------------------------------------------¬

¦  Сыворотки   ¦  Ряды  ¦        Номера пробирок и дозы комплемента       ¦

¦              ¦пробирок+----T----T----T----T----T----T----T----T----T----+

¦              ¦        ¦ 1  ¦ 2  ¦ 3  ¦ 4  ¦ 5  ¦ 6  ¦ 7  ¦ 8  ¦ 9  ¦ 10 ¦

¦              ¦        +----+----+----+----+----+----+----+----+----+----+

¦              ¦        ¦0,02¦0,04¦0,06¦0,08¦0,10¦0,12¦0,14¦0,16¦0,18¦0,20¦

+--------------+--------+----+----+----+----+----+----+----+----+----+----+

¦Позит.        ¦1       ¦++++¦++++¦++++¦++++¦++++¦++++¦++++¦++++¦++++¦++++¦

¦              ¦2       ¦++++¦+++ ¦+   ¦+   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦

¦              ¦        ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦Негат.        ¦1       ¦++++¦++  ¦+   ¦+   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦

¦              ¦2       ¦+++ ¦++  ¦+   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦

¦              ¦        ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦Из опыта      ¦1       ¦++++¦++++¦+++ ¦+++ ¦++  ¦+   ¦+   ¦-   ¦-   ¦-   ¦

¦              ¦2       ¦++++¦+++ ¦++  ¦+   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦-   ¦

L--------------+--------+----+----+----+----+----+----+----+----+----+-----

Расчет количества неразведенного комплемента, необходимого для главного опыта, делают по формуле:

                                    A x B

                                X = -----,

                                     20

где:

X - количество неразведенного комплемента;

A - рабочий титр комплемента;

B - количество пробирок в опыте;

20 - основное разведение комплемента (1:20).

Пример:

        0,12 x 100

    X = ---------- = 0,6.

            20

Так как количество комплемента в рабочем разведении, требующееся для всей реакции (в данном примере 100 пробирок), равно 20 мл (0,2 х 100), то к 0,6 мл неразведенного комплемента следует добавить 19,4 мл физиологического раствора.

4.3.4. Проведение главного опыта.

Испытуемые сыворотки исследуют в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (контроль на антикомплементарность сывороток), при массовом исследовании реакцию проводят в одной пробирке в разведении сыворотки 1:5 с антигеном (см. таблицу 3).

Таблица 3

**СХЕМА ГЛАВНОГО ОПЫТА РСК**

------------------------T------------------T------------------------------¬

¦  Компоненты реакции   ¦   При массовом   ¦ Для повторного исследования  ¦

¦                       ¦   исследовании   +--------------------T---------+

¦                       +---------T--------+пробирки для каждой ¦контроль ¦

¦                       ¦пробирки ¦контроль¦испытуемой сыворотки¦гемолити-¦

¦                       ¦с испыту-¦гемоли- +------T------T------+ческой   ¦

¦                       ¦емыми сы-¦тической¦  1   ¦  2   ¦  3   ¦системы  ¦

¦                       ¦воротками¦системы ¦      ¦      ¦      ¦         ¦

+-----------------------+---------+--------+------+------+------+---------+

¦Испытуемая сыворотка   ¦0,04     ¦-       ¦0,04  ¦0,04  ¦0,02  ¦-        ¦

¦Физиологический раствор¦0,16     ¦0,6     ¦0,36  ¦0,16  ¦0,18  ¦0,6      ¦

¦                                                                         ¦

¦                        Инактивирование сывороток                        ¦

¦                                                                         ¦

¦Антиген в рабочем титре¦0,2      ¦-       ¦-     ¦0,2   ¦0,2   ¦-        ¦

¦Комплемент в рабочем   ¦0,2      ¦-       ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦-        ¦

¦разведении             ¦         ¦        ¦      ¦      ¦      ¦         ¦

¦                                                                         ¦

¦                    Водяная баня 37 - 38° - 20 минут                     ¦

¦                                                                         ¦

¦Гемолитическая система ¦0,4      ¦0,4     ¦0,4   ¦0,4   ¦0,4   ¦0,4      ¦

¦                                                                         ¦

¦                    Водяная баня 37 - 38° - 20 минут                     ¦

L--------------------------------------------------------------------------

Примечание: Допускается смешивание перед разливом равных объемов антигена и комплемента.

Необходимые разведения сывороток рекомендуется готовить следующим образом.

При исследовании в одной пробирке берут 0,1 мл испытуемой сыворотки и добавляют 0,4 мл физиологического раствора (разведение 1:5), после тщательного перемешивания 0,3 мл разведенной сыворотки удаляют.

При постановке реакции в трех пробирках в первую наливают 0,1 мл испытуемой сыворотки и добавляют 0,4 мл физиологического раствора (разведение 1:5). Из первой пробирки 0,2 мл переносят во вторую пробирку и 0,1 мл - в третью, в которую затем добавляют 0,1 мл физиологического раствора (разведение 1:10).

Инактивирование разведенных сывороток проводят в порядке, как указано в подпункте 4.3.2.

Разлив сывороток, физиологического раствора и других компонентов реакции производят при помощи пипеток или аппарата Флоринского.

Реакцию проводят по схеме главного опыта (см. таблицу 3).

Главный опыт сопровождается следующими контролями:

негативная и бруцеллезная сыворотки в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (по схеме главного опыта);

гемолитическая система (0,6 мл физиологического раствора и 0,4 мл гемолитической системы).

4.3.5. Постановка реакции длительного связывания комплемента.

Реакцию длительного связывания комплемента на холоде проводят в пробирках в объеме сыворотки, антигена и комплемента по 0,2 мл, гемолитической системы - в оттитрованной рабочей дозе.

**Последовательность постановки РДСК**

Первый день. Разлив испытуемых и контрольных сывороток для главного опыта и

             для титрования гемолитической системы. Инактивирование

             сывороток.

             Контроль компонентов реакции на антикомплементарность и

             гемотоксичность.

             Разлив антигена и комплемента.

             Приготовление гемолитической системы.

             Помещение пробирок в холодильник.

Второй день. Выдерживание пробирок главного опыта и гемолитической системы

             при комнатной температуре 20 минут.

             Титрование гемолитической системы.

             Определение рабочей дозы гемолитической системы.

             Главный опыт.

             Разлив гемолитической системы в пробирки с исследуемыми

             сыворотками.

             Учет и оценка результатов реакции.

Испытуемые сыворотки исследуют в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена (контроль на антикомплементарность сыворотки), при массовом исследовании реакцию проводят в одной пробирке в разведении сыворотки 1:5 с антигеном (см. таблицу 6). Одновременно разливают сыворотки для титрования гемолитической системы. Необходимые разведения сывороток готовят в порядке как указано в подпункте 4.3.3. Инактивирование разведенных сывороток крови проводят, как указано в подпункте 4.3.2.

Комплемент применяют в рабочем разведении 1:25 или 1:30 (при титре в гемсистеме, указанном биопредприятием, - 0,19 - 0,22).

Примечание: Если титр комплемента в гемсистеме не известен, перед постановкой реакции определяют его рабочее разведение согласно схеме по таблице 4.

