****

**2.** КРнын ССМнин дары-дармек саясатын жана медициналык жардамды уюштуруу башкармалыктын башчысы С.Ш.Тойматовго, коомдук саламаттык сактоо бөлүмүнүн башкы адиси Б.А. Исмаиловага:

- бруцеллез оорусунун алдын алуу боюнча саламаттык сактоо уюмдарынын иш-аракеттерин координациялоону камсыздашсын.

**3.** Карантиндик жана өтө кооптуу жугуштуу оорулардын республикалык борборунун директоруна (С. Т. Абдикаримов):

- бруцеллез боюнча эпидемиологиялык курч кырдаал жаралганда ыкчамдуу кеңештик-усулдук жана практикалык жардам көрсөтүүнү камсыздасын.

**4.** КРнын ССМнин республикалык ден соолукту чыңдоо борборунун директору (Г.Т. Айтмурзаева): бруцеллездун алдын алууга, күрөшүүгө калкты социалдык мобилизациялоо, окутуу программасын жана калктын ар кандай категориясын маалыматтоо стратегиясын иштеп чыксын жана калк арасында бруцеллез оорусун алдын алуу боюнча иштери күчөтүлсүн.

 Мөөнөтү: дайыма

**5.** Облустардын саламаттык сактоо боюнча координаторлоруна жана райондук/шаардык ОККФЖ ОААжМСЭКБнун, Бишкек шаарынын МСЭКБнун башкы дарыгерлерине:

5.1. Бул буйрук бардык деңгээлдеги саламаттык сактоо уюмдарында жетекчиликке алынсын жана аткарылышы камсыздалсын;

5.2. Бруцеллез оорусуна эпидемиологиялык көзөмөлдөө жүргүзүүдө саламаттык сактоо уюмдарынын ишкердигин камсыздашсын.

5.3. Райондук/шаардык ОККФЖ ОААжМСЭКБнун, Бишкек шаардык МСЭКБ, карантиндик жана өтө кооптуу жугуштуу оорулардын эпидемиологиялык көзөмөлдөө боюнча бөлүмдөрү кайрадан ачылсын;

Мөөнөтү: 01.01.2019-ж. чейин

**6.** ОААжМСЭКБнун жетекчилерине:

6.1. Бруцеллезду диагностикалоо алдын алуу жана эпидемияга каршы иш-чараларды уюштуруу боюнча медициналык адистерди даярдоону, кийинки аттестациядан өткөрүүнү камсыздашсын; Мөөнөтү: жыл сайын

6.2. Эпидемияга каршы жана эпизоотияга каршы комплекстүү чараларды уюштуруу менен ыкчам эпидемиологиялык иликтөөнү, бруцеллез менен ооругандардын ар бир учурун учетко алууну камсыздашсын.

Мөөнөтү: дайыма

6.3. Ветеринардык кызмат менен биргеликте тейлөөчү аймакты коопсуздандыруу боюнча иш-чаралардын пландарын иштеп чыгууну, өз убагында маалымат алмашууну жана бруцеллез оорусунун таркап кетүүсүнө бөгөт коюу боюнча эпидемияга жана эпизоотияга каршы чараларды камсыздашсын.

Мөөнөтү: дайыма

**7.** КРнын ССМнин 24.02.2010-жылдагы №103 “Кыргыз Республикасында бруцеллезго эпидемиологиялык көзөмөлдөө жөнүндөгү” буйругу күчүн жоготту деп табылсын.

**8.** Бул токтомдун аткарылышын көзөмөлдөө министрдин орун басары Э.М. Чечейбаевге жүктөлсүн.

**Приказ МЗ КР №586 от 10.08.2018г.**

 **«О совершенствовании мероприятий по профилактике заболевания людей бруцеллезом в Кыргызской Республике».**

Бруцеллез (по определению Всемирной организации здравоохранения) – зоонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella,* характеризуется длительной лихорадкой, потливостью, поражением опорно-двигательного аппарата, а также поражением нервной, сердечно-сосудистой и мочеполовой систем.

Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в республике продолжает оставаться неблагоприятной. За последние 5 лет в республике переболело 6631 человек, из них 80% составляют лица трудоспособного возраста. Все чаще встречаются случаи бруцеллеза семейного характера и среди детей до 14 лет.

Обострения инфекционного процесса и наклонность к хронизации нередко приводят к стойкой утрате трудоспособности и инвалидности, что определяет значительный экономический ущерб.

Основным источником заболевания людей являются больные бруцеллезом крупный и мелкий рогатый скот. Заражение также происходит при употреблении молока и молочных продуктов, приготовленных из сырого молока.

В целях совершенствования и оптимизации эпидемиологического надзора за бруцеллезом в республике, и координации деятельности по профилактике бруцеллеза

**ПРИКАЗЫВАЮ:**

**1.** Утвердить прилагаемые:

1.1. Методическое указание по эпидемиологическому надзору за бруцеллезом (Приложение 1);

1.2. Методическое указание по лабораторной диагностике бруцеллеза (Приложение 2).

**2.** Начальнику управления организации медицинской помощи и лекарственной политики МЗ КР (С.Ш. Тойматов), заведующей отделом общественного здравоохранения МЗ КР (Б.А. Исмаилова) обеспечить координацию деятельности организаций здравоохранения по профилактике заболеваемости бруцеллезом.

**3.** Директору Республиканского центра карантинных и особо опасных инфекций (Абдикаримов С.Т.) обеспечить оказание оперативной консультативно-методической и практической помощи при возникновении эпидемиологических осложнений по бруцеллезу.

**4.** Директору Республиканского центра укрепления здоровья МЗ КР (Айтмурзаева Г.Т.) разработать стратегии социальной мобилизации населения на борьбу и профилактику бруцеллеза, программы обучения и информирования различных категорий населения**, у**силить работу по профилактике бруцеллеза среди населения.

 Срок: постоянно.

**5.** Координаторам по здравоохранению областей и главным врачам районных, городских ЦПЗиГСЭН с ФКДСО, ЦПЗиГСЭН г. Бишкек:

5.1. Принять к руководству и обеспечить выполнение данного приказа в подведомственных организациях;

5.2. Обеспечить координацию деятельности организаций здравоохранения в проведении эпидемиологического надзора за заболеваемостью бруцеллезом;

5.3. Возобновить в районных, городских ЦПЗиГСЭН с ФКДСО, ЦГСЭН г.Бишкек отделы по эпиднадзору за карантинными и особо опасными инфекциями.

Срок: до 01.01.2019г.

**6.** Главным врачам ЦПЗиГСЭН:

6.1. Обеспечить подготовку медицинских работников по диагностике и организации проведения профилактических, противоэпидемических мероприятий с последующей аттестацией;

 Срок: ежегодно

6.2. Обеспечить оперативное эпидемиологическое расследование, учет каждого случая заболевания бруцеллезом, с организацией комплекса противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий;

 Срок: постоянно



 Приложение 1

к приказу МЗ КР №586

от 10 августа 2018г.

**Методическое указание по эпидемиологическому надзору за бруцеллезом**

**1. Область применения**

1.1. Настоящие методические указания определяют организацию и порядок проведения эпидемиологического надзора, а также порядок упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторных исследований клинического материала в целях выявления этиологического агента и проведения его типирования.

1.2. Настоящие методические указания предназначены для специалистов органов и организаций, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также для специалистов медицинских организаций, осуществляющих лабораторную диагностику бруцеллеза, независимо от их организационно-правовой формы или формы собственности.

**2. Общие положения**

2.1. Бруцеллез – зоонозное, инфекционно-аллергическое заболевание с высокой потенциальной возможностью перехода в хроническую форму. Возбудитель бруцеллеза относится ко II группе патогенности. Человек высоко восприимчив к возбудителю бруцеллеза. Заболевание характеризуется длительным течением с поражением преимущественно опорно-двигательного аппарата, как правило, сопровождается хронизацией инфекционного процесса с последующей инвалидизацией больного. Наиболее широко бруцеллез распространен в странах Средиземноморья, Малой Азии, Юга и Юго-Восточной Азии, Африки, Центральной и Южной Америки.

