СПРАВОЧНИК

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

gost.e-ecolog.ru

СПРАВОЧНИК

•

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

•

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Под редакцией Б. И. АНТОНОВА

МОСКВА АГРОПРОМИЗДАТ 1986

ББК 48.73
Л 12
УДК 619:616.9—08 (031)

Составители: *Б. И. Антонов, В. В. Борисова, П. М. Волкова, Л. П. Каменева, Л. В. Кошеленко, Г. А. Михальский, В. В. Поповцев, Л. И. Прянишникова, В. Е. Храпова*

Л 12 **Лабораторные** исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции: Справочник/Сост. Б. И. Антонов, В. В. Борисова, П. М. Волкова и др.; Под ред. Б. И. Антонова.— М.: Агропромиздат, 1986.— 352 с.

В книге даны методы лабораторных исследований патологического материала с целью определения возбудителя инфекционной болезни. Они изложены по единой схеме: бактериологические и бактериоскопические исследования, биопроба, идентификация и дифференциация возбудителей. Методы унифицированы и стандартизированы

Для ветврачей и фельдшеров, лаборантов ветеринарных лабораторий.

Л $\frac{3805020000—079}{035\ (01)—86}$ 305—86 ББК 48.73

© ВО «Агропромиздат», 1986

ПРЕДИСЛОВИЕ

В деле выполнения решений партии и правительства по дальнейшему развитию животноводства, а также задач, поставленных Продовольственной программой страны, ветеринарной службе большую помощь оказывают ветеринарные лаборатории.

Ветеринарные лаборатории осуществляют диагностику инфекционных и паразитарных болезней животных, выявляют нарушения обмена веществ в их организме, проводят исследования, направленные на предупреждение отравлений, помогая тем самым специалистам совхозов, колхозов и других хозяйств успешно осуществлять лечебно-профилактические мероприятия. От того, насколько своевременно ставится диагноз, разработаны и рекомендованы профилактические и лечебные меры, зависит успех ликвидации болезней, сохранность поголовья животных и повышение их продуктивности.

Последнее время в лабораториях появилось много приборов и приспособлений, облегчающих труд специалистов и позволяющих проводить исследования на более современном и качественном уровне, с большой достоверностью. В связи с этим многие ранее действовавшие методические указания переработаны.

Кроме того, ежегодно для лабораторной практики предлагаются новые методы диагностики. В отечественной и зарубежной литературе постоянно публикуется большое количество материалов о новых методах исследований, предлагаются различные модификации существующих методик, вводятся дополнительные диагностические тесты.

Ветеринарные лаборатории в своей работе не могут использовать всего многообразия имеющихся в литературе методов исследования или из-за того, что они недостаточно апробированы, или из-за сложности применяемого оборудования. Иногда методы, предлагаемые различными авторами, при определении одних и тех же показателей дают несовпадающие результаты.

В связи с этим в справочник включены методы лабораторных исследований патологического материала, получаемого от больных, убитых или павших сельскохозяйственных животных, апробированные Центральной ветеринарной лабораторией и утвержденные Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР. Книга содержит методические указания по диагностике инфекционных болезней бактериальной этиологии, а также методические указания по применению культур клеток в диагностических исследованиях.

Методики изложены по единой схеме: взятие и пересылка патологического материала, методы его обработки и обогащения; бактериоскопические исследования, включая световую и люминесцентную микроскопию; выделение культур возбудителей инфекционных болезней на питательных средах; заражение лабораторных животных как с целью выделения чистой культуры возбудителя, так и определения степени ее патогенности; гистологические исследования; идентификация и дифференциация возбудителей с использованием различных методов; серологические исследования для определения вида возбудителя.

Приведенные в справочнике методы лабораторных исследований унифицированы и стандартизированы. В широком смысле слова унификация и стандартизация подразумевают применение для различных исследований одних и тех же аппаратов, приборов, инструментов, посуды, реактивов, исключая, конечно, специальные методы исследования; применение стандартных (унифицированных) питательных сред и диагностикумов; разработку методических указаний по единой форме. Все это позволяет лабораторным работникам с меньшей затратой сил и средств, на высоком методическом и техническом уровне, качественно и в срок проводить диагностические исследования. Таким образом, стандартизация методов исследования явится способом наведения строгого порядка в работе ветеринарных лабораторий.

Книга предназначена для ветеринарных врачей, фельдшеров, а также лаборантов ветеринарных диагностических лабораторий.

В справочник не вошли материалы по диагностике туберкулеза, так как они пересматриваются и дополняются, поэтому их публикация будет осуществлена в последующих изданиях.

ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ ПО ПОЛУЧЕНИЮ, КОНТРОЛЮ И ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

(Утверждено Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 20 июня 1983 г.)