Таблица 4

**СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАБОЧЕГО РАЗВЕДЕНИЯ КОМПЛЕМЕНТА**

**ДЛЯ РДСК**

-----------------------T--------------------------------------------------¬

¦      Компоненты      ¦     Номера пробирок и разведения комплемента     ¦

¦                      +----T----T----T----T----T----T----T----T----T-----+

¦                      ¦ 1  ¦ 2  ¦ 3  ¦ 4  ¦ 5  ¦ 6  ¦ 7  ¦ 8  ¦ 9  ¦ 10  ¦

¦                      +----+----+----+----+----+----+----+----+----+-----+

¦                      ¦1:10¦1:20¦1:30¦1:40¦1:50¦1:60¦1:70¦1:80¦1:90¦1:100¦

+----------------------+----+----+----+----+----+----+----+----+----+-----+

¦                  Приготовление разведений комплемента                   ¦

¦                                                                         ¦

¦Комплемент в разведе- ¦0,2 ¦0,1 ¦0,1 ¦0,1 ¦0,1 ¦0,1 ¦0,1 ¦0,1 ¦0,1 ¦0,1  ¦

¦нии 1:10              ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦     ¦

¦Физиологический       ¦-   ¦0,1 ¦0,2 ¦0,3 ¦0,4 ¦0,5 ¦0,6 ¦0,7 ¦0,8 ¦0,9  ¦

¦раствор               ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦     ¦

¦                                                                         ¦

¦                         Титрование комплемента                          ¦

¦                                                                         ¦

¦Комплемент в разведе- ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2  ¦

¦ниях                  ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦     ¦

¦Физиологический       ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4  ¦

¦раствор               ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦     ¦

¦Гемолитическая система¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4  ¦

¦                                                                         ¦

¦                    Водяная баня 37 - 38° - 10 минут                     ¦

¦                                                                         ¦

¦Примерный результат   ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ЧГ  ¦ЧГ  ¦ЧГ  ¦ЧГ  ¦ЧГ   ¦

L----------------------+----+----+----+----+----+----+----+----+----+------

В данном примере полный гемолиз получен при разведении комплемента 1:50, рабочее разведение его в 2 раза меньше, т.е. 1:25.

Разлив компонентов и последовательность постановки реакции осуществляют по схеме, указанной в таблице 6.

Перед разливом гемолитической системы в пробирки с исследуемыми сыворотками проводят титрование гемолитической системы на трех сыворотках - негативной (свежей или консервированной), позитивной (бруцеллезной или овисной) и сыворотке исследуемой партии по схеме согласно таблице 5.

Таблица 5

**СХЕМА ТИТРОВАНИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ**

------------------------T---------T---------------------------------------¬

¦  Компоненты реакции   ¦   Ряд   ¦            Номера пробирок            ¦

¦                       ¦пробирок +---T---T---T---T---T---T---T---T---T---+

¦                       ¦в штативе¦ 1 ¦ 2 ¦ 3 ¦ 4 ¦ 5 ¦ 6 ¦ 7 ¦ 8 ¦ 9 ¦10 ¦

+-----------------------+---------+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+

¦Позитивная, негативная ¦первый   ¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦

¦или испытуемая сыворот-¦второй   ¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦

¦ка в разведении 1:5    ¦         ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦

¦                       ¦         ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦

¦Физиологический раствор¦первый   ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦

¦                       ¦второй   ¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦

¦                       ¦         ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦

¦Антиген в рабочем титре¦первый   ¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦

¦                       ¦второй   ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦-  ¦

¦                       ¦         ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦   ¦

¦Комплемент в рабочем   ¦первый   ¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦

¦разведении             ¦второй   ¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦0,2¦

¦                                                                         ¦

¦                Холодильник 16 - 18 часов при плюс 2 - 6°                ¦

¦                                                                         ¦

¦Гемолитическая система ¦первый   ¦0,1¦0,2¦0,3¦0,4¦0,5¦0,6¦0,7¦0,8¦0,9¦1,0¦

¦                       ¦второй   ¦0,1¦0,2¦0,3¦0,4¦0,5¦0,6¦0,7¦0,8¦0,9¦1,0¦

¦                                                                         ¦

¦                    Водяная баня 37 - 38° - 20 минут                     ¦

¦                                                                         ¦

¦Примерный результат    ¦первый   ¦ПГ ¦ПГ ¦ПГ ¦ПГ ¦ПГ ¦ПГ ¦ЧГ ¦ЧГ ¦ЧГ ¦ЧГ ¦

¦                       ¦второй   ¦ПГ ¦ПГ ¦ПГ ¦ПГ ¦ПГ ¦ПГ ¦ЧГ ¦ЧГ ¦ЧГ ¦ЧГ ¦

L-----------------------+---------+---+---+---+---+---+---+---+---+---+----

Примечание: Если в пробирках с испытуемой сывороткой и антигеном гемолиз будет отсутствовать, это означает, что для титрования гемсистемы была взята положительная сыворотка. В таких случаях при определении титра гемсистемы следует учитывать показания реакции в пробирках без антигена.

Таблица 6

**СХЕМА ПОСТАНОВКИ РДСК**

------------------------T------------------T------------------------------¬

¦  Компоненты реакции   ¦   При массовом   ¦ Для повторного исследования  ¦

¦                       ¦   исследовании   +--------------------T---------+

¦                       +---------T--------+пробирки для каждой ¦контроль ¦

¦                       ¦пробирки ¦контроль¦испытуемой сыворотки¦гемолити-¦

¦                       ¦с испыту-¦гемоли- +------T------T------+ческой   ¦

¦                       ¦емыми сы-¦тической¦  1   ¦  2   ¦  3   ¦системы  ¦

¦                       ¦воротками¦системы ¦      ¦      ¦      ¦         ¦

+-----------------------+---------+--------+------+------+------+---------+

¦Испытуемая сыворотка   ¦0,04     ¦-       ¦0,04  ¦0,04  ¦0,02  ¦-        ¦

¦Физиологический раствор¦0,16     ¦0,6     ¦0,36  ¦0,16  ¦0,18  ¦0,6      ¦

¦                                                                         ¦

¦                    Водяная баня 63 - 64° - 30 минут                     ¦

¦                                                                         ¦

¦Антиген бруцеллезный   ¦0,2      ¦-       ¦-     ¦0,2   ¦0,2   ¦-        ¦

¦или овисный в рабочем  ¦         ¦        ¦      ¦      ¦      ¦         ¦

¦титре                  ¦         ¦        ¦      ¦      ¦      ¦         ¦

¦Комплемент в рабочем   ¦0,2      ¦-       ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦-        ¦

¦разведении             ¦         ¦        ¦      ¦      ¦      ¦         ¦

¦                                                                         ¦

¦           Холодильник плюс 2 - 6° - 16 - 18 часов и 20 минут            ¦

¦                        при комнатной температуре                        ¦

¦                                                                         ¦

¦Гемолитическая система ¦0,5      ¦0,5     ¦0,5   ¦0,5   ¦0,5   ¦0,5      ¦

¦в рабочем титре        ¦         ¦        ¦      ¦      ¦      ¦         ¦

¦                                                                         ¦

¦                    Водяная баня 37 - 38° - 20 минут                     ¦

L--------------------------------------------------------------------------

Титром гемолитической системы считают наибольшее ее количество, в котором произошел полный гемолиз в обоих рядах пробирок с негативной и испытуемой сыворотками и в безантигенном ряду с позитивной сывороткой. Рабочий титр на один интервал ниже (например: при титре гемолитической системы 0,6 мл рабочий титр - 0,5 мл).

Контроли реакции:

негативная и позитивная (бруцеллезная или овисная) сыворотки в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена;

гемолитическая система без сыворотки, антигена и комплемента.

4.3.6. Учет результатов РСК и РДСК.

Реакцию связывания комплемента и реакцию длительного связывания комплемента учитывают визуально. При постановке реакций в одной пробирке (при массовом исследовании) учет проводят один раз - сразу после извлечения штативов из водяной бани. При исследовании в трех пробирках - через 3 - 4 часа, когда в контрольных пробах с позитивной (бруцеллезной или овисной) сывороткой эритроциты осядут на дно пробирки, или на следующий день (в этом случае штативы с пробирками главного опыта оставляют в холодильнике).

Результаты реакций оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ (4 креста) - отсутствие гемолиза, надосадочная жидкость прозрачная и

                  бесцветная;

+++ (3 креста)  - гемолиз 25% эритроцитов;

++ (2 креста)   - гемолиз 50% эритроцитов;

+ (1 крест)     - гемолиз 75% эритроцитов;

- (минус)       - полный гемолиз эритроцитов, осадок отсутствует, жидкость

                  интенсивно окрашена гемоглобином.