 2.2. В Международную классификацию болезней Десятого пересмотра «бруцеллез» входит в блок «бактериальные зоонозы» под кодом А23.

 2.3. Возбудитель бруцеллеза относится к семейству Brucellacaea, роду Brucella, который включает в себя 10 самостоятельных видов, различающихся по биохимическим, метаболическим, антигенным и вирулентным характеристикам: В. melitensis (3 биовара), В. abortus (7 биоваров), В. suis (5 биоваров), В. neotomae, В. ovis, В. canis, B. ceti, B. pinnipedialis, B. microti, B. inopinata.

2.4. Геном представлен двумя кольцевыми молекулами ДНК размером 2 100 т.п.н. и 1 500 т.п.н. В. suis биоваров 2 и 4 имеет две хромосомы размером 1 850 т.п.н. и 1 350 т.п.н., а В. suis биовара 3 – одну хромосому размером 3 100 т.п.н. Молекулярная масса ДНК возбудителя бруцеллеза составляет 2,37 × 103 МДа. Плазмиды у бруцелл не обнаружены.

2.5. К патогенным для человека бруцеллам, способным вызывать заболевание, относятся возбудители бруцеллеза: В. melitensis, В. abortus и В. suis, циркулирующие в очагах бруцеллеза крупного и мелкого скота, а также свиней. В. abortus и В. suis вызывают спорадическую заболеваемость, В. melitensis способен вызывать групповые заболевания.

2.6. Бруцеллы относительно стабильны в окружающей среде и способны длительное время сохраняться в различных субстратах. Во влажной среде при температуре 55°С возбудитель бруцеллеза погибает через 60 мин, при 60°С – через 30 мин, при 70°С – через 10 мин, при кипячении – моментально. Сухой жар (90—95°С) убивает бруцеллы в течение часа. При низких температурах бруцеллы сохраняют жизнеспособность при температуре минус 5-8°С в течение 35 дней, а при минус 20° С – в течение 20 дней. Под действием солнечного света бруцеллы погибают в сроки от нескольких минут до 7—8 дней в зависимости от интенсивности инсоляции и атмосферных условий. В сыром молоке, хранящемся в холодильнике, возбудитель бруцеллеза сохраняется до 10 дней; сливочном масле – более 4 недель; домашнем сыре – 3 недели; брынзе – 45 дней; простокваше, сметане – 8—15 дней; кумысе, шубате (сброженное верблюжье молоко) – до 3 суток; мясе– до 12 дней; во внутренних органах, костях, мышцах и лимфатических узлах инфицированных туш – в течение 1 месяца и более; в овечьей шерсти, смушках – от 1,5 до 4 месяцев. В замороженных инфицированных мясных и молочных продуктах бруцеллы остаются жизнеспособными в течение всего срока хранения.

2.7. Возбудитель бруцеллеза чувствителен к различным дезинфицирующим веществам: 2%-й раствор фенола, 3%-й раствор креолина, 0,2—1%-й раствор хлорной извести и хлорамина убивают их в течение нескольких минут.

**3. Эпидемиологические особенности бруцеллеза**

3.1. Основными источниками возбудителя инфекции для людей являются больные бруцеллезом овцы, козы, крупный рогатый скот и свиньи. Отмечаются случаи заражения людей от северных оленей, верблюдов, яков, собак, кошек и других животных.

 3.2. Эпидемиологическое значение имеют неблагополучные по бруцеллезу овцеводческие хозяйства с циркуляцией наиболее вирулентного возбудителя вида B. melitensis, в которых чаще возникают вспышечные случаи заболевания людей, а также хозяйства крупного рогатого скота и свиноводческие фермы, в которых регистрируется, как правило, спорадическая заболеваемость.

3.3. Роль человека в передаче бруцеллезной инфекции эпидемиоло- гического значения не имеет.

3.4. Инкубационный период – от 5 до 15 дней, чаще 7—10 дней.

3.5. Основными путями передачи возбудителя бруцеллеза являются контактный и алиментарный, реже аэрогенный.

Особенно высока возможность инфицирования при контактном пути заражения во время оказания помощи животным при родах и абортах, когда проводят ручное отделение плаценты. Заражение может произойти при переработке мясного сырья, кожи, шерсти, шкур больных бруцеллезом животных. В таких случаях инфицирование людей происходит через кожные покровы. Проникновение бруцелл может произойти через слизистые глаз, носа, ротовой полости при несоблюдении мер личной безопасности.

Алиментарный путь передачи бруцелл реализуется при употреблении пищевых продуктов, полученных от больных животных. Наибольшую опасность представляют сырое молоко и молочные продукты (брынза, сливки, сметана, кумыс и др.), которые являются причиной инфицирования людей, профессионально не связанных с животноводством (особенно жителей городов).

Аэрогенный путь заражения человека бруцеллезом возможен при стрижке шерсти, сборе пуха, уборке скотных дворов, обработке шкур, убое скота и других производственных процессах, связанных с уходом за больными животными, или при обработке продуктов и сырья, полученных от них, а также в бактериологических лабораториях во время манипуляций при работе с чистыми культурами (пересевы, центрифугирование и др.), когда образуются бактериальные аэрозоли.

 3.6. Для бруцеллеза характерны подъемы заболеваемости, связанные с проведением окотной кампании и уходом за животными в послеродовой период. Спорадические случаи инфекции выявляются в течение всего года.

3.7. После перенесенного заболевания в сыворотке крови сохраняются антитела к антигенам возбудителя. Приобретенный после перенесенного заболевания иммунитет не предотвращает новые случаи заболевания, но способствует более легкому клиническому течению.

3.8. Бруцеллез поражает население всех возрастных групп, однако преимущественно болеют лица трудоспособного возраста. Заболеваемость бруцеллезом в большинстве случаев носит профессиональный характер и регистрируется среди лиц, имеющих контакт с больными животными или сырьем животного происхождения. К группам профессионального риска относятся работники животноводческих (звероводческих) хозяйств (ферм), мясомолочных комбинатов и других предприятий по переработке продуктов и сырья животного происхождения, убойных пунктов, пунктов стрижки, купки овец, ветеринарные работники, персонал бактериологических лабораторий, работающих с вирулентными культурами бруцелл.

 **4. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом**

4.1. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом – это непрерывное наблюдение за динамикой эпидемических проявлений инфекции и эпизоотической ситуации, а также за факторами и условиями, способствующими циркуляции возбудителя с целью своевременной разработки комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий и принятия управленческих решений.

 4.2. При осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора осуществляется:

– слежение за заболеваемостью людей бруцеллезом, ее территориальным распространением и заболеваемостью отдельных групп населения (сельского, городского, по возрастным и профессиональным группам);

– активное выявление медицинскими организациями больных бруцеллезом из числа больных, с диагнозами, не исключающими заболевание бруцеллезом или сопоставимыми с этой инфекцией, лабораторное обследование на бруцеллез, в т. ч. на гемокультуру (по показаниям), длительно лихорадящих больных (более 5 дней);

– анализ эпизоотологической ситуации по бруцеллезу по материалам, представляемым государственной ветеринарной службой, включая анализ комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на ограничение рассеивания инфекции и предупреждение заражения здоровых животных;

– слежение за численностью контингентов, подвергающихся риску заражения на эндемичных по бруцеллезу территориях, а также за контингентами, профессионально связанными с риском заражения бруцеллезом;

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

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

– разработка прогнозов эпидемиологической ситуации.

4.3. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом проводится органами и организациями, осуществляющими государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

4.4. Эпидемиологический надзор за бруцеллезом основан на результатах эпидемиологической, клинической и лабораторной диагностики.