1. Общие положения.

1.1. Сыворотка крови животных используется в качестве компонента питательной среды для размножения культур клеток и для вирусологических исследований.

1.2. Для заготовки сыворотки используют кровь, взятую у крупного рогатого скота (молодняка, коров и их эмбрионов), а также у лошадей, овец и свиней.

1.3. Кровь животных заготавливают на мясокомбинатах (от убойных животных) или в хозяйствах (в цехах на биопредприятиях), в которых содержат животных-доноров.

1.4. Заготавливаемая сыворотка крови подлежит обязательной проверке на стерильность, ростовые свойства и наличие специфических антител.

1.5. Процесс изготовления сыворотки для культивирования клеток включает:

подготовку помещений и оборудования для заготовки крови и получения сыворотки;

подбор доноров для взятия крови и их подготовку;

взятие крови и отстаивание сыворотки;

сбор отделившейся сыворотки для фильтрации;

стерилизацию сыворотки и разлив ее в сосуды;

контроль сыворотки;

передачу сыворотки на хранение.

1.6. Основным требованием получения высококачественной, неконтаминированной сыворотки является строжайшее соблюдение условий стерильности на всех стадиях ее приготовления.

1.7. Учитывая, что серии сыворотки крови животных, приготовленные в жаркий сезон года (вторая половина июня, июль и первая половина августа), в большинстве случаев бывают контаминированы микроорганизмами и токсичными, готовить сыворотку в это время не следует.

2. Подготовка помещений для изготовления сыворотки.

2.1. Помещения для заготовки крови и приготовления из нее сыворотки состоят из профилактория, донорского и аппаратного отделений, предбокса и бокса.

2.1.1. Профилакторий — помещение, в котором животные-доноры подлежат выдержке и клиническому обследованию. Для этого используют крытые помещения-карды, непосредственно прилегающие к месту взятия крови.

2.1.2. Донорское помещение, в котором непосредственно берут кровь у животных. В этом помещении должен быть станок для фиксирования животных.

2.1.3. В аппаратном помещении размещают автоклавы для стерилизации бутылей, гибких шлангов, игл и других принадлежностей, необходимых для приготовления сыворотки, сушильные шкафы. Здесь же моют и готовят посуду для взятия крови.

2.1.4. Предбокс и бокс, оборудованные стеллажами, бактерицидными лампами и отсасывающим компрессором, служат для отстоя, сбора сыворотки и последующей ее стерилизации путем фильтрования.

2.1.5. Все помещения для изготовления сыворотки должны находиться в одном здании на территории мясокомбината.

2.2. Размер площади помещений и оборудование в каждом случае определяют в соответствии с объемом производимой продукции (перечень оборудования приводится в приложении к настоящему Временному наставлению).

2.3. Все помещения необходимо содержать в образцовой чистоте и подвергать регулярной дезинфекции 3%-ным раствором пергидроля

в 0,5%-ном растворе ОП-7, ОП-10 или другого моющего средства. Рекомендуется применять аэрозольную дезинфекцию.

3. Получение крови от животных.

3.1. Для получения крови подбирают только молодых животных-доноров хорошего, крепкого телосложения, клинически здоровых, свободных от латентной инфекции, из местности, благополучной по инфекционным болезням животных. Их следует оберегать от стрессовых факторов. За 12 ч до взятия крови прекращают давать корма донорам, водопой не ограничивают.

3.2. От поголовья животных-доноров кровь получают из яремной вены по закрытой системе, исключающей контакт крови с внешним инфицированным воздухом, что позволяет получать сыворотку высокого качества.

3.2.1. Кровь по замкнутой системе берут при помощи иглы из нержавеющей стали длиной 120 мм и диаметром 10 мм, соединенной герметично через эластичный шланг и резиновую пробку с бутылью на 10—15 л, которая сообщается с атмосферным воздухом через «воздушку» с ватным фильтром. Иглу в закрытой системе вкладывают в бактериологическую пробирку, открытый конец которой по краям обернут ватой.

В бутыль для сбора крови следует налить 100 мл 1%-ного гидролизата лактальбумина на физиологическом растворе, которым смачиваются поверхности бутыли перед взятием крови. В случае нестерильности бутылей раствор через 2—3 сут выдерживания при комнатной температуре становится мутным.

Всю систему в собранном виде надо стерилизовать в автоклаве при 2 атм в течение 60 мин. Иглу обнажают непосредственно перед пункцией и вводят в яремную вену, отсепарированную от кожи и соединительной ткани.