Степень задержки гемолиза эритроцитов определяют по шкале, которую готовят перед учетом реакции. Для этого из реакции выбирают 5 пробирок с полным гемолизом и жидкость из них сливают в одну. Из этой жидкости готовят разведения с меньшим процентом гемолиза по следующей схеме:

------------------------------T------T------T------T------T------¬

¦       Номера пробирок       ¦  1   ¦  2   ¦  3   ¦  4   ¦  5   ¦

+-----------------------------+------+------+------+------+------+

¦Гемолизированная жидкость    ¦1,0   ¦0,75  ¦0,5   ¦0,25  ¦-     ¦

¦Физиологический раствор      ¦-     ¦0,25  ¦0,5   ¦0,75  ¦10    ¦

¦Процент гемолиза             ¦100   ¦75    ¦50    ¦25    ¦0     ¦

L-----------------------------+------+------+------+------+-------

Степень гемолиза в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют путем сравнения со степенью гемолиза в пробирках шкалы и процент гемолиза выражают в крестах.

4.3.7. Диагностическая оценка РСК и РДСК.

При исследовании сывороток в одной пробирке (в разведении 1:5 с антигеном) все сыворотки, давшие задержку гемолиза на один крест и выше, исследуют повторно в тот же или на другой день в трех пробирках в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена.

Реакцию считают: положительной - при задержке гемолиза на 2 - 4 креста в одном или в двух разведениях сыворотки (1:5 или 1:10) и полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена); сомнительной - при задержке гемолиза с оценкой в один крест. При получении сомнительного результата сыворотки крови от животных через 15 - 30 дней исследуют повторно. При этом животных, с сывороткой крови которых получена дважды сомнительная РСК (РДСК), считают реагирующими положительно.

Суммарные результаты исследования испытуемых сывороток по каждой экспертизе, номера серий, сроки годности антигена, комплемента, гемолизина и их рабочие титры записывают в журнал серологических исследований.

В заключении лаборатории о результатах исследования сывороток крови животных указывают диагностическую оценку каждой пробы (положительная, сомнительная, отрицательная) и показания реакции в крестах.

4.4. Постановка и учет результатов пластинчатой реакции агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба или РБП).

4.4.1. Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз бенгал антигеном (РБП) применяют для исследования сывороток крови при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, свиней, буйволов, верблюдов и северных оленей.

4.4.2. Компоненты РБП:

испытуемые сыворотки крови (см. подпункт 2.3.1);

бруцеллезный антиген, окрашенный бенгальским розовым (роз бенгал антиген) (см. Приложение N 2, п. 6);

позитивная бруцеллезная и негативная сыворотки;

0,5-процентный фенолизированный физиологический раствор (см. Приложение N 2, п. 1).

4.4.3. Постановка РБП. Реакцию проводят на чистых сухих эмалированных пластинках с лунками при температуре 18 - 30 °С. На бортиках пластинки против каждой лунки записывают номер исследуемой сыворотки.

Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки при помощи шприца-полуавтомата (ШПРБ-1) или микропипетки. После внесения каждой сыворотки шприц-полуавтомат (микропипетку) трижды промывают фенолизированным физиологическим раствором и кончик подсушивают фильтровальной бумагой.

При исследовании сывороток крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов и свиней в каждую лунку рядом с сывороткой при помощи пипетки-капельницы вносят 0,03 мл антигена, а при исследовании сывороток крови овец, коз, буйволов и северных оленей - 0,015 мл антигена. Затем антиген тщательно в каждой лунке смешивают с сывороткой активными движениями ручного полисмесителя до получения однородной смеси, распределяя ее при этом по всей поверхности лунки. После смешивания сывороток каждого ряда лунок (смесителем на 5 проб) или во всех лунках пластинки (смесителем на 25 проб) смеситель ополаскивают фенолизированным физиологическим раствором и просушивают марлевой салфеткой или фильтровальной бумагой.

Пластинку с сыворотками и антигеном покачивают в течение 4 минут осторожными вращательными движениями вручную или при помощи автоматического прибора, предназначенного для этой цели. При положительной реакции в течение 4 минут появляются мелкие или крупные хлопья агглютината розового цвета.

В начале работы ставят контроль антигена с негативной и позитивной бруцеллезной (с активностью 100 - 200 МЕ) сыворотками в тех же дозах, а также контроль антигена на спонтанную агглютинацию (к 0,03 мл антигена добавляют 0,03 мл физиологического раствора).

4.4.4. Учет результатов реакции проводят невооруженным глазом в течение 4 минут после смешивания сывороток с антигеном при слегка наклонном положении пластинки.

Реакцию считают положительной при наличии выраженной агглютинации окрашенных бруцелл антигена в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета, выделяющихся на белом фоне лунки.

Реакцию считают отрицательной при отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена).

После учета реакции пластинки дезинфицируют погружением их на 5 минут в 3-процентный раствор фенола, затем тщательно моют водопроводной водой, высушивают на воздухе и используют повторно. Для проведения дезинфекции и сушки пластинок используют кассеты и штативы-сушилки.

При нечетко выраженной агглютинации проводят повторное исследование данной сыворотки и по результатам его дают окончательную оценку реакции (положительная или отрицательная).

4.4.5. Диагностическая оценка РБП. При получении положительного результата РБП при исследовании сывороток крови животных в благополучных по бруцеллезу хозяйствах все сыворотки, с которыми получена положительная РБП, в тот же или на другой день исследуют в РА и РСК (см. подпункты 4.2 и 4.3) для установления титра агглютининов и наличия комплементсвязывающих антител. Сыворотки, с которыми получена отрицательная РБП, дополнительно в РА и РСК не исследуют.

Диагностическую оценку результатов исследования сывороток крови и РБП проводят по следующей схеме:

-------------------------------------------------T---------------¬

¦               Результаты реакций               ¦Диагностическая¦

+---------------T---------------T----------------+    оценка     ¦

¦      РПБ      ¦       РА      ¦   РСК (РДСК)   ¦               ¦

+---------------+---------------+----------------+---------------+

¦положительная  ¦положительная  ¦положительная   ¦положительная  ¦

¦положительная  ¦положительная  ¦сомнительная    ¦положительная  ¦

¦положительная  ¦положительная  ¦отрицательная   ¦положительная  ¦

¦положительная  ¦сомнительная   ¦положительная   ¦положительная  ¦

¦положительная  ¦сомнительная   ¦сомнительная    ¦положительная  ¦

¦положительная  ¦сомнительная   ¦отрицательная   ¦положительная  ¦

¦положительная  ¦отрицательная  ¦положительная   ¦положительная  ¦

¦положительная  ¦отрицательная  ¦сомнительная    ¦положительная  ¦

¦положительная  ¦отрицательная  ¦отрицательная   ¦сомнительная   ¦

¦отрицательная  ¦не исследуется ¦не исследуется  ¦отрицательная  ¦

L---------------+---------------+----------------+----------------

При получении положительного результата РБП при исследовании сывороток крови животных в неблагополучных по бруцеллезу стадах (на фермах, в хозяйствах, населенных пунктах) овец, коз, свиней и северных оленей, с сыворотками крови которых получена положительная РБП, признают больными бруцеллезом, а сыворотки крови крупного рогатого скота, буйволов, лошадей и верблюдов дополнительно исследуют РА и РСК. Диагностическую оценку результатов исследования сывороток в РБП в этом случае проводят по схеме, приведенной выше.

В заключении лаборатории о результатах исследований сообщают диагностическую оценку (положительная, сомнительная, отрицательная) и указывают показания всех реакций. Например, "положительная (РБП положительная, РА 200 МЕ, РСК ++)", "сомнительная (РБП положительная, РА -, РСК -)".