4.4.1. Эпидемиологическая диагностика бруцеллеза.

4.4.1.1. Эпидемиологический анализ подразделяется на ретроспективный и оперативный.

4.4.1.2. Ретроспективный эпидемиологический анализ проводится специалистами территориальных органов Госсанэпиднадзора и включает изучение многолетней и помесячной динамики заболеваемости населения, анализ эпизоотологической ситуации на конкретной территории с определением факторов риска заболевания и причинно-следственных связей. Ретроспективный анализ ситуации предусматривает следующее:

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

– анализ годового и помесячного уровней заболеваемости бруцеллезом;

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

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

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

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

 – изучение особенностей возбудителя (виды, биовары, генотипы);

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

4.4.1.3. Оперативный эпидемиологический анализ проводится за определенный промежуток времени на конкретной территории с целью оценки эпидемиологической обстановки, постановки эпидемиологического диагноза, разработки адекватных противоэпидемических (профилактических) мероприятий и составления прогноза развития эпидемиологической ситуации. Оперативный анализ заболеваемости бруцеллезом основывается на данных регистрации первичных диагнозов и позволяет своевременно установить изменения эпидемической ситуации и их причины. Основной задачей ретроспективного и оперативного анализов является своевременное выявление предпосылок и причин осложнения эпидемической ситуации.

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

–возникновение новых неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота на административной территории;

– увеличение заболеваемости бруцеллезом на соседних территориях;

–увеличение количества сельскохозяйственных животных эпидемиологических значимых видов, заболевших бруцеллезом;

– завоз сельскохозяйственных животных эпидемиологически значимых видов из неблагополучных по бруцеллезу хозяйств, других территорий. 4.4.1.5. Предвестниками активизации эпидемического процесса являются:

– регистрация случаев заболевания людей бруцеллезом, число которых превышает среднемноголетний уровень для конкретной административной территории;

–регистрация эпидемических очагов бруцеллеза с групповой заболеваемостью на территории с неблагополучными по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота пунктами;

 –установление миграции возбудителя бруцеллеза мелкого рогатого скота (B. melitensis) на крупный рогатый скот.

4.4.1.6. При регистрации впервые выявленных заболеваний бруцеллезом проводится эпидемиологическое расследование, осуществляемое в соответствии с действующими нормативными правовыми и методическими документами по профилактике бруцеллеза.

**5. Клиническая диагностика бруцеллезной инфекции**

5.1. Инкубационный период заболевания составляет 1-2 недели, а иногда затягивается до двух месяцев, что определяется дозой возбудителя, попавшего в организм, его вирулентностью и сопротивляемостью организма.

5.2. Заболевание протекает с вовлечением в процесс многих органов и систем организма, широким спектром иногда слабо выраженных симптомов. Начинается, как правило, с повышения температуры тела до 39-40°С (характерны подъемы температуры в вечерние и ночные часы) в течение 7-10 дней и более, в отдельных случаях при отсутствии соответствующей терапии температура держится до 2-3-х месяцев. Лихорадка сопровождается ознобами, повышенной потливостью и общими симптомами интоксикации. В последующем присоединяются симптомы поражения опорно-двигательного аппарата, сердечнососудистой, нервной и других систем организма (артрит, спондилит, ишиорадикулит, менингоэнцефалит, миокардит и другие клинические проявления). Для бруцеллеза характерно относительно удовлетворительное самочувствие больного на фоне высокой температуры.

5.3. Клинически выделяют острый (до 3-х месяцев), подострый (до 6 месяцев), вторично-хронический (свыше 6 мес. от начала острого), первично-хронический (начало заболевания установить не удается), резидуальный бруцеллез (свыше 2 лет). По выраженности интоксикации и степени очаговых воспалительных изменений при остром и подостром бруцеллезе определяют легкое, среднетяжелое и тяжелое течение, по выраженности активности инфекционного процесса и состояния трудоспособности в хронической стадии - компенсация, субкомпенсация, декомпенсация.

 5.4. Диагноз «бруцеллез» устанавливают на основании клинических, эпидемиологических данных и лабораторного подтверждения (обнаружение маркеров возбудителя бруцеллеза с использованием методов и диагностических препаратов, разрешенных к применению на территории Кыргызской Республики в установленном порядке).

5.5. При эпидемиологическом расследовании групповых случаев бруцеллеза (при регистрации 5 и более взаимосвязанных случаев заболеваний) обязательно проводят лабораторное обследование. Больным из очагов групповых заболеваний, в которых имеются лабораторно подтвержденные случаи, диагноз «бруцеллез» может быть установлен на основании клинико-эпидемиологических данных.

5.6. Окончательный диагноз должен включать: клиническую форму заболевания, тяжесть течения, осложнение и результаты лабораторных исследований.

5.7. Госпитализация больных проводится по клиническим показаниям.

5.8. После выписки из стационара больные подлежат диспансерному наблюдению у врача-инфекциониста 2 раза в год до угасания активности инфекционного процесса не менее 2-х лет.

 ***При остром и подостром бруцеллезе:***

– наблюдение в течение 2-х лет

–при выявлении клинической активности процесса необходимо провести лабораторное исследование крови на бруцеллез для решения вопроса о проведении лечения.

 ***При хроническом бруцеллезе:***

– наблюдение в течение 2-х лет от момента окончания последнего обострения;

–при осмотре определяют характер локальных поражений для выявления степени нарушения трудоспособности;

 – лабораторное исследование проводится при выявлении клинической активности процесса.

Если в течение 2 лет наблюдения признаки активности бруцеллеза отсутствуют, а больные предъявляют жалобы, которые обусловлены необратимыми изменениями нервной системы, опорно-двигательного аппарата и т.д. (например, неврит слухового нерва или деформирующий полиартрит, спондилез), ставится диагноз: Резидуальный бруцеллез. Деформирующий полиартрит. Такие лица снимаются с учета по поводу бруцеллеза и при необходимости получают лечение у соответствующего специалиста.

**6. Учет и регистрация больных бруцеллезом в организациях здравоохранения**

Учет и регистрация больных бруцеллезом в организациях здравоохранения ведется согласно постановления Правительства КР от 23 сентября 2011 года №583 «Об утверждении Руководства по учету инфекционных заболеваний в Кыргызской Республики».

6.1. Каждый случай заболевания бруцеллезом людей подлежит регистрации и учету в лечебно-профилактических организациях, независимо от форм собственности и ведомственной принадлежности, а также лицами, занимающимися частной медицинской практикой, в установленном порядке.

6.2. О каждом случае заболевания бруцеллезом, подозрения на это заболевание врачи всех специальностей, средние медицинские работники лечебно-профилактических, детских, подростковых и оздоровительных организаций, независимо от организационно-правовой формы, а также медицинские работники, занимающиеся частной медицинской деятельностью, в течение 12 часов посылают экстренное извещение по установленной форме в органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор (независимо от места проживания больного).

6.3. Лечебно-профилактическая организация, изменившая или уточнившая диагноз, в течение 12 часов подает новое экстренное извещение в органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор по месту выявления заболевания, указав первоначальный диагноз, измененный (уточненный) диагноз, дату установления уточненного диагноза и результаты лабораторного исследования.

6.4. При получении экстренных извещений об измененном (уточненном) диагнозе органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор ставят в известность об этом лечебно-профилактические организации по месту выявления больного, приславшие первоначальное экстренное извещение.

6.5. Случаи впервые выявленных заболеваний бруцеллезом учитываются в формах государственного статистического наблюдения №1 «Об инфекционных, паразитарных и неинфекционных заболеваниях» в установленном порядке.

6.6. Полноту, достоверность и своевременность учета заболеваний бруцеллезом, а также оперативное и полное сообщение о них в органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор обеспечивают руководители лечебно-профилактических организаций.