3.2.2. Кровь получают от животных по закрытой, стерильной системе перед направлением их в убойный цех. Для этого в донорском помещении при мясокомбинате животное заводят в станок и фиксируют его голову. Участок кожи в верхней трети шеи обрабатывают настойкой йода или 70%-ным спиртом, затем делают небольшой надрез кожи длиной до 2 см и обнажают яремную вену, которую для лучшего наполнения ниже надреза прижимают резиновым жгутом. В яремную вену вводят стерильную иглу, благодаря чему кровь по закрытой системе стекает в бутыль. В зависимости от массы и состояния животного от одной головы можно набрать от 5 до 15 л крови. В любом случае необходимо, чтобы животное можно было перевести в убойный цех.

3.2.3. Кровь получают по закрытой системе и в убойном цехе от животных, подвешенных на блоке конвейера.

3.2.4. Кровь от убойных животных на мясокомбинатах получают также по открытой системе полым ножом из сердца животного, подвешенного на блоке конвейера, и собирают в открытые стерильные сосуды, однако этот способ не обеспечивает должное качество сыворотки.

3.3. У лошадей, овец (как и у крупного рогатого скота) всех возрастов кровь берут из яремной вены. У свиней кровь в больших количествах можно получать непосредственно из сердца путем прокола грудной клетки полым ножом.

3.4. Кровь от крупных животных собирают в бутыли емкостью 10—15 л, от овец и свиней — 3—5 л. После заполнения кровью сосуда наполовину гибкий шланг перекрывают зажимом, затем вынимают иглу из вены.

3.5. Для заготовки эмбриональной крови используют 5—9-месяч-

ные плоды крупного рогатого скота. Кровь от них можно брать из пупочной, яремной, верхней и нижней полой вен и сердца. Наибольшее количество крови получают из нижней полой вены. В зависимости от возраста плода кровь следует брать в сосуды емкостью 0,5—2,0 л при помощи обычных игл для взятия крови по замкнутой системе.

3.6. При взятии крови как у взрослых животных, так и эмбрионов необходимо максимально соблюдать условия асептики и стерильности.

4. Отстаивание крови и сбор сыворотки.

4.1. Бутыли с кровью в вертикальном положении оставляют при комнатной температуре на 4 ч до образования плотного сгустка. Затем их протирают дезинфицирующим раствором (3% пергидроля в 0,5%-ном ОП-7, ОП-10 или другом моющем средстве; можно использовать и 1%-ный раствор карболовой кислоты или 2%-ный раствор хлорамина) и переносят в стерильные боксы, где они должны быть размещены под углом 30° на стеллажах в специально устроенных по размеру бутылей ложах. Бутыли оставляют при включенных бактерицидных лампах на 48 ч для отстаивания сыворотки.

4.1.1. Сыворотку считают пригодной для сбора при условии, что она прозрачная, соломенно-желтого цвета, в ней отсутствуют взвешенные частицы, сгусток крови плотный, хорошо сформирован.

4.2. Перед отсасыванием сыворотки над факелом из бутылей удаляют резиновые пробки с вмонтированными эластичными трубками. Отверстие горлышка бутыли следует прикрыть салфеткой (40×40 см) из 3—4 слоев плотной ткани, смоченной 1%-ным раствором карболовой кислоты. Сыворотку отсасывают по закрытой системе (бутыль — стеклянная трубка для отсоса сыворотки — сосуд для сбора сыворотки) в герметичные, выдерживающие давление до 1 атм сосуды из нержавеющей стали или бутыли на 10—20 л. Бутыли должны иметь два отверстия: 1) входное, куда засасывается сыворотка (через нее же она поступает на фильтр при стерилизации), и 2) для сообщения с компрессорами: разряжающим — при отсасывании сыворотки из бутылей, нагнетающим — при стерилизации сыворотки фильтрацией.

Сыворотку из бутыли отсасывают над пламенем горелки при помощи изогнутой стеклянной трубки длиной 45—50 см, диаметром 10—15 мм, от которой для стока сыворотки отходит гибкий (резиновый, силиконовый и др.) шланг к емкости, связанной с отсасывающим компрессором посредством эластичной трубки. Изогнутая стеклянная трубка, гибкие шланги и емкость из нержавеющей стали для сбора сыворотки, герметично соединенные в единую замкнутую систему, предварительно должны быть автоклавированы при 2 атм в течение 60 мин. Емкость, в которую собирают отсасываемую сыворотку, и соединенный с ней через гибкий шланг компрессор следует изолировать друг от друга «воздушкой» с ватным фильтром. При необходимости в процессе отсасывания сыворотки на эластичный шланг, отходящий от стеклянной трубочки, накладывают зажим.

После завершения сбора сыворотки входные и выходные гибкие шланги емкости зажимают кровеостанавливающими пинцетами, а их свободные концы, обернутые стерильной, смоченной в 70°-ном спирте-ректификате ватой, прикрывают стерильной пробиркой. В таком положении сыворотку в сосудах из нержавеющей стали доставляют в бокс для стерилизации.