При диагностической оценке "сомнительная" сыворотку крови данного животного повторно исследуют через 15 - 30 дней в РБП, РА и РСК (РДСК). При получении положительных или вновь сомнительных показаний реакций результат исследования оценивают положительно.

4.5. Кольцевая реакция с молоком (КР).

4.5.1. Кольцевую реакцию применяют с целью проверки благополучия стад (ферм) по бруцеллезу крупного рогатого скота и для проверки молока при продаже его на рынках.

Исследование молока в КР разрешается проводить только непосредственно в хозяйствах, в ветеринарных лабораториях, на мясо-молочных и пищевых контрольных станциях.

Исследование молока в КР разрешается проводить только ветеринарным врачам лабораторий, мясо-молочных и пищевых контрольных станций и ветеринарным врачам хозяйств, прошедшим при лабораториях специальную подготовку по постановке и учету реакции.

4.5.2. Компоненты реакции:

исследуемое молоко (см. подпункт 2.2);

антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком (см. Приложение N 2, п. 6);

сыворотка позитивная бруцеллезная.

4.5.3. Постановка кольцевой реакции.

Уленгутовские пробирки устанавливают в резиновые штативы и нумеруют в соответствии с описью проб молока. В пробирки разливают по 0,05 мл антигена, затем шприцем с иглой длиной 50 - 60 мм, нажимая на поршень слабыми толчками, вливают в них по 1 мл молока и тщательно смешивают его с антигеном. После каждой пробы молока шприц двукратно промывают теплой водой.

При постановке КР в пробирках Флоринского или серологических берут по 2 мл молока и добавляют по 0,1 мл антигена, затем пробирки тщательно встряхивают для перемешивания молока с антигеном.

При каждой постановке реакции одновременно с испытуемыми пробами молока ставят контроли:

с молоком от заведомо здоровой коровы (буйволицы);

со смесью молока здоровой коровы и позитивной бруцеллезной сыворотки (0,05 мл сыворотки на 1 мл молока).

Штативы с испытуемыми и контрольными пробами молока помещают в водяную баню или термостат при 37 - 38° на 1 час.

4.5.4. Учет и оценка результатов кольцевой реакции.

Результаты реакции учитывают визуально сразу после извлечения штативов из водяной бани (термостата) по следующей схеме (в крестах):

+++ (3 креста) - четко выраженное синее кольцо в верхней части [столбика](http://www.alppp.ru/stolby-telegrafnye/)

                 молока в слое сливок (остальная часть молока остается

                 белой);

++ (2 креста)  - достаточно выраженное синее кольцо в слое сливок

                 (остальная часть молока имеет синеватый цвет);

+ (1 крест)    - синее кольцо в слое сливок выражено слабо и весь столбик

                 молока имеет синий цвет;

- (знак минус) - столбик молока остается равномерно окрашенным в

                 первоначальный синий цвет, который был получен сразу после

                 добавления к нему антигена, а слой сливок - белого или

                 слегка желтоватого цвета.

Все пробы молока, давшие кольцевую реакцию с оценкой 3 и 2 креста, считают положительными, а с оценкой 1 крест - сомнительными.

При получении положительного или сомнительного результата КР от всех животных берут кровь для исследования на бруцеллез в РБП или РА и РСК (РДСК), проводят эпизоотологическое обследование хозяйства, клинический осмотр и исследование животных на заболевание маститами.

При получении отрицательных результатов исследования сывороток крови в РБП или в РА и РСК (РДСК) у всех животных данное стадо считают благополучным по бруцеллезу, а животных, с молоком которых получена положительная КР, оставляют в стаде.

В случае получения положительных результатов исследования на бруцеллез крови с животными стада поступают в соответствии с инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных. При этом изолируют также и животных, выделенных при исследовании молока в КР, если эта реакция не была связана с другим заболеванием животных.

**5. АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ**

5.1. Метод аллергического исследования основан на выявлении у больных бруцеллезом животных повышенной чувствительности замедленного типа к специфическому аллергену.

5.2. Аллергический метод применяют для исследования на бруцеллез крупного рогатого скота, буйволов, овец, коз, свиней и северных оленей, не подвергавшихся прививке вакцинами против бруцеллеза, в случаях, предусмотренных инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных.

Аллергическое исследование на бруцеллез животных разрешается проводить только ветеринарным врачам или фельдшерам со средним специальным образованием под наблюдением врача.

5.3. Для аллергической диагностики бруцеллеза у животных применяют бруцеллин ВИЭВ.

Бруцеллин - стерильный биологический препарат, представляет собой прозрачную жидкость коричневато-желтого цвета без опалесценции, содержащую продукты жизнедеятельности и специфические вещества, извлеченные из бруцелл.

Флаконы с бруцеллином должны быть плотно закрыты пробками и закатаны алюминиевыми колпачками. При встряхивании и переворачивании флакона препарат не должен просачиваться через пробку. На каждом флаконе должна быть этикетка (или надпись) с обозначением наименования биопредприятия, изготовившего бруцеллин, наименования препарата и его количества, номера серии, даты выпуска, срока годности, номера госконтроля, условий хранения, стандарта (ГОСТ) и обозначения ТУ.

5.4. Бруцеллин используют только в день вскрытия флакона. Он пригоден для применения в течение 18 месяцев со дня изготовления при условии хранения в темном сухом помещении при температуре плюс 2 - 15 °С.

5.5. Каждый флакон с бруцеллином перед применением просматривают. При обнаружении в препарате каких-либо примесей, плесени, хлопьев, при нарушении целостности стекла или укупорки, отсутствии надписи на флаконе, а также бруцеллин, подвергавшийся замораживанию и давший осадок или помутнение, к применению не допускается.

5.6. Для введения животным бруцеллина используют короткие инъекционные иглы (N 0420 - 0813) или иглы для внутрикожных инъекций с двумя трубками (N 0706, ТУ 46-22-607-80) и шприцы, снабженные бегунком, вместимостью 2 или 5 мл. При исследовании свиней можно применять безыгольные инъекторы.

Шприцы и иглы перед и после их использования стерилизуют кипячением в течение 30 минут в дистиллированной или кипяченой воде без добавления дезинфицирующих средств. Безыгольные инъекторы стерилизуют в соответствии с инструкцией по их использованию.

Во время исследования животных инъекционные иглы меняют перед каждым наполнением шприца бруцеллином, а в промежутках между инъекциями препарата иглу держат в ватном тампоне, смоченном 70° спиртом.

5.7. Непосредственно перед применением бруцеллина алюминиевый колпачок флакона с препаратом приоткрывают, резиновую пробку обрабатывают спиртом, прокалывают инъекционной иглой и шприцем через нее набирают необходимое количество аллергена.

Бруцеллин вводят животным под кожу нижнего века на 1 см ниже края века со стороны наружного угла глаза (пальпебральная проба): овцам, козам и оленям в дозе 0,5 мл, крупному рогатому скоту и буйволам в дозе 1,0 мл.

Вводить бруцеллин под кожу века, имеющую травматические повреждения, уплотнения, абсцессы и другие поражения, не разрешается. Животных с заболеванием глаз или с густым шерстным покровом в области век метят и вводят им бруцеллин внутрикожно в центре одной из подхвостовых складок в дозах: овцам и козам - 0,2 мл и крупному рогатому скоту и буйволам - 0,3 мл (внутрикожная проба).

Свиньям бруцеллин вводят внутрикожно с наружной стороны ушной раковины, ближе к основанию уха в дозе 0,2 мл. Правильность внутрикожной инъекции препарата контролируют по образованию бугорка размером с горошину.

При инъекции препарата животным обязательно соблюдение правил асептики. Участок кожи перед уколом протирают ватой, смоченной в спирте или 3-процентном растворе борной кислоты.

5.8. У животных, больных бруцеллезом, на месте введения бруцеллина наступает воспалительная реакция в виде плотной или тестоватой припухлости, обычно хорошо видимой при осмотре; у свиней, кроме того, может развиваться гиперемия, иногда кровоизлияние в виде темно-красного пятна в центре отека. У здоровых животных местная реакция не возникает.