6.7. В случае подозрения на профессиональное заболевание бруцеллезом медицинский работник лечебно-профилактической организации, в которой впервые заподозрен профессиональный характер данного заболевания, заполняет экстренное извещение по установленной форме («Извещение об установлении предварительного диагноза острого или хронического профессионального заболевания») и не позднее 12 часов с момента обращения больного направляет это извещение в органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

6.8. Каждый случай профессионального заболевания бруцеллезом подлежит специальному расследованию врачом-эпидемиологом в течение 24 часов с момента получения экстренного извещения. По результатам специального расследования в 4-х экземплярах составляется акт расследования профессионального заболевания (отравления) установленной формы, в котором, помимо анкетных данных заболевшего, указываются обстоятельства, причины и санитарно-эпидемиологические нарушения, повлекшие профессиональное заболевание бруцеллезом.

6.9. Информацию о групповых случаях регистрации заболевания бруцеллезом, связанных с общим источником заражения, органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор направляют в установленном порядке в вышестоящую организацию, органы исполнительной и муниципальной власти, органы ветеринарного надзора.

**7. Мониторинг за циркуляцией возбудителя**

7.1. Микробиологический мониторинг за циркуляцией возбудителя осуществляют с целью изучения этиологической структуры бруцеллеза у людей, динамического слежения за распространением и циркуляцией возбудителя.

7.2. Микробиологический мониторинг возбудителя бруцеллеза проводят органы и организации, уполномоченные осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор по материалам, представленным, в том числе, лабораториями медицинских организаций и другими лабораториями, аккредитованными для проведения соответствующих исследований в установленном порядке.

7.3. Выделенные культуры бруцелл с атипичными свойствами из групповых очагов бруцеллеза направляются в установленном порядке для дальнейшего изучения в баклабораторию РЦКиООИ.

7.4. Результаты микробиологического исследования учитываются в ходе эпидемиологического анализа в рамках проведения эпидемиологического надзора за бруцеллезом.

**8. Эпидемиологическое районирование административной территории Кыргызской Республики.**

8.1. Районирование территории по ПЭО (показатель противоэпидемической особенности) заболевания людей бруцеллезом используется для осуществления дифференцированного подхода при проведении эпидемиологического надзора и профилактики данной инфекции в Кыргызской Республике.

8.2. Эпидемиологическое районирование по ПЭО базируется на официальных статистических данных о заболеваемости людей и животных в районах Кыргызской Республике за определенный период времени.

8.3. При проведении эпидемиологического районирования территории Кыргызской Республике по ПЭО учитываются показатели заболеваемости населения и частота эпидемических проявлений бруцеллеза в разрезе районов Кыргызской Республики, что позволяет объединить их в группы по степени эпидемической опасности и составить шкалу картограмм для эпидемиологического районирования.

8.4. Результаты эпидемиологического районирования территории Кыргызской Республики по уровню ПЭО представляются в виде картограммы, которая выполняется одним из способов:

– в автоматическом режиме с применением современных географических информационных систем (ГИС): ArcGis, MapInfo;

– в ручном режиме–данные могут наноситься на карту с административно-территориальным делением Кыргызской Республики (бумажный носитель) окраской определенной степени насыщенности (фоновая картограмма).

8.5. Данные по районированию административных территорий Кыргызской Республики по ПЭО, полученные в результате анализа многолетней заболеваемости, используются для оценки эпидемиологической обстановки по бруцеллезу при проведении эпидемиологического анализа и планировании комплекса противобруцеллезных мероприятий.

**9. Эпидемиологический прогноз**

Результаты оперативного, ретроспективного анализов заболеваемости бруцеллезом, районирования административной территории по ПЭО позволяют обосновать прогноз развития эпидемической ситуации как на краткосрочную перспективу (до 1 месяца), так и на среднесрочную (до 1 года). Точность эпидемиологического прогноза при бруцеллезе зависит от правильности постановки эпидемиологического диагноза и оценки факторов, обусловливающих возможность активной реализации механизма передачи возбудителя, адекватности мероприятий, проводимых в отношении источников инфекции, прерывания путей распространения инфекции и защиты угрожаемого контингента населения.

**10. Алгоритм действий при эпидемиологическом неблагополучии по бруцеллезу**

10.1. Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций МЗ КР:

- Осуществляет сбор, анализ и подготовку информационного материала для предоставления информацию в МЗ КР;

- Оказывает оперативную консультативно-методическую и практическую помощь территориальным ЦПЗиГСЭН, ОЗ при возникновении эпидемиологических осложнений по бруцеллезу;

- Определяет стратегии борьбы с бруцеллезом и вносит корректировки в комплексные планы.

- Обеспечивает межсекторальное, межведомственное и международное взаимодействие и сотрудничество по вопросам борьбы и профилактики бруцеллеза

- Проводит быструю оценку эпидемиологической ситуации и разрабатывает первичные противоэпидемические мероприятия.

- Принимает участие в работе межведомственных групп быстрого реагирования.

- Проводит мониторинг заболеваемости бруцеллезом, и контроль над своевременным выполнением профилактических и противоэпидемических мероприятий;

- Проводит лабораторные исследования по выделению и идентификации бактерии бруцелл;

- Ведет отчетность по заболеваемости бруцеллезом по республике и в разрезе районов;

- Проводит обучающие семинары для медицинских работников по профилактике бруцеллеза.

- Проводит научно-практические исследования в области изучения особенностей возбудителя, механизма передачи, источников инфекции, клинико-эпидемических последствий бруцеллеза, его влияния на показатели здоровья и качества жизни населения и т.д.

- Осуществляет эпидемиологический контроль за полнотой обследования на бруцеллез, в соответствии с клинико-эпидемиологическими показаниями.

- Разрабатывает нормативные документы (СЭП, МУ, МР) по заболеваемости бруцеллезом.

- Готовит материалы для принятия управленческих решений по вопросам эпиднадзора за бруцеллезом.

10.2. Территориальные Центры профилактики заболеваний и государственного санитарно - эпидемиологического надзора:

- Разрабатывают комплексные и оперативные планы противоэпидемических мероприятий по санитарной охране территорий от завоза/заноса, и распространения особо опасных инфекций;

- Проводят мониторинг заболеваемости бруцеллезом и контроль за выполнением профилактических и противоэпидемических мероприятий на обслуживаемой территории;

- Проводят эпидемиологическое расследование всех случаев заболевания бруцеллезом с обязательным актом эпидемиологического расследования;

- Обеспечивают взаимоинформации о заболеваемости людей и животных с ветеринарной службой;

- Проводят совместные эпидемиолого-эпизотоологические расследования в целях установления причинно-следственных связей возникновения и распространения бруцеллеза, влияния на показатели здоровья и качества жизни населения.

- Проводят семинарские занятия с последующей аттестацией среди медработников организаций здравоохранения по этиологии, эпидемиологии, клинике и профилактике бруцеллеза среди населения.

- Обеспечивают взаимоинформацию организаций здравоохранения и ветеринарной службы о состоянии заболеваемости людей и животных бруцеллезом, вакцинации сельскохозяйственных животных, бактериологических исследований абортированных плодов и лабораторной экспертизе молока.

- Осуществляют подготовку материала на заседание местного самоуправления, координационного совета, ЧППК по профилактике бруцеллеза и проведения противоэпидемических мероприятий;

- Принимают участие в разработке стратегии и программ по социальной мобилизации населения на борьбу и профилактику зоонозных инфекций;

- Составляют сводный отчет по району (области) о заболеваемости людей и животных от ОЗ, и представляет в вышестоящие учреждения санэпидслужбы к 5 числу каждого месяца.