4.3. Эмбриональную кровь выдерживают в стерильном боксе в течение 24 ч до образования плотного сгустка и появления прозрачной, соломенно-желтой сыворотки, которую затем собирают в общую, пред-

варительно простерилизованную емкость. Кровяной сгусток с остатком сыворотки центрифугируют при 2500—3000 об/мин в течение 30 мин. При отсутствии признаков гемолиза и исключении контаминирования микроорганизмами центрифугат подвергают стерилизующей фильтрации. Собранную сыворотку фильтруют в день получения. В случае необходимости хранения ее подвергают замораживанию при минус 20 или минус 30°С. После оттаивания сыворотку перед фильтрацией следует перемешивать. Систему отсасывания соединяют с системой сбора сыворотки в стерильном боксе над пламенем горелки при максимальном соблюдении условий асептики и стерильности.

5. Стерилизация сыворотки.

5.1. Сыворотку стерилизуют при помощи специальных фильтров: 1) глубинных или глубоких; 2) ситовых или поверхностных; 3) комбинированных. Кроме того, применяют также префильтры — специальные пластины для предварительного удаления из сыворотки грубых частиц и бактерий с целью предохранения от засорения основной части фильтрующей системы — стерилизующей пластины. В качестве префильтров для отечественных глубинных фильтров следует использовать крупнопористые пластины марки «Ф».

5.2. Для обеспечения надлежащей стерилизации сыворотки необходимо подобрать фильтры соответствующих типов и марок, правильно их смонтировать, руководствуясь прилагаемыми к ним заводскими инструкциями по их установке (см. приложение).

5.3. Фильтры, используемые для стерилизации сыворотки, подлежат автоклавированию: глубинные — при 2 атм в течение 60 мин; поверхностные — при 1 атм в течение 40 мин.

5.4. Профильтрованную сыворотку разливают в стерильные флаконы емкостью 250 и 500 мл с соблюдением правил асептики.

6. Оценка пригодности сыворотки крови животных для культивирования клеток.

6.1. Качество приготовленной сыворотки необходимо оценивать на стерильность, способность стимулировать пролиферацию клеток и на содержание специфических антител.

6.2. На стерильность сыворотку крови проверяют путем высева на питательные среды с целью исключения грибковой, бактерийной и микоплазменной контаминации.

6.2.1. Проверку осуществляют в начале, середине и в конце фильтрации во время ее разлива и после расфасовки во флаконы готовой продукции. В последнем случае берут 3 флакона с сывороткой, выдерживают в течение недели при 37°С, после чего делают посев на бактериологические среды. Работу следует выполнять в стерильных боксах, специальной одежде и в маске. Руки должны быть предварительно продезинфицированы. Горлышко сосуда с исследуемым материалом предварительно протирают спиртом и обжигают над пламенем.

6.2.2. Сыворотку высевают на жидкие среды в количестве 25 мл на 100 мл среды. Кроме того, используют полужидкую тиогликолевую среду.

6.2.3. Допускается использование для контроля на стерильность обычных питательных сред, в частности, МПБ, МПА — для бактерий аэробов; среды Мартена, Китта — Тароцци — для бактерий анаэробов; среды Сабуро, Чапека — для микроскопических грибов.

6.2.4. Универсальную полужидкую тиогликолевую среду разливают по 20 мл в 4 пробирки, в каждую из которых засевают 1 мл исследуемого материала (в толщу среды). Две пробирки, предназначенные

для обнаружения бактерий (аэробы и анаэробы), ставят в термостат с температурой 37°С, две пробирки (для выявления микроскопических грибов) оставляют при 20—25°С.

6.2.5. Для лучшего обнаружения аэробных бактерий и микроскопических грибов в общую схему контроля стерильности рекомендуется дополнительно вводить 1%-ные растворы производимого Казанским ветеринарным институтом гидролизата лактальбумина (ГЛА) или белковых отходов мясокомбината с 1%-ной глюкозой. Каждую пробу сыворотки высевают в 4 колбы (склянки) со средой. Из них половину инкубируют при температуре 20—25°С, вторую половину ставят в термостат при 37°С.

6.2.6. Микоплазменную контаминацию устанавливают на бульоне Эдварда — Хейфлика. Для этого высевают 25 мл проверяемого материала на 100 мл бульона. Следует иметь в виду, что микоплазмы лучше растут в атмосфере 95%-ного CO_2.

6.3. Результат микробиологических исследований учитывают через 3, 7 и 14 сут. В случае обнаружения микроорганизмов делают высев на твердые или полутвердые агаровые среды с последующим исследованием особенностей выросших колоний и приготовленных из них мазков.