5.9. Реакцию на бруцеллин у овец, коз, оленей, крупного рогатого скота и буйволов учитывают один раз через 48 часов, у свиней - два раза, через 24 и 48 часов после введения препарата, путем осмотра, а при неясно выраженной реакции - пальпацией места инъекции.

При обнаружении на месте введения препарата припухлости реакцию оценивают как положительную.

В случае неясно выраженной реакции пальпируют место введения препарата и сравнивают с кожей века другого глаза (или подхвостовой складки), а у свиней - с кожей основания другого уха. Если обнаруживают хотя бы небольшую разницу, реакцию считают положительной. При отсутствии указанных признаков реакции результат исследования считают отрицательным.

Реагирующих на бруцеллин животных метят и выделяют из отары (стада).

5.10. С животными, признанными при исследовании бруцеллина реагирующими положительно, поступают согласно Инструкции о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных.

5.11. После применения бруцеллина у животных можно в любые сроки брать кровь для исследования на бруцеллез серологическими методами.

5.12. Проведение аллергического исследования на бруцеллез животных оформляют актом с приложением к нему описи реагировавших животных (указывают инвентарный номер, пол и возраст животных, характер реакции на бруцеллин). Один экземпляр акта направляют главному ветврачу района, другой хранят в хозяйстве.

С выходом настоящих Методических указаний утрачивают силу:

"Наставление по лабораторной диагностике бруцеллеза сельскохозяйственных животных" от 17 февраля 1940 г.;

"Наставление по диагностике бруцеллеза у коров методом кольцевой реакции (КР) с молоком" от 2 ноября 1960 г.;

"Наставление по применению бруцеллина ВИЭВ для аллергической диагностики бруцеллеза у мелкого рогатого скота и свиней" от 24 декабря 1969 г.;

"Временное наставление по клинической и лабораторной диагностике инфекционного заболевания овец, вызываемого бруцеллой овис (инфекционный эпидидимит баранов)" (приложение к циркулярному письму Главного управления ветеринарии МСХ СССР от 10 марта 1970 г. N 116-9);

"Наставление по постановке и учету реакции агглютинации при диагностике бруцеллеза сельскохозяйственных животных" от 19 мая 1964 г. с изменениями и дополнениями, внесенными 11 декабря 1970 г.;

"Наставление по постановке и учету реакции связывания комплемента (РСК) и реакции длительного связывания комплемента (РДСК) при диагностике бруцеллеза у животных" от 27 мая 1976 г.;

"Наставление по постановке и учету пластинчатой реакции агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба или РБП) при диагностике бруцеллеза у животных" от 12 декабря 1978 г.

Указания по диагностике бруцеллеза животных разработаны Всесоюзным Ордена Ленина научно-исследовательским институтом экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (проф. П.С. Уласевич, кандидаты вет. наук А.Н. Касьянов и В.А. Ромахов), Всесоюзным государственным ордена Трудового Красного Знамени научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов МСХ СССР (канд. вет. наук К.В. Шумилов), Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР (Э.С. Плотников) и Центральной ветеринарной лабораторией (Б.И. Антонов, Т.А. Сысоева, В.В. Борисова).

Приложение N 1

к Методическим указаниям

по диагностике бруцеллеза животных

от 30 декабря 1982 года

**1. МЕТОДЫ ОКРАСКИ БРУЦЕЛЛ**

Окраска мазков по Стампу. Фиксированный на пламени мазок окрашивают в течение 10 мин. раствором карболового фуксина Циля в разведении 1:10, слегка промывают водой и дифференцируют 0,5-процентным раствором уксусной кислоты в течение 30 сек. Вновь тщательно промывают водой и докрашивают 1-процентным раствором метиленового синего в течение 20 - 30 сек. Краску сливают, мазок промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: бруцеллы - красные, другая микрофлора и фон препарата - синие.

Окраска мазков по Козловскому. Фиксированный на пламени мазок окрашивают 2-процентным раствором сафранина, подогревая до появления пузырьков. Затем мазок быстро промывают водой и дополнительно окрашивают 0,75 - 1-процентным водным раствором малахитового зеленого в течение 0,5 - 1 мин. Краску сливают, мазок промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: бруцеллы - ярко-красные, другая микрофлора и фон препарата окрашены в зеленый цвет.

Раствор малахитового зеленого может быть заменен 1-процентным раствором метиленового синего или бриллиантовой зелени.

Окраска мазков по Шуляку-Шин. Фиксированный на пламени мазок окрашивают в течение 2 минут карболовым фуксином Циля, разведенным 1:5, промывают водой и докрашивают в течение 5 минут 2-процентным водным раствором метиленового синего. Краску сливают, мазок промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: бруцеллы - ярко-красные, другая микрофлора и фон препарата окрашены в сине-голубой цвет.

**2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД**

Мясная вода. Свежее мясо крупного рогатого скота освобождают от костей, жира и сухожилий и пропускают через мясорубку. 500 г фарша заливают 1 л водопроводной воды и выдерживают в течение 15 - 18 часов в прохладном месте. Затем настой кипятят в течение 30 - 40 минут, доливают дистиллированной водой до первоначального объема и фильтруют через ватно-марлевый фильтр или через полотно. Полученную мясную воду стерилизуют при 120° в течение 20 мин.

Печеночная вода. Свежую печень крупного рогатого скота освобождают от жира, канальцев, пленок и пропускают через мясорубку. 500 г фарша заливают 1 л водопроводной воды, настаивают в течение 1 часа и кипятят при помешивании в течение 3 минут. После отстаивания фарш удаляют, а жидкость доливают дистиллированной водой до первоначального объема и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Разливают по колбам, стерилизуют при 112° (0,5 атм.) в течение 30 - 40 минут.

Мясо-пептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГГА). К 610 мл мясной воды добавляют 305 мл печеночной воды, 10 г пептона, 5 г х.ч. хлорида натрия и 20 - 30 г агар-агара, предварительно промытого и хорошо отжатого. Смесь варят в течение 1 часа в автоклаве, фильтруют через нейлоновый или ватно-марлевый фильтр, устанавливают рН 7,2, добавляют 10 г глюкозы и 20 мл глицерина. Среду разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют при 110° (0,4 атм.) в течение 30 минут. рН среды до стерилизации - 7,3 - 7,4, после стерилизации - 6,8 - 7,0.

Мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) готовят аналогично МППГГА, но без добавления агар-агара, глюкозы и глицерина.

Печеночно-глюкозно-глицериновый агар (ПГГА). К печеночной воде добавляют 1% пептона, 0,5% х.ч. хлорида натрия и 2 - 3% агар-агара, предварительно промытого и хорошо отжатого. Смесь варят в течение 1 часа в автоклаве, фильтруют через нейлоновый или ватный фильтр, устанавливают рН 7,0 - 7,2, добавляют 1% глюкозы и 2 - 3% глицерина. Среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 110° (0,4 атм.) в течение 30 минут.

Печеночно-глюкозно-глицериновый бульон готовят аналогично ПГГА, но без добавления агар-агара.

Картофельный агар. 500 г очищенного картофеля (берут белые или желтые клубни средней величины), нарезанного ломтиками, варят в 1 л водопроводной воды до готовности (избегать сильного разваривания картофеля). Затем отвар фильтруют через ватный фильтр и дистиллированной водой доводят объем до первоначального (1 л). К фильтрату добавляют 1% пептона, 0,5% х.ч. хлорида натрия и 2 - 3% агар-агара. Смесь варят до полного расплавления агара, устанавливают рН 7,2 и отстаивают в теплом месте. В застывшем агаре срезают нижний слой с осадком, а прозрачную часть агара расплавляют и фильтруют через ватный фильтр. Вновь устанавливают рН 7,2, добавляют 1% глюкозы, и 3% глицерина, разливают по пробиркам или колбам и стерилизуют при 115° (0,7 атм.) в течение 20 - 30 минут. После стерилизации рН среды 6,8.