10.3. Организации здравоохранения ПМСП:

- Обеспечивают своевременное выявление больных бруцеллезом по клинико-эпидемиологическим и лабораторным показаниям;

- Обеспечивают учет и диспансерное наблюдение за всеми лицами, переболевшими бруцеллезом в течении 2 лет;

- Проводят в обязательном порядке обследование доноров на бруцеллез;

- Информируют и составляют отчет о заболеваемости людей бруцеллезом в районные (городские) ЦПЗиГСЭН к 3 числу каждого месяца;

- Проводят госпитализацию и лечение бруцеллезных больных согласно клинического протокола;

- Обеспечивают проведение семинарских занятий с медицинскими работниками по диагностике и лечению бруцеллеза;

- Проводят санитарно – просветительную работу среди населения по профилактике бруцеллеза;

**11. Эпиднадзор за хроническим бруцеллезом**

Особенностью течения бруцеллеза у людей в республике является переход острых форм болезни в хронические. Это связано с тем, что в республике возбудителем бруцеллеза у людей является Brucella melitensis, которая является самой опасной из всех видов возбудителей бруцеллеза ведущая к хронизации заболевания и затем инвалидизации.

 Основными причинами хронизации острого бруцеллеза являются:

-неудовлетворительная информированность населения о мерах профилактики;

- отсутствие эпиднастороженности у медработников;

- позднее выявление больных;

- низкий уровень обращаемости населения за медицинской помощью;

- неадекватное лечение;

-некачественная диспансеризация.

Последствия и осложнения:

- инвалидность

- артриты, анкилозы и атрофия мышц

- невралгии, полиневриты, радикулит, остеохондроз

- аменорея, дисменорея, бесплодие и другие поражения половой сферы у женщин

- орхиты, снижение половой функции и другие поражения половой сферы у мужчин

- поражение органов слуха и зрения

- гломерулонефрит и другие поражение функции почек.

Определение фактической инфицированности населения, выявление причин хронизации и масштабов их последствий являются решающим основанием для:

- внесение корректировки в тактику диагностики, лечения и диспансеризации;

- разработки и внедрения в практику целенаправленных, опережающих мероприятий по профилактике острого и хронического бруцеллеза;

- проведения приоритетных и адресных мобилизационных работ среди населения по усилению их социальной активности в борьбе с бруцеллезом.

Фактическая инфицированность населения выявляется проведением подворных обходов и сбором необходимых сведений, формированием у населения стойкой осознанности своевременного обращения и лечения при любых формах бруцеллеза.

**12. Профилактические мероприятия**

Профилактические мероприятия в случае их своевременного и полного выполнения, способны надежно защитить людей от инфицирования.

Мероприятия включают в себя проведение общесанитарных мер и выполнение правил индивидуальной защиты, которые предусматривают:

-наличие и обязательное использование в хозяйстве предметов личной гигиены (халат, резиновые перчатки, нарукавники, клеенчатые фартуки, сапоги), моющих и дезинфицирующих средств;

-содержание фермерских и частных хозяйств в надлежащем санитарно-гигиеническом состоянии;

-соблюдение правил убоя животных и проведение дезинфекционных мероприятий в неблагополучных хозяйствах;

-строгое соблюдение ветеринарных правил обработки и использования продуктов убоя и молока от больных животных;

-соблюдение ветеринарных правил ухода за животными в хозяйствах;

-недопущение к обслуживанию животных детей и подростков до 18 лет, беременных и кормящих женщин;

-реализация молока и молочных продуктов после проведения ветеринарно-санитарной экспертизы.

**13. Межведомственная интеграция по эпизоотологическому и эпидемиологическому благополучию населения**

Межведомственная интеграцияпроводится согласно:

- постановления Правительства Кыргызской Республики №297 от 10.06.2011 года «Об усилении взаимодействия между министерствами и ведомствами по борьбе с карантинными и особо опасными инфекциями, а также паразитарными заболеваниями»;

- межведомственных меморандумов;

- комплексных планов.

**14. Социальная мобилизация населения**

###  Социальная мобилизация - повышение информированности и формирование настороженности населения в профилактике бруцеллеза. Повысить потенциал медицинских работников, ветеринаров, педагогов с вовлечением сельских комитетов здоровья (село), общественных комитетов здоровья (район, город), и др. с использованием современных технологических коммуникаций, мобильных связей, средств массовой информации.

 В проведении санитарно-образовательной работы необходимо руководствоваться «Служебной инструкцией по социальной мобилизации населения на профилактику бруцеллеза и использование информации в процессе коммуникации». 2004г. утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача №35 от 14.09.2004г.

 Приложение 2

к приказу МЗ КР №586

от 10 августа 2018г.

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА**

Лабораторная диагностика бруцеллеза проводится согласно методического руководства по лабораторной диагностике бруцеллеза. Лаборатории, выполняющие исследования на бруцеллез должны иметь разрешения Режимной комиссии Министерства здравоохранения Кыргызской республики на право работы с микроорганизмами 3 группы патогенности.

Лабораторная диагностика бруцеллеза предусматривает индикацию бруцелл в объектах окружающей среды и в патологическом материале; выделение, идентификацию и типирование возбудителя; определение специфических антител и антигенов в сыворотке крови больных и лиц, с подозрением на заражение бруцеллезом.

Материалом для исследования от людей является кровь, костный мозг, спинно-мозговая жидкость, моча, желчь, суставная жидкость (при артритах), гной (при абсцессах). От животных исследуют абортированные плоды, плодные оболочки или желудок плода с его содержимым, лимфатические узлы, влагалищные выделения, молоко. Для исследования могут быть использованы пищевые продукты (сливки, сыры, творог, мясо), а также объекты окружающей среды (вода, почва, навоз). Анализ проводят с помощью бактериологического, биологического, серологического, аллергического и молекулярно-генетического методов.

Для лабораторной диагностики бруцеллеза у людей применяется три группы методов:

**первая** - методы (тесты), позволяющие выделить и идентифицировать возбудителя заболевания и его растворимые антигены; **вторая** - методы выявления специфических антител; **третья** - методы (тесты), выявляющие сенсибилизацию организма к бруцеллезным антигенам.

**Общие сведения о возбудителе**

Бруцеллы - микроорганизмы шаровидной, овоидной или палочковидной формы. Размеры бруцелл в среднем равны 0,3-0,6 мкм для кокковых форм и 0,6-2,5 мкм для палочковидных. Спор не образуют, жгутиков не имеют, неподвижны. Красятся анилиновыми красками. При определенных условиях (воздействие специфическим бактериофагом, выращивание на средах с добавлением 10% иммунной сыворотки и т.п.) образуют капсулу; грамотрицательны; характеризуются замедленным ростом на питательных средах; некоторые штаммы требуют для роста добавления 5-10% СО₂, особенно при первоначальном выделении. Оптимальная температура для роста бруцелл 37°С, оптимальная pH - 6,8-7,2. Бруцеллы подвержены изменчивости и могут переходить из S-формы в R- и L-формы.

Бруцеллы всех девяти видов практически неотличимы друг от друга по морфологическим признакам.

Разные виды бруцелл и даже разные штаммы одного и того же вида отличаются неодинаковой вирулентностью. Наиболее патогенны для человека бруцеллы вида melitensis, которые нередко вызывают эпидемические вспышки заболевания.

В.abortus и B.suis вызывают, как правило, спорадические, клинически выраженные случаи заболевания. Что касается B.ovis, B.neotomae и B.canis, то известны случаи заболевания людей, заразившихся от собак бруцеллами вида canis, однако эпидемиологическая значимость этих видов бруцелл до конца не изучена.

Бруцеллы обладает высокой инвазивностью, могут проникать через неповрежденные слизистые и через микротравмы кожных покровов, относятся к внутриклеточным паразитам, могут находиться вне клеток, что важно для бактериологической диагностики бруцеллеза и тактики лечения.