6.4. Исследуемый материал считают нестерильным, если в двух и более колбах (склянках) с бактериологической средой наблюдается рост микроорганизмов. При росте только в одной склянке исследование материала на стерильность повторяют.

6.5. Контроль стерильности сыворотки на культуре клеток с целью исключения вирусной инфекции выполняют на штаммах и линиях клеток с широким диапазоном чувствительности к наиболее вероятным вирусам-контаминантам. Для этого культуру клеток 4—5 раз последовательно пересевают в среду с исследуемой сывороткой. Клетки 5-го пересева в нативном, окрашенном препаратах и в метафазной пластинке исследуют для выявления общих морфологических изменений в культуре, посторонних включений в цитоплазме, нарушения структуры хромосом. Исследование сыворотки на распространенные миксо- и парамиксовирусы проводят по реакции гемагглютинации и гемадсорбции.

6.6. Проверку ростостимулирующей активности сыворотки на культуре клеток проводят путем нескольких последовательных пересевов клеток на среды с сывороткой, как указано в п. 6.5.

6.6.1. Для контроля качества сыворотки составляют контрольную систему, которая включает культуру клеток (КФ или ПЭК, или перевиваемые линии), питательную среду с исследуемой сывороткой, растворы версена или трипсина (для снятия клеток). В этой системе неизвестным элементом является только сыворотка. Другие компоненты должны быть заведомо проверенными и соответствовать предъявляемым требованиям.

Клетки, используемые в контрольной системе, должны иметь характеристику (морфология, кариология, пролиферативная активность), полученную при их культивировании в присутствии заведомо хорошей сыворотки.

6.6.2. Исследование неизвестной сыворотки следует проводить в течение 5 последовательных пересевов клеток с использованием одних и тех же компонентов контрольной системы.

6.6.3. Ростостимулирующую активность сыворотки на культуре клеток оценивают по скорости образования сплошного клеточного монослоя (размеры сосудов стандартны и доза посева клеток постоянная) и состоянию клеток в выросшей культуре.

Для этого культуру с хорошим монослоем клеток из одного сосуда

пересевают в соотношении 1 : 3 или 1 : 4 в такие же сосуды. Культуру снимают смесью версена с трипсином (1 : 1). Клетки инкубируют при температуре 37°С. Если исследуемая сыворотка отвечает предъявляемым требованиям, время образования сплошного монослоя клеток остается постоянной величиной в течение пяти последовательных пересевов культуры и составляет у перевиваемых линий не более 2—4 дн., для диплоидных штаммов оно не превышает 3—4 дня. Визуально клеточный слой выглядит в виде хорошо выраженного матового налета на поверхности сосуда для культивирования. Контуры клеток под микроскопом четкие, с ярко выраженным тургором, благодаря этому поверхность клеточного слоя выглядит рельефной; цитоплазма должна быть чистой, хорошо преломлять свет.

6.7. Содержание в сыворотке специфических антител определяют с целью исключения влияния их на чувствительность клеток к вирусам. Поэтому каждая серия приготовленной сыворотки подлежит контролю на наличие специфических антител к наиболее распространенным вирусным болезням животных в соответствии с действующими методическими указаниями по их лабораторной диагностике.

Для вирусологических исследований следует применять сыворотки крупного рогатого скота и их эмбрионов, свободных от специфических антител, а также гетерологичные сыворотки. В частности, при работе с вирусами крупного рогатого скота необходимо клетки культивировать в среде со свиной или лошадиной сывороткой, и наоборот.

7. Хранение сыворотки.

7.1. На хранение ставят сыворотку, прошедшую контроль и отвечающую предъявляемым требованиям.

7.2. На флаконах с сывороткой должны быть этикетки, на которых указывают номер серии, количество сыворотки, дату изготовления и дату контроля.

7.3. При хранении сыворотки в течение 2—3 мес ее следует оставлять в условиях 4°С.

7.4. Сыворотку, предназначенную для длительного хранения, подвергают замораживанию при минус 20—30°С или лиофильной сушке и в таком состоянии оставляют до использования.

Приложение 1

Сыворотка крови животных для культивирования клеток (справка)

Сыворотка крови животных является незаменимым компонентом питательной среды для размножения различных видов культур клеток. Будучи внутренней средой, она отражает различные состояния организма. Изменения в ее составе связаны с адаптацией животного к меняющимся факторам внешней и внутренней среды. Так, содержание общего белка и его фракций, являющихся важнейшими компонентами сыворотки крови, стимулирующими деление клеток в культуре, может варьировать в широких пределах в зависимости от климатических и сезонных условий, характера кормления и содержания животных, их физического состояния, возраста, мышечной и других нагрузок, типа обмена веществ, обусловленного породностью и другими генетическими особенностями, а также от патологических процессов в организме.