Сывороточно-декстрозный агар. К 835 мл дистиллированной воды добавляют 20 г агар-агара, 10 г пептона, 5 г х.ч. хлорида натрия и 165 мл мясной воды. Смешивают, кипятят до расплавления агара, устанавливают рН 7,8. Затем стерилизуют текучим паром в течение 1 часа, после чего пар закрывают, давление доводят до 2 атм. и нагреватель выключают. После автоклавирования среду отстаивают в течение 1 часа, затем фильтруют через ватный или бумажный фильтр, доводят рН до 7,4, разливают в колбы, учитывая объем среды, и стерилизуют при 115° (0,7 атм.) в течение 15 минут.

Перед употреблением среду расплавляют, охлаждают до 50° и добавляют к ней нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота или лошади и раствор декстрозы, профильтрованные через фильтр Зейтца. Конечная концентрация сыворотки в среде должна быть 10%, декстрозы - 1%.

Плотный печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар. К 1000 мл печеночной воды добавляют 10 г пептона, 5 г х.ч. хлорида натрия, 20 г агар-агара. К полученной смеси добавляют 17 мл 10-процентного раствора двууглекислой соды и автоклавируют при 115° (0,7 атм.) в течение 20 - 25 минут, фильтруют через ватный фильтр, устанавливают рН 7,0 - 7,2 и добавляют 10 г глюкозы и 20 мл глицерина. Разливают в колбы и стерилизуют при 110° (0,4 атм.) в течение 20 минут. Хранят в прохладных условиях. Перед употреблением смесь расплавляют, охлаждают до 50° и добавляют 10 - 20% стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота (овец) или 10 - 15% аминопептида, затем разливают в пробирки или бактериологические чашки.

Полужидкий печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар. Берут мясной печеночной воды по 500 мл, добавляют 10 г пептона, 5 г х.ч. хлорида натрия, 1,5 - 2 г агар-агара. Устанавливают рН 7,0 - 7,2. Смесь кипятят, разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве при 115° (0,7 атм.) в течение 30 минут. Хранят на холоде. Перед употреблением добавляют стерильную сыворотку крови крупного рогатого скота или овец или аминопептид из расчета 10% к объему среды и разливают в пробирки.

Эритрит агар. Представляет собой готовую питательную среду для выделения бруцелл. Готовится по прописи завода-изготовителя.

**3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА**

В пробирку наливают 2 - 3 мл 0,1-процентного раствора бикарбоната натрия и добавляют 1 - 2 капли 0,5-процентного раствора бромтимолового синего. В обычной атмосфере смесь имеет отчетливый синий цвет.

Пробирку ставят в эксикатор, в котором необходимо определить содержание углекислого газа. Учет проводят через 1 час по изменению окраски смеси, пользуясь следующей таблицей.

----------------T------------------------------------------------¬

¦ Окраска смеси ¦Процентное содержание CO  в атмосфере эксикатора¦

¦               ¦                        2                       ¦

+---------------+------------------------------------------------+

¦Синяя          ¦до 5                                            ¦

¦Сине-зеленая   ¦5                                               ¦

¦Зеленая        ¦10                                              ¦

¦Зелено-желтая  ¦15                                              ¦

¦Желтая         ¦20                                              ¦

L---------------+-------------------------------------------------

Приложение N 2

к Методическим указаниям

по диагностике бруцеллеза животных

от 30 декабря 1982 года

**1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФЕНОЛИЗИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ**

**ХЛОРИДА НАТРИЯ ДЛЯ РА**

Для приготовления фенолизированного 0,85; 5 и 10-процентного раствора хлорида натрия в 1000 мл дистиллированной воды растворяют при подогревании соответственно 8,5; 50 или 100 г хлорида натрия и 5 г фенола. Доводят рН раствора до 7,0 - 7,2 и фильтруют через бумажный фильтр.

**2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА ХЛОРИДА НАТРИЯ**

**С ДОБАВЛЕНИЕМ ИОНОВ МАГНИЯ И КАЛЬЦИЯ (ДЛЯ РСК И РДСК)**

Основные растворы солей магния и кальция готовят следующим образом: 1 г хлорида магния х.ч. растворяют в 11,8 мл и 1 г хлорида кальция х.ч. - в 54,4 мл дистиллированной воды. Основные растворы этих солей хранят в холодильнике.

Перед постановкой реакции берут на 1 л физиологического раствора хлорида натрия по 1,2 мл основных растворов хлорида магния и хлорида кальция. Смесь кипятят, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и доводят рН до 7,3 - 7,4 прибавлением едкого натрия или соляной кислоты.

**3. ПОЛУЧЕНИЕ И ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА**

**ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РСК И РДСК**

Кровь у барана (овцы) берут из яремной вены с соблюдением правил асептики в сосуд со стеклянными или фарфоровыми бусами (для дефибринирования) или в сосуд с налитым в него раствором Алсивера в количестве, равном объему крови (для дефибринирования и консервирования). Для консервирования дефибринированной крови применяют раствор стрептомицина (1 г стрептомицина, растворенного в 20 мл физиологического раствора, на 100 мл крови).

Дефибринированная кровь пригодна для исследования в течение трех дней, консервированная стрептомицином или раствором Алсивера - в течение 12 дней.

Приготовление раствора Алсивера: в 1000 мл дистиллированной воды растворяют 18,7 г глюкозы, 4,2 г хлорида натрия, 8,0 г лимоннокислого натрия, 0,5 г лимонной кислоты. Раствор доводят до кипения, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы или флаконы и стерилизуют в автоклаве (при 103 - 105 °С в течение 30 минут) через фильтр Зейтца.

Для приготовления суспензии эритроцитов крови барана берут свежую дефибринированную или консервированную кровь, центрифугируют при 1500 - 3000 об./мин. в течение 15 мин., жидкую часть сливают, а осадок 2 - 3 раза отмывают в физиологическом растворе путем центрифугирования в указанном порядке до полного обесцвечивания надосадочной жидкости.

**4. ТИТРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА В ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ В РСК**

Комплемент титруют в разведении 1:20 в дозах от 0,02 до 0,2 с интервалами в дозах по 0,02 мл. После внесения комплемента в каждую пробирку добавляют недостающее до 0,2 мл количество физиологического раствора и остальные компоненты по схеме, как указано в таблице 1.

Таблица 1

**СХЕМА ТИТРОВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА В ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ**

------------------------T-------------------------------------------------¬

¦       Компоненты      ¦                 Номера пробирок                 ¦

¦                       +----T----T----T----T----T----T----T----T----T----+

¦                       ¦ 1  ¦ 2  ¦ 3  ¦ 4  ¦ 5  ¦ 6  ¦ 7  ¦ 8  ¦ 9  ¦ 10 ¦

+-----------------------+----+----+----+----+----+----+----+----+----+----+

¦Комплемент в разведении¦0,02¦0,04¦0,06¦0,08¦0,10¦0,12¦0,14¦0,16¦0,18¦0,20¦

¦1:20                   ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦Физиологический раствор¦0,18¦0,16¦0,14¦0,12¦0,10¦0,08¦0,06¦0,04¦0,02¦-   ¦

¦Гемолизин в удвоенном  ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦

¦титре                  ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦2,5-процентная взвесь  ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦0,2 ¦

¦эритроцитов барана     ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦    ¦

¦Физиологический раствор¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦0,4 ¦

¦                                                                         ¦

¦                   Водяная баня 10 минут при 37 - 38°                    ¦

¦                                                                         ¦

¦Примерный результат    ¦ЧГ  ¦ЧГ  ¦ЧГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦ПГ  ¦

L-----------------------+----+----+----+----+----+----+----+----+----+-----

Титром комплемента в гемолитической системе считают наименьшее количество его, вызывающее полный гемолиз эритроцитов в течение 10 минут в водяной бане при 37 - 38 °С.