Возбудитель бруцеллеза обладает устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды, способен длительное время сохраняться в различных субстратах. Во влажной среде при температуре 55°С воз­будитель бруцеллеза погибает через 60 мин., при 60°С - через 30 мин., при 70°С - через 10 мин., при кипячении - моментально. Сухой жар (90-95°С) убивает бруцеллы в течение часа. При низких температурах бруцеллы сохраняют жизнеспособность при температуре минус 5-8°С в течение 35 дней, а при минус 20°С - в течение 20 дней. Под действи­ем солнечного света бруцеллы погибают в сроки от нескольких минут до 7-8 дней в зависимости от интенсивности инсоляции, атмосферных условий и т. д.

В сыром молоке, хранящемся в холодильнике, возбудитель бруцелле­за сохраняется до 10 дней, в сливочном масле - более 4 недель, в до­машнем сыре - 3 недели, брынзе - 45 дней; в простокваше, сметане - 8-15 дней, в кумысе, шубате (сброженное верблюжье молоко) - до 3 суток; в мышцах и лимфатических узлах инфицированных туш - в течение 1 мес. и более; в овечьей шерсти, смушках - от 1,5 до 4 мес.

В замороженных инфицированных мясных и молочных продуктах бруцеллы остаются жизнеспособными в течение всего срока хранения.

Возбудитель бруцеллеза весьма чувствителен к различным дезин­фицирующим веществам.

**Методы выделения возбудителей заболевания**

Диагноз бруцеллёза не вызывает сомнений, если выделена культура при исследовании крови, костного мозга или других материалов. Частота выделения культур бруцелл варьирует от 15% до 90% и более. Наиболее часто бруцеллы выделяются из крови или костного мозга. Однако, в ряде случаев бруцеллы выделяются при исследовании мочи, церебро-спинальной, синовиальной жидкости, биоптатов печени, лимфатических узлов и других материалов.

Вся работа по выделению и дифференциации бруцелл из любого исследуемого материала должна проводиться в условиях, предупреждающих возможность инфицирования персонала и обсеменения возбудителем объектов внешней среды в специализированных лабораториях, в строгом соответствии с правилами работы с особо опасными микроорганизмами.

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

**I. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ**

1. **Исследование крови и другого биологического материала**

Посевы следует проводить на предварительно проверенные питательные среды.

**1.1. Исследование крови**

Посевы крови рекомендуется делать во время лихорадочного состояния больного, так как в этот период наблюдается наибольший процент выделения культур. Однако, не исключена возможность получения гемокультуры и при нормальной температуре.

Кровь для посева следует брать до лечения антибиотиками. Исследование крови рекомендуется проводить по методу Кастанеда, при котором кровь, взятую из локтевой вены в объеме 10 мл, засевают у постели больного в емкости с бифазной средой. Среда представляет собой скошенный во флаконе емкостью 100-200 мл агар (30-50 мл) с бульоном (25-30 мл). Кровь обычно вносят по 5 мл на поверхность агара в два флакона, один из которых инкубируют при повышенном (5-10%) содержании углекислоты ( в эксикаторе или СО₂-инкубаторе), а другой-в обычном атмосфере воздуха при температуре 37°С.

Начиная с четвертого дня посевы просматривают, и при отсутствии роста культуры поверхность агара орошают бульоном. При положительном результате на поверхности агара появляются колонии бруцелл, которые отбирают для дальнейшей идентификации и дифференциации. Если в течение 30 дней бруцеллы не обнаруживаются, то в этом случае делают контрольный высев из бульона на сывороточно-декстрозный агар.

При бактериологическом обследовании больных, прошедших курс лечения антибиотиками, через 1 месяц и спустя 4-6 месяцев после окончания курса антибиотикотерапии, а также больных хронической формой бруцеллёза в период обострения (особенно при субфебрилитете) перед началом лечения, рекомендуется проводить посевы крови, пунктатов костного мозга и лимфатических узлов на специальную питательную среду для выделения L-культур бруцелл.

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

Однако, бруцеллы в L-форме выделяются крайне редко.

**II. ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЁЗА МЕТОДАМИ ВЫЯВЛЕНИЯ**

 **СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ**

При бруцеллезе рекомендуется несколько методов, которые используются в зависимости от целей исследования.

При проведении эпидобследования населения в очагах рекомендуется: реакция агглютинации - пластинчатая - реакция Хеддльсона (РХ), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), иммуноферментный метод (ИФА), кожно-аллергическая проба Бюрне.

При обследовании населения перед профилактической вакцинацией ограничиваются пластинчатой реакцией агглютинации (Хеддльсона) или ИФА и кожно-аллергической пробой Бюрне.

Для диагностики острого и подострого бруцеллеза проводят бактериологические исследования, ставят реакцию агглютинации Райта, ИФА и РПГА.

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

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

В ранние сроки от начала заболевания (в первые 6 месяцев) диагностическая ценность серологического метода выше, чем аллергического; серологические реакции в этот период оказываются положительными почти в 98% случаев. По мере удлинения срока заболевания процент положительных серологических реакций (реакция агглютинации, РПГА) начинает падать. В поздние периоды заболевания большую диагностическую ценность имеет реакция Кумбса, ИФА и внутрикожная аллергическая проба.

При проведении обследования нужно учитывать, что если высокие титры антител почти всегда указывают на наличие инфекции, то антитела в низких титрах или их полное отсутствие не исключают возможности заболевания. В связи с этим рекомендуется проводить повторные исследования с интервалом 1-2 недели, особенно при подозрении на острую форму бруцеллеза.

Следует иметь в виду, что положительную реакцию агглютинации с бруцеллезным антигеном могут давать также сыворотки, содержащие антитела к микроорганизмам, имеющим общие антигенные детерминанты с бруцеллами (E.coli, V.cholerae, Fr.tularensis, Y.enterocolitica 0-9, S.typhimurium).

1. **Пластинчатая реакция агглютинации (реакция Хеддльсона)**

Преимущество этого метода заключается в простоте постановки реакции, быстроте получения результатов и чувствительности реакции. В качестве антигена для постановки реакции Хеддльсона и Райта применяют единый бруцеллезный диагностикум. Реакцию ставят на обычном оконном, тщательно вымытом, обезжиренном стекле, расчерченном на квадраты величиной 4x4 см каждый. По горизонтали должно быть 5 квадратов. На первом квадрате с левой стороны записывается номер испытуемой сыворотки, в последующие квадраты слева направо разливают (микропипеткой или 1 мл градуированной пипеткой) испытуемую сыворотку в следующих дозах: 0,04; 0,02; 0,01 и 0,03 мл (контроль сыворотки). К первым трем дозам сыворотки добавляют по 0,03 мл антигена. К последней дозе сыворотки (0,03 мл) добавляют 0,03 мл физиологического раствора. Сыворотку осторожно смешивают с антигеном палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. Контроль антигена ставят, добавляя 0,03 мл физиологического раствора к 0,03 мл антигена. Затем стекло слегка подогревают над пламенем спиртовки так, чтобы происходило равномерное нагревание всей поверхности стекла.

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

Постановка реакции выполняется с внутренним контролем качества:

* контроль сыворотки ставят с каждой испытуемой сывороткой для исключения спонтанной агглютинации
* контроль антигена ставят один (при любом числе испытуемых сывороток) для исключения спонтанной агглютинации применяемого антигена
* учет реакции проводят невооруженным глазом. Учет реакции оценивается в крестах:

++++ - полное просветление жидкости с крупными и мелкими хлопьями агглютината (100% агглютинация)

+++ - почти полное просветление жидкости с ясно заметными хлопьями (75% агглютинация)

++ - незначительное просветление жидкости с заметными хлопьями, т.е. 50% агглютинации

+ - мутная жидкость с едва заметной зернистостью

- - равномерная мутная жидкость

Интерпретация результатов:

* Результат «резко положительный» - во всех дозах сыворотки агглютинация на 4+.
* Результат «положительный» - во всех дозах сыворотки агглютинация не менее чем на 2+.
* Результат «сомнительный» - агглютинация в первой дозе сыворотки.
* Результат «отрицательный» - отсутствие агглютинации во всех дозах сыворотки.