Действие сыворотки на клетки в культуре многостороннее, оно функционально связано с определенными составными компонентами сыворотки.

В частности, сыворотка способствует прикреплению клеток к поверхности сосуда, стимулирует клеточную пролиферацию, в зависимо-

сти от видовой принадлежности и количественного содержания в ростовой среде способна обратимо влиять на морфологию клеток и придавать им стабильность, сдерживая распад белков.

Сыворотка обладает свойством в какой-то степени связывать и инактивировать продукты метаболизма, токсические вещества стекла.

Сыворотку следует также рассматривать как фактор, повышающий сопротивляемость клеток к инфекции. Эта функция сыворотки выражается в следующем:

активизации обменных процессов в клетке, ее подвижности, фагоцитоза и пиноцитоза;

стимулировании продукции противовирусного фактора — интерферона;

бактерицидном действии.

Неспецифические ингибиторы, антитела при вирусологических исследованиях ухудшают чувствительность клеток к вирусам.

Вместе с тем сыворотка может быть одним из источников контаминирования клеток микроорганизмами (эндогенные контаминанты — микроорганизмы, проникшие в кровь в результате активизации латентной инфекции в организме животных — доноров крови при стрессовых условиях, а также экзогенные контаминанты — микроорганизмы, внесенные в сыворотку в процессе ее приготовления).

Приложение 2

Перечень оборудования, необходимого для приготовления сыворотки

Наименование	Количество, шт.
Станки фиксационные для крупного рогатого скота	1
Зажимы для быков или закрутки	4
Бутыли на 20 л	10
Бутыли на 10—15 л	50
Бутыли на 2—3 л	30
Флаконы для взятия крови на 0,25—0,5 л	1000
Пробки резиновые № 45, имеющие два отверстия для трубок из нержавеющей стали	80
Пробки резиновые № 40, имеющие два отверстия для трубок из нержавеющей стали	50
Пробки резиновые № 24	1000
Трубки из нержавеющей стали диаметром 10 мм длиной 120 мм	160
Иглы из нержавеющей стали диаметром 10 мм длиной 100 мм	100
Сосуды цилиндрические из нержавеющей стали с герметично закрывающейся крышкой, имеющей две выходные трубки из нержавеющей стали диаметром 10 мм длиной 120 мм	6
Кровоостанавливающие пинцеты	80
Силиконовые трубки диаметром 8—10 мм длиной 1500 мм	90
Силиконовые трубки диаметром 8—10 мм длиной 300 мм	90

Продолжение

Наименование	Количество, шт.
«Воздушки» — стеклянные трубки диаметром 8—12 мм длиной 110—130 мм, в середине имеется расширение	100
Пробирки бактериологические	100
Компрессор разрежающий	2
Компрессор нагнетающий	2
Установка фирмы «Миллипор» для стерилизации сыворотки и фильтрующие пластины к ней или	1
Фильтры Сальникова с набором стерилизующих пластин	2
Стеллажи на 30—40 мест для 10-литровых бутылей	2

Приложение 3

Фильтры для стерилизации сыворотки

Глубинные фильтры. Принцип стерилизации сыворотки фильтрами этого типа основан на задержке микроорганизмов путем адсорбции к поверхности микроходов: часть микроорганизмов, размер которых превышает диаметр этих ходов, задерживается механически. Способность фильтров задерживать микроорганизмы ограничена — чем больше их в сыворотке, тем быстрее реализуется стерилизующая способность пластины.

Для стерилизации больших объемов сыворотки используют асбестоцеллюлозные пластины (марки Ф-5), спрессованные в виде круглого диска диаметром 300 мм, толщиной 3,0—3,5 мм, которые выпускаются Тамбовским заводом резинотехнических изделий. Рекомендуются также фильтры, выпускаемые фирмой «Зейтц» (ФРГ). Их изготавливают в виде спрессованных асбестоцеллюлозных дисков диаметром 300 мм и толщиной 3—5 мм.

Зейтцевские фильтры по назначению подразделяются на: ФС — крупнопористые пластины для предварительной очистки сыворотки от суспендированных частиц; ЕК — задерживают крупные бактерийные клетки; ЕКС-1 — более плотные, освобождают жидкость и от мелких бактерий; ЕКС-2 — наиболее плотные стерилизующие пластины.

Глубинные фильтры отличаются от ситовых большей емкостью, что придает им способность задерживать значительное количество микроорганизмов.