В примере, приведенном в таблице 1, титр комплемента в гемолитической системе равен 0,08.

**5. ТИТРОВАНИЕ ГЕМОЛИЗИНА**

Гемолизин титруют периодически один раз в три месяца и каждую новую серию в разведениях 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:3500 и 1:4000 по схеме, как указано в таблице 2.

Таблица 2

**СХЕМА ТИТРОВАНИЯ ГЕМОЛИЗИНА**

-------------------T------------------------------------------------------¬

¦    Компоненты    ¦                Разведение гемолизина                 ¦

¦                  +-----T------T------T------T------T------T------T------+

¦                  ¦1:500¦1:1000¦1:1500¦1:2000¦1:2500¦1:3000¦1:3500¦1:4000¦

+------------------+-----+------+------+------+------+------+------+------+

¦Гемолизин         ¦0,2  ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦

¦Комплемент в      ¦0,2  ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦

¦разведении 1:20   ¦     ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦

¦Эритроциты        ¦0,2  ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦0,2   ¦

¦(2,5-процентная   ¦     ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦

¦взвесь)           ¦     ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦

¦Физиологический   ¦0,4  ¦0,4   ¦0,4   ¦0,4   ¦0,4   ¦0,4   ¦0,4   ¦0,4   ¦

¦раствор           ¦     ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦

¦                                                                         ¦

¦                    Водяная баня 10 мин. при 37 - 38°                    ¦

¦                                                                         ¦

¦Примерный         ¦ПГ   ¦ПГ    ¦ПГ    ¦ЧГ    ¦ЧГ    ¦ЧГ    ¦ЧГ    ¦ЧГ    ¦

¦результат         ¦     ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦      ¦

L------------------+-----+------+------+------+------+------+------+-------

Разведения гемолизина готовят из основного (1:100) по следующей схеме:

-------------------------------T----------------T----------------¬

¦Основное разведение гемолизина¦Физиологический ¦   Получаемые   ¦

¦          1:100 (мл)          ¦  раствор (мл)  ¦   разведения   ¦

+------------------------------+----------------+----------------+

¦             0,4              ¦      1,6       ¦     1:500      ¦

¦             0,1              ¦      0,9       ¦     1:1000     ¦

¦             0,1              ¦      1,4       ¦     1:1500     ¦

¦             0,1              ¦      1,9       ¦     1:2000     ¦

¦             0,1              ¦      2,4       ¦     1:2500     ¦

¦             0,1              ¦      2,9       ¦     1:3000     ¦

¦             0,1              ¦      3,4       ¦     1:3500     ¦

¦             0,1              ¦      3,9       ¦     1:4000     ¦

L------------------------------+----------------+-----------------

Титром гемолизина считают наименьшее его количество, необходимое для полного гемолиза в течение 10 минут 0,2 мл взвеси эритроцитов в присутствии 0,2 мл комплемента, разведенного 1:20. В приведенной таблице 2 титр гемолизина равен 1:1500.

Рабочий титр гемолизина для РСК в 2 раза и для РДСК в 3 раза выше. Так, если титр гемолизина равен 1:1500, то рабочий титр в РСК будет 1:750, в РДСК - 1:500.

**6. БРУЦЕЛЛЕЗНЫЕ АНТИГЕНЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ**

**В СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ**

Антиген бруцеллезный единый для РА, РСК и РДСК, изготовленный на биофабрике, представляет собой гомогенную взвесь инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл в физиологическом растворе. Специфическая активность антигена стандартизована по референтной агглютинирующей сыворотке, что позволяет выражать результаты реакции, агглютинации в международных единицах антител на 1 мл сыворотки (например, сыворотка с конечным титром РА 1:100 с оценкой ++ и более содержит 100 МЕ, 1:200 - 200 МЕ и т.д.).

Перед употреблением антиген тщательно встряхивают.

Антиген бруцеллезный для роз бенгал пробы (РБП), изготовленный на биофабрике, представляет собой стандартизованную суспензию в буферном растворе инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым в розовый цвет.

Перед употреблением антиген выдерживают 30 - 40 минут при комнатной температуре и затем тщательно встряхивают.

Антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком представляет собой стандартизованную взвесь убитых бруцелл, окрашенных гематоксилином в синий цвет. Перед употреблением антиген тщательно встряхивают.

Антиген овисный для РДСК, изготовленный на биофабрике, представляет собой прозрачную, желтовато-зеленоватого цвета жидкость, полученную из клеток бруцелла овис путем экстрагирования.

Антигены хранят в сухом темном месте при температуре плюс 2 - 12 °С.

Антигены во флаконах без этикеток (без надписи) или с трещинами, содержащие постороннюю примесь, неразбивающиеся хлопья, плесень, с истекшим сроком годности или подвергавшиеся замораживанию, для применения не пригодны.

Утверждаю

Начальник Главного управления

ветеринарии Министерства

сельского хозяйства СССР

А.Д.ТРЕТЬЯКОВ

29 марта 1983 г. N 115-6а

НАСТАВЛЕНИЕ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ ВАКЦИНЫ ЖИВОЙ СУХОЙ ИЗ ШТАММА РЕВ-1

БРУЦЕЛЛА МЕЛИТЕНЗИС ПРОТИВ БРУЦЕЛЛЕЗА МЕЛКОГО

РОГАТОГО СКОТА

**1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

1.1. Вакцину из штамма Рев-1 применяют для профилактической иммунизации ярок (козочек) в комплексе мер, предусмотренных Инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных.

1.1.1. Перечень республик, краев и областей, в которых допускается применение указанной вакцины для иммунизации животных против бруцеллеза, устанавливает Главное управление ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР. В республиках, краях и областях разрешение на применение вакцины в районах и хозяйствах выдают соответственно ветеринарные отделы областных (краевых) управлений сельского хозяйства, министерств сельского хозяйства автономных республик, главные управления (управления) ветеринарии министерств сельского хозяйства союзных республик, не имеющих областного деления.

1.1.2. Вакцинировать животных против бруцеллеза разрешается ветеринарным врачам или ветеринарным фельдшерам со средним специальным образованием под контролем ветврача.

1.2. Вакцину живую сухую готовят из слабовирулентного штамма Рев-1 бруцелла мелитензис.

Вакцина представляет собой сухую мелкозернистую массу светло-коричневого или серовато-желтоватого цвета; ее выпускают в ампулах, запаянных под вакуумом и уложенных в коробки. При разведении вакцины физиологическим раствором образуется равномерная взвесь серовато-желтого цвета без хлопьев, комочков и осадка.

1.3. На каждой ампуле с вакциной должна быть надпись с указанием названия вакцины, номера серии, срока годности и количества препарата.

Ампулы с вакциной, не имеющие указанной надписи, а также разбитые, с трещинами, содержащие механические примеси или плесень, с истекшим сроком годности препарата, упакованные в коробки без этикеток, бракуют и обеззараживают кипячением в течение 30 минут.

1.4. На этикетках коробок с вакциной должно быть указано: наименование и товарный знак предприятия-изготовителя, наименование препарата, номер серии и номер госконтроля, дата изготовления, срок годности, количество ампул и количество доз в ампуле и в коробке, условия хранения вакцины и обозначение ТУ.

В каждой коробке должно быть наставление по применению вакцины.

1.5. Вакцина пригодна для применения в течение 12 месяцев со дня ее изготовления при условии хранения в темном сухом помещении при температуре плюс 2 - 12 градусов. При хранении вакцины при температуре выше указанной активность ее не гарантируется. В жаркое время года вакцину доставляют к месту применения в термочемоданах или термосах со льдом.

1.6. Перед применением вакцину разводят физиологическим раствором из расчета, чтобы одна прививочная доза составляла 2 мл разведенной вакцины.