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

1. **Пробирочная реакция аглютинации (Райта)**

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

Техника постановки реакции.

В пробирки разливают 0,9% раствор натрия хлорида: в первую - 2,4 мл, в остальные по 0,5 мл. В первую пробирку добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки, перемешивают, переносят 0,5 мл смеси во вторую пробирку, перемешивают, переносят в третью пробирку и т.д. Из последней пробирки 0,5 мл смеси выливают, в результате получают в каждой пробирке по 0,5 мл следующих разведений 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 и т.д. Из первой пробирки 0,5 мл переносят в чистую пробирку и добавляют туда 0,5 мл 0,9 % раствор натрия хлорида (контроль сыворотки в разведении 1:50), а 1,0 мл выливают.

Диагностикум разводят 0,9 % раствор натрия хлорида согласно прилагаемому к нему инструкции и добавляют по 0,5 мл во все пробирки, кроме контроля. После добавления диагностикума разведение сыворотки соответственно удваивается, т.е. получаются разведения 1:50, 1:100 и т.д. Сыворотки с антигеном смешивают путем встряхивания и помещают в термостат (37°С) на 18-20 часов. После инкубации пробирки выдерживают 1-2 часа при комнатной температуре и проводят учет реакции.

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

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

Дальнейшее разведение антигена 0,9 % раствор натрия хлорида производят по следующей схеме:

**Разведение антигена физиологическим раствором**

|  |  |
| --- | --- |
|  | Степень агглютинации |
| ++++ | +++ | ++ | + | - |
| Антиген, разведенный 1:2 | 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1,0 |
| Физраствор | 1,0 | 0,75 | 0,5 | 0,25 | 0 |
| % просветления | 100 | 75 | 50 • | 25 | 0 |

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

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

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

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

При диагностической оценке РА рекомендуется следующая схема:

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

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

1. **Иммуноферментный анализ (ИФА) выявления бруцелл**

**и их растворимых антигенов**

Метод используют для диагностики всех форм заболевания, а также при эпидемиологическом обследовании населения.

Метод используется для идентификации выделенных культур, подозрительных на принадлежность к роду Brucella. Метод характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, возможностью количественной и автоматизированной оценки результатов, воспроизводимостью и стандартностью основных ингредиентов анализа. С помощью ИФА можно выявить бруцеллы в концентрации 1x103 - 1x104 мкл/мл или 1-5 нг/мл бруцеллезного растворимого антигена.

Для постановки ИФА используют иммуноферментную тест-систему для определения бруцеллезного антигена, в соответствии с инструкцией по применению диагностических препаратов.

Использование ИФА в эпидемиологической практике

При проведении массовых обследований на бруцеллез для постановки ИФА может быть использована не сыворотка крови, а цельная кровь. Для этого кровь из пальца, с помощью микропипетки, в объеме 10 мкл вносится в микропробирку с физиологическим раствором в объеме 1 мл. Пробирку встряхивают и затем либо центрифугируют при 1000 об/мин 5 мин., либо дают отстояться в холодильнике при 4°С в течение 18 часов. Таким образом получают разведение сыворотки 1:200. Для постановки ИФА используют надосадочную жидкость. ИФА как скрининг-тест можно ставить в 2-х лунках микропланшета, при получении сомнительного или положительного результата ИФА повторяют в количественном варианте с последующей раститривкой надосадочной жидкости. При получении положительного результата необходимо исследовать сыворотку крови.

Техника постановки ИФА.

1. Сенсибилизация твердой фазы. В лунки планшета вносят с помощью дозатора по 200 мкл раствора бруцеллезных иммуноглобулинов в рабочем разведении (20 мкг/мл) в 0,02М растворе ФСБ pH 7,2. Планшеты помещают в термостат на 2 часа при 37°С или в холодильник на 18 часов при 4°С. После окончания адсорбции иммуноглобулины уда­ляют из лунок планшета встряхиванием и трехкратно отмывают раствором ФСБ, содержащем 0,1% твина-20.
2. Внесение исследуемого материала. Исследуемый материал в разведениях (двух- или десятикратных) на ФСБ + твин, содержащий 1% БСА вносят по 100 мкл в каждую лунку. Параллельно с исследуемыми образцами готовят серию последовательных разведений контрольного образца бруцеллезного антигена в концентрациях от 1 до 1000 нг/мл и каждое разведение антигена вносят в количестве 100 мкл в лунки планшета. Планшеты выдерживают в термостате при 37°С в течение часа, после чего жидкость из планшета удаляют встряхиванием и планшеты отмывают, как указано в п.1.

Внесение конъюгата. В каждую лунку вносят по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении (конъюгат разводят на ФСБ + твин, содержащий 1% БСА). Планшеты помещают в термостат на 40 мин., а затем отмывают как указано в п.1.

Проявление реакции. В каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного раствора, содержащего 0,04% ОФД (ортофенилендиамин) и 0,04% Н2О2 в 0,1М цитратно-фосфатном буфере pH 5,5. Планшеты помещают в темное место при комнатной температуре на 15-20 мин. Реакцию останавливают внесением в лунки 50 мкл серной кислоты в концентрации 0,5 моль/л.

Оценка результатов. Оценку результатов проводят по изменению окраски субстрата (от светло-коричневой до оранжево-коричневой) визуально или с помощью фотометра при длине волны 492 нм, сравнивая интенсивность окраски контрольных и опытных проб. Появление желто-оранжевого окрашивания в опытных лунках и положительном контроле, при его отсутствии в лунках с отрицательными контролями, свидетельствует о наличие в пробе бруцеллезного антигена. При фотометрическом учете результатов анализа проба считается положительной, если ее оптическая плотность (ОП) в 2 и более раза превосходит наивысшее значение ОП отрицательных контролей, которое не должно превышать 0,2.

**4.** **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

В основе метода ПЦР лежит многократное копирование (амплификация) специфического фрагмента ДНК-мишени, который является маркерным для данного вида. ПЦР обладает высокой чувствительностью, позволяет выявить 100-1000 бактериальных клеток в пробе. Важным преимуществом перед иммунологическими тестами выявления бруцеллезного антигена является высокая специфичность ПЦР (отсутствуют перекрестные реакции с ДНК E.coli, V.cholerae, F.tularensis, Y.enterocolitica 0-9, Y.pestis EV, S.typhimurium). Подготовку проб для исследования (выделение ДНК) и проведение ПЦР осуществляют с помощью специального набора, в который включены все необходимые ингредиенты.

При диагностике бруцеллеза у людей ДНК возбудителя определяют в сыворотке крови, спинномозговой и синовиальной жидкости и др. Оценку результатов ПЦР следует проводить с учетом того, что специфический праймер для проведения этой реакции является родовым и выявляет ДНК всех видов бруцелл, в том числе и вакцинных штаммов. Это необходимо учитывать в эндемичных по бруцеллезу регионах, где для вакцинации животных используются живые бруцеллезные вакцины, которыми может быть инфицирован обслуживающий их персонал.

В тест-системе для постановки ПЦР используют праймеры, синтезированные на основе последовательности гена BCSP31, кодирующего поверхностный белок наружной мембраны В.abortus размером 31 кД. Родоспецифические праймеры: прямой праймер Вг1 5'- AGT CAG ACG TTG ССТ ATT G-3' и обратный праймер Вг2 5'- GTG ТТС AGC СТТ GAT АТС G-3' фланкировали фрагмент ДНК размером 200 п.н. и обеспечивали высокую специфичность ПЦР.