Асбестоцеллюлозные фильтрующие пластины для использования необходимо укреплять на опорные металлические рамы Зейтца, Сальникова, по бокам скреплять их болтами и закручивать, но не полностью, чтобы при автоклавировании горячий пар, проникая, обеспечивал полную стерилизацию фильтра (подробная информация указана в прилагаемых инструкциях к установке). После этого фильтр упаковать в 3—4 слоя плотной ткани и стерилизовать при 2 атм в течение 60 мин. После остывания болты фильтра докручивают до предела, и установка готова для эксплуатации. Во избежание засасывания загрязненного воздуха фильтр для остывания помещают в стерильные условия.

При фильтрации глубинными фильтрами давление воздуха не должно превышать 0,5 атм.

Недостатки асбестоцеллюлозных глубинных фильтров:

хрупкость и возможность образования в них трещин;

наличие токсических веществ, требующих предварительного отмывания;

опасность попадания асбестоцеллюлозных волокон в фильтрат;

невозможность регулирования диаметра пор пластины;

размножение микроорганизмов, задержавшихся при продолжительной фильтрации, а также проникновение микроорганизмов в фильтрат при повышении давления свыше 0,5 атм.

Ситовые или поверхностные фильтры. К фильтрам этих типов относятся мембранные стерилизующие пластины, которые изготавливают из различных полимерных материалов, например из эфиров целлюлозы (фирма «Миллипор»), нейлона (фирма «Палл»). Поверхностные фильтры отличаются однородностью структуры, состоящей на 85% из пор, которые можно калибровать. Они плотные, гибкие, при небольшой толщине, не превышающей 0,5 мм, достаточно прочны.

Принцип стерилизации фильтрами этих типов основан на механической задержке микроорганизмов, размер которых превышает диаметр пор. Поверхностные стерилизующие пластины не токсичны, не требуют предварительной отмывки; обеспечивают высокую скорость фильтрации сыворотки; при продолжительной фильтрации исключается размножение бактерий; в случае повышения давления более чем на 0,5 атм микроорганизмы, превышающие размеры пор, не проходят через фильтр. Диаметр их в зависимости от назначения варьирует в пределах 95—293 мм, размер пор стерилизующих пластин — 0,22 мкм.

Пластину закладывают между двумя плоскими из нержавеющей стали дисками с отверстиями, через которые поступает стерилизуемая сыворотка и оттекает фильтрат. Диски, как и при работе с глубинными фильтрами, по бокам скрепляют и закручивают барашками. Стерилизацию следует проводить в автоклаве при 121°С (1 атм) в течение 40 мин (порядок использования фильтров изложен в прилагаемых к ним инструкциях).

Комбинированные фильтры. Фильтры этого типа сочетают в себе положительные стороны глубинных и поверхностных стерилизующих пластин. В комбинированных фильтрах глубинные пластины, обладающие большой емкостью, служат в качестве префильтров. Затем ниже по направлению движения стерилизуемой сыворотки располагают комбинацию мембранных фильтров с крупными размерами пор (1,2; 0,8; 0,65; 0,45 мкм), которые, как и префильтры, предохраняют самую нижнюю стерилизующую пластину с размерами пор 0,1—0,22 мкм от забивания и преждевременной потери стерилизующей способности.

Стерилизующие установки фирмы «Миллипор» в зависимости от объема стерилизуемой сыворотки подразделяют на следующие разновидности: до 10 л, на 10—50 л, для 50 л и больше.

При стерилизации сыворотки объемом больше 10 л с целью повышения фильтрующей площади глубинный префильтр изготовлен в виде гильзы. На установках для стерилизации сыворотки больше 50 л предварительный фильтр «Миллигард» изготовлен из гофрированного эфирцеллюлозного материала, а стерилизующий фильтр сделан в виде патрона — все это в целом увеличивает площадь фильтрации.

Общим недостатком глубинных, ситовых и комбинированных фильтров является неспособность их полностью освобождать сыворотку от микроорганизмов, имеющих размер меньше 0,22 мкм. Для более полного удаления этих микроорганизмов сыворотку подвергают последовательной 2-кратной фильтрации с интервалом 2 нед.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агар глюкозо-кровяной 227
— дрожжевой 27
— картофельный 82
— кровяной 230
— молочно-солевой 228
— мясо-пептонный печеночно-глюкозо - глицериновый (МППГГА) 82
— печеночно-аминопептидный 85
— печеночно-глюкозо-глицериновый (ПГГА) 82
— плотный печеночно-сывороточный 85
— полужидкий печеночно-сывороточный 85
— полужидкий с дефибринированной кровью 248
— сывороточно-декстрозный 85
— шоколадный 239

Бульон глюкозо-сывороточный 227
— дрожжевой 27
— мясо-пептонный печеночный (МППБ) 82
— печеночно-глюкозо-глицериновый 82
— с желчью 10%-ный 186, 227
— 40%-ный 230