Для этого шейку ампулы с сухой вакциной в верхней части протирают смоченной спиртом ватой и обламывают. В ампулу шприцем с иглой вносят 4 мл физиологического раствора и затем ее осторожно встряхивают до превращения массы в равномерную взвесь.

1.7. Разведенную в ампулах вакцину шприцем с длинной иглой отсасывают и переносят во флакон емкостью 500 - 1000 мл с предварительно налитым в него физиологическим раствором. С учетом жидкости, перенесенной из ампул с вакциной, во флаконе должно быть столько физиологического раствора, сколько необходимо, чтобы приготовить расчетное количество доз вакцины в разведенном виде для прививки животным.

1.7.1. Физиологический раствор, флаконы, шприцы и иглы, используемые для приготовления сухой вакцины к применению (см. пункты 1.6 и 1.7), должны быть стерильными.

1.7.2. Приготовленную для применения вакцину защищают от прямого солнечного света и используют в течение не более 4 часов.

Вакцину, не использованную в указанное время, уничтожают путем кипячения в течение 30 минут. Кипячению подлежат также ампулы и флаконы из-под использованной вакцины, шприцы и иглы.

1.8. Вакцину животным вводят в объеме 2 мл под кожу в бесшерстное место за локтевым суставом.

Для каждого животного используют простерилизованную иглу. Поверхность кожи в месте введения вакцины предварительно дезинфицируют.

1.9. Иммунитет у животных после прививки живой сухой вакциной из штамма Рев-1 наступает через 3 недели.

1.9.1. Каждое привитое животное метят путем выщипа круглого отверстия в основании правого уха. Их берут на учет и за ними устанавливают наблюдение, имея в виду, что у вакцинированных животных может повыситься температура тела, иногда отмечается кратковременная хромота.

1.9.2. Не подлежат вакцинации:

животные низкой упитанности или больные какой-либо болезнью (их допрививают после выздоровления);

взрослые овцы (козы);

бараны (козлы) и валухи;

ярки (козочки) в благополучных племенных хозяйствах, отобранные к продаже.

1.9.3. В период вспышки в хозяйстве острой инфекционной болезни (сибирская язва, ящур и др.) прививки животных против бруцеллеза не разрешаются.

1.10. Проведенную вакцинацию ярок (козочек) по каждой отаре оформляют актом, в котором указывают наименование хозяйства, фермы, номер отары, от каких овец (благополучных или неблагополучных по бруцеллезу) получен молодняк, результаты исследования на бруцеллез перед вакцинацией, количество и возраст вакцинированных животных, наименование предприятия, изготовившего вакцину, номер серии, дату изготовления и срок годности препарата. Один экземпляр акта направляют главному ветврачу района, другой хранят в хозяйстве. К акту прилагают опись животных.

**2. ПРИМЕНЕНИЕ ВАКЦИНЫ ЖИВОЙ СУХОЙ ИЗ ШТАММА РЕВ-1**

2.1. Вакцину из штамма Рев-1 применяют для иммунизации ярок (козочек) как на благополучных, так и неблагополучных по бруцеллезу (фермах в хозяйствах, расположенных в районах со значительным распространением бруцеллеза мелкого рогатого скота, а также в хозяйствах при отгонном ведении овцеводства.

Допускается вакцинация ярок (козочек), принадлежащих гражданам, в населенных пунктах, неблагополучных по бруцеллезу мелкого рогатого скота.

2.2. Вакцинируют ярок и козочек однократно начиная с трех-четырехмесячного возраста, но не позднее чем за два месяца до первого осеменения.

2.2.1. В неблагополучных по бруцеллезу мелкого рогатого скота хозяйствах вакциной из штамма Рев-1 иммунизируют ярок (козочек) ежегодно до снятия ограничений по бруцеллезу с хозяйства и продолжают в течение трех лет после оздоровления поголовья.

2.2.2. Ярок (козочек), полученных от маток благополучных по бруцеллезу отар (стад), иммунизируют без предварительного исследования.

2.2.3. Перед вакцинацией ярок и козочек, полученных от маток неблагополучных по бруцеллезу отар (стад), исследуют на бруцеллез серологическими методами. Реагирующих животных удаляют из отары, остальных прививают вакциной. Из вакцинированного молодняка формируют отдельные отары.

2.3. Для исследования на бруцеллез животных, привитых вакциной из штамма Рев-1, применяют серологические методы (РБП - роз бенгал проба или РА и РСК (РДСК)). Плановое исследование проводят перед осеменением маток или через 1 - 2 месяца после окота, но не ранее чем через 12 месяцев после вакцинации.

2.4. За привитыми вакциной из штамма Рев-1 животными ведут ветеринарное наблюдение: исследуют на бруцеллез овец (коз), оставшихся без приплода, а также абортировавших и имеющих другие признаки, подозрительные на заболевание животных бруцеллезом. Абортированные плоды и другой материал от таких животных направляют в ветеринарную лабораторию для бактериологического и биологического исследований, одновременно от них направляют кровь для серологического исследования на бруцеллез.

2.5. В неблагополучном по бруцеллезу хозяйстве:

2.5.1. Если при лабораторных исследованиях материала от животных, привитых вакциной из штамма Рев-1, и при проверке на бруцеллез овец (коз) по окончании окота получены отрицательные результаты исследований по группе (отаре), все поголовье группы (отары) признают благополучным по бруцеллезу.

2.5.2. В случае если при исследовании вакцинированных овец (коз) выделяются животные с положительной реакцией, всех животных данной отары сдают на убой или удаляют из отары и сдают на убой реагирующих, а остальных исследуют 2 - 3 раза через каждые 30 дней, осеменяют и оставляют под наблюдением до окончания следующего окота.

2.5.3. В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах овец (коз) отар, где произошла острая вспышка бруцеллеза (аборты, массовое выделение реагирующих), сдают на убой, а животных других неблагополучных отар данного хозяйства реиммунизируют вакциной из штамма 19 за 2 месяца до осеменения, но не ранее чем через 2 года после иммунизации их вакциной из штамма Рев-1. Овец (коз) в дальнейшем прививают вакциной из штамма 19 ежегодно, перед прививкой и после нее на бруцеллез не исследуют, содержат обособленно и по мере хозяйственной выбраковки сдают на убой.

Ярок в данном хозяйстве иммунизируют вакциной из штамма Рев-1 против бруцеллеза.

2.6. Перед снятием ограничений с фермы (бригады, отделения хозяйства), населенного пункта исследуют на бруцеллез все поголовье овец и коз (в том числе иммунизированных вакциной из штамма Рев-1 против бруцеллеза, за исключением животных, привитых этой вакциной менее чем за 12 месяцев до снятия ограничений), находящихся на территории данного хозяйства, населенного пункта.

2.7. При иммунизации вакциной из штамма Рев-1 овец, принадлежащих населению, соблюдают требования и условия, указанные в настоящем Наставлении и предусмотренные Инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных.

2.8. В случае если после прививок у животных возникли какие-либо осложнения (абсцессы и т.п.), об этом необходимо немедленно сообщить Всесоюзному государственному научно-контрольному институту ветпрепаратов (123022, г. Москва, Д-22, Звенигородское шоссе, 5) и биопредприятию, изготовившему вакцину. Одновременно высылают в их адрес по 3 - 5 невскрытых ампул с вакциной из использованной серии.

**\* \* \***

С утверждением настоящего Наставления утрачивают силу:

"Временное наставление по применению сухой живой вакцины из штамма Рев-1 бруцелл вида мелитензис против бруцеллеза мелкого рогатого скота", утвержденное Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 20 июня 1974 года;

"Указания по борьбе с бруцеллезом мелкого рогатого скота с использованием в общем комплексе противобруцеллезных мероприятий вакцины из штамма Рев-1 бруцелл вида мелитензис", утвержденные Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 20 июня 1974 года.