Первым этапом, с которого начинается ПЦР-анализ, является выделение ДНК из исследуемого объекта. Успех молекулярной диагностики посредством ПЦР во многом зависит от эффективности применяемого метода выделения ДНК из инфекционных агентов, находящихся в диагностическом материале (клетках крови, сыворотке крови, моче, слюне, желудочном соке, ликворе, мокроте, пунктатах внутренних органов), а также в объектах внешней среды.

Необходимым условием при выделении ДНК является исключение потенциальной возможности перекрестного загрязнения исследуемых проб. Для исключения ложноположительного результата необходимо обязательное использование чистых перчаток, одноразовых пробирок и наконечников к автоматическим пипеткам, проведение предварительной ультрафиолетовой обработки помещения и рабочих поверхностей столов и приборов.

Предварительная подготовка проб для исследования (кровь, сыворотка крови, моча, тест-штаммы и тест-объекты внешней среды, органы животных) включает этапы депротеинизации. 50 мкп образца вносят в 450 мкл лизирующего буфера (4.5 М гуанин тиоционата в насыщенном 0.1 М трис-HCI pH 7.0 фенола) с добавлением 100 мкл хлороформа, перемешивают на Vortex и центрифугируют при 12000 об/мин 5 мин., с последующим осаждением ДНК из водной фазы равным объемом изопропанола с помощью центрифугирования при 12000 об/мин 15 мин. Осадок ДНК промывают 70% этанолом, вновь центрифугируют при 12000 об/мин 5 мин., сушат, оставив пробирки открытыми при комнатной температуре в течение 20-30 мин. и растворяют осадок ДНК в 10 мкл деионизированной воды и добавляют в пробирки с реакционной смесью для проведения ПЦР.

В качестве положительного контроля используется 100 пг ДНК В. abortus.

В пробирки объемом 0,5 мл добавляют 15,0 мкл реакционной смеси с 0,5 мкл Taq - полимеразы (2,5 ед/мкл) и 10 мкл подготовленной пробы, вносят 20-30 мкл вазелинового масла, пробирки центрифугируют5 сек. при 3 тыс. об./мин., помещают предварительно прогретый до 94°С амплификатор.

Реакцию проводят при следующих температурных режимах:

94°С -10 мин., 50°С -1 мин. -1 цикл; 94°С -1 мин., 45°С -1 мин.,

72°С -1 мин. -10 циклов и 94°С -1 мин., 43°С -1 мин., 72°С -1 мин. - 25 циклов на амплификаторе МС-2 “ДНК-Технология”.

Результаты реакции учитывают с помощью электрофореза в 1.2% агарозном геле, приготовленном на 1-кратном трисацетатном буфере - 1хТАЕ (к 20 мл 50-кратного ТАЕ добавляют 980 мл дистиллированной воды). Агарозный гель готовят следующим образом: агарозу (0,6 г) растворяют в 50 мл 1хТАЕ нагреванием в кипящей водяной бане до полного равномерного расплавления, раствор охлаждают до 55-60°С, добавляют 6 мкл 1% раствора бромистого этидия, перемешивают. Заливают в камеру, согласно инструкции к аппарату для горизонтального электрофореза. Для создания стартовых лунок в кювету ставят гребенку с зубцами. Полимеризация агарозы происходит при температуре 42°С в течение 10-20 мин. После застывания агарозы осторожно вынимают гребенку и переносят ее в аппарат для электрофореза. В камеру заливают 1хТАЕ, так, чтобы толщина слоя жидкости над гелем составляла 1-2 мм. В лунки агарозного геля вносят 12,5 мкл амплифицированного образца. Электрофорез проводят при 120 В в течение 30 мин., помещая начало геля ближе к катоду.

В практику работы лабораторий широко внедряется метод ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). Сущность метода заключается в исследовании продуктов амплификации с помощью специального прибора без последующего электрофореза. Отсутствие стадии электрофореза минимизирует риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшает число ложноположительных результатов.

ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Однако очень высокая чувствительность ПЦР требует иных подходов к клинической интерпретации результатов. Необходимо учитывать тот факт, что попадание возбудителя бруцеллёза в организм человека может не вызывать развитие инфекционного процесса (Elbert, 1980), особенно при контакте с малыми дозами слабо патогенных видов бруцелл. Кроме того значительное число сельскохозяйственных животных ежегодно прививается против бруцеллёза. При этом используются живые бруцеллёзные вакцины, которые создают нестерильный иммунитет и длительное время вакцинный штамм выделяется в окружаю­щую среду. Лица, обслуживающие этих животных, также контактируют с вакцинными штаммами и могут иметь положительную реакцию ПЦР.

Аналогичная ситуация может создаваться на предприятиях, перерабатывающих продукты животноводства, где производится забой вакцинированных животных или при употреблении не пастеризованных молочных продуктов. Эти особенности необходимо учитывать при получении положительных результатов ПЦР без клинических проявлений и положительных результатов серологических тестов. В этих случаях важное значение приобретает тщательно собранный эпидемиологический анамнез и комплексное клинико-лабораторное обследование.

**Содержание:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№** | **Наименование инструкций** | **Страница** |
| 1. | Приказ МЗ КР №586 от 10.08.2018г. «О совершенствовании мероприятий по профилактике заболевания людей бруцеллезом в Кыргызской Республике».  | 1-5 |
| 2. | Приложение 1. Методическое указание по эпидемиологическому надзору за бруцеллезом.Область применения | 6 |
| 3. | Общие положение  | 6 |
| 4. | Эпидемиологические особенности бруцеллеза | 7-8 |
| 5. | Эпидемиологический надзор за бруцеллезом | 8-11 |
| 6. | Клиническая диагностика бруцеллезной инфекции | 11-12 |
| 7. | Учет и регистрация больных бруцеллезом в организациях здравоохранения  | 12-13 |
| 8. | Мониторинг за циркуляцией возбудителя  | 13 |
| 9. | Эпидемиологическое районирование административной территории Кыргызской Республики | 14 |
| 10. | Эпидемиологический прогноз | 14 |
| 11. | Алгоритм действий при эпидемиологическом неблагополучии по бруцеллезу  | 15-17 |
| 12. | Эпиднадзор за хроническим бруцеллезом | 17-18 |
| 13. | Профилактические мероприятия | 18 |
| 14. | Межведомственная интеграция по эпизоотологическому и эпидемиологическому благополучию населения | 18 |
| 15. | Приложение 2. Социальная мобилизация населения  | 18 |
| 16. | Лабораторная диагностика бруцеллеза | 19-29 |
| 17. | Содержание  | 30 |
| 18. | Перечень сокращений | 31 |

**Перечень сокращений**

ГИС – географические информационные системы;

НЦЭСМП – Научный центр экспертизы средств медицинского применения;

Г – гуанин;

ДДМ – диско-диффузионный метод;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДТР – диагностический титр разведения;

ИП – интенсивный показатель;

ИФА – иммуноферментный анализ;

ЛПС – липополисахарид;

МО – медицинские организации;

м.к. – микробная клетка;

МДа – мегадальтон;

МЕ – международные единицы;

мкм – микрометр;

МПА – мясопептонный агар;

МПБ – мясопептонный бульон;

МПК – минимальная подавляющая концентрация;

МУ – методические указания;

МУК – методические указания по контролю;

МФА – метод флуоресцирующих антител;

ООИ – особо опасные инфекции;

ПБА – патогенный биологический агент;

ПСЛ – показатель специфического лизиса лейкоцитов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЭО – показатель эпидемической опасности;

РА – реакция агглютинации;

РИФ – реакция иммунофлуоресцении;

РНАт – реакция нейтрализации антител;

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации;

РК – реакция Кумбса;

РЛЛ – реакция лизиса лейкоцитов;

РХ – реакция Хеддлсона;

РА– реакция агглютинации Райта;

РЦКиООИ- Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций

СП – санитарные правила;

Тб – Тбилиси;

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;

ЦНС – центральная нервная система;

Ц – цитозин;

MLVA – мультилокусный анализ вариабельного числа тандемных повторов.