Вода мясная 82
— печеночная 82
Выбор питательных сред 271

Гель агаровый 1%-ный 31

Дезагрегация ткани 314

Жидкость Карнуа 309

Индикатор для определения анаэробных условий 39

Консервирующая смесь глицериновая 185
— — фосфатная буферная 185

Лизис желчью 225

Метод выявления капсулообразования 13, 14
— определения вирулентности сибиреязвенных культур 14
— флуоресцирующих антител (МФА) 180
Молоко с метиленовым синим 228
— с 0,02%-ным метиленовым синим 230

Обнаружение индола 217
Окраска мазков гематоксилин-эозином 309
— — по Козловскому 81
— — по методу Гинса 239
— — по Романовскому — Гимзе 309
— — по Стампу 81
— — по Фельгену 309
— — по Шуляку — Шину 82
Определение гемолитической активности 8
— концентрации углекислого газа 85

Получение и подготовка эритроцитов барана для постановки РСК и РДСК 86
Приготовление индикаторных бумажек 187

Раствор антибиотиков 272
— веронал-мединаловый буферный 329
— версена 282
— гидролизата лактоальбумина 0,5%-ный 283
— гидролизата мышечных белков 0,3%-ный 282
— глицерина 216
— двууглекислого натрия 282
— двухромовокислого калия 279
— полиэтиленгликоля 326
— Тироде 281
— трипсина 283
— уксусной кислоты 282

— физиологический хлорида натрия с добавлением ионов магния и кальция (для постановки РСК и РДСК) 86
— Хенкса 281
— хлорида натрия фенолезированные для РА 86
Реактив биуретовый 328
— йодистый калий 328
Реакция диффузной преципитации в геле 333
— с метилротом 218
— нейтрализации с целью выявления антител к вирусу инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи 332
— непрямой гемагглютинации (РПГА) 332
— преципитации 8
— связывания комплемента (РСК) 334
— торможения гемагглютинации (РТГА) 332
— Фогеса — Проскауэра 218
— Эрлиха 181
— метиленового синего 226

Среда Биттера с рамнозой 187
— водно-сывороточная 145
— дифференциальная висмут-сульфат-агар 186
— — Левина 186
— — Плоскирева 186
— — трехуглеводная с мочевиной 186
— — Эндо 186
— для обнаружения сероводорода 216
— для определения способности бактерий расщеплять мочевину 218
— для посева по Свену — Гарду 187
— Дюбуа — Смита 90
— Заксе 243
— Игла 282, 324
— из гидролизата мышцы сердца крупного рогатого скота 252
— из куриного мяса 260
— Кларка 218
— Клиглера 217
— комбинированная Олькеницкого 216
— Мартена 251, 260
— плотная ВИЭВ для изоляции кампилобактерий 125, 126
— сафранино-железо-новобиоциновая 123, 124
— Симмонса 216
— с лактозой 252
— с повышенным содержанием лактозы 187
— с теллуритом калия 228
— триптический перевар бычьего сердца 337
— Ферворта — Вольфа в модификации С. И. Тарасова 146
— Флетчера 146
— 6,5%-ного хлорида натрия 228
— Хоттингера 259
— Эдварда 258
— энтерококковая дифференциально-диагностическая 228
Среды индикаторные с амидочерным 168
— — с конгоротом 168
— — с лакмусом 167
— — с метилротом 167
— — с нейтральротом и метиленовой синью 167
— — обогащения Кауфмана 186
— — Киллиана 186
— — Мюллера 186
— — селенитовая 185
— плотные питательные 252

Тест «жемчужного ожерелья» 6,7
Фаготипирование 17—28
Экстракт дрожжевой 252
Эритрит-агар 85

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие 3
Методы диагностики бактериальных инфекций 5
Сибирская язва 5
Методические указания по лабораторной диагностике сибирской язвы 5
Методические указания по обнаружению возбудителя сибирской язвы в сырье животного происхождения и объектах внешней среды 9
Временное наставление по применению сибиреязвенного бактериофага «К» ВИЭВ для определения возбудителя сибирской язвы 17
Временное наставление по применению сибиреязвенного фага «Гамма-МВА» для определения возбудителя сибирской язвы 28
Временные методические указания по постановке реакции диск-преципитации при диагностике сибирской язвы и идентификации ее возбудителя 29
Наставление по исследованию кожевенного и мехового сырья на сибирскую язву реакцией преципитации 31
Эмфизематозный карбункул 37
Методические указания по лабораторной диагностике эмфизематозного карбункула 37
Злокачественный отек 40
Методические указания по лабораторным исследованиям на злокачественный отек животных 40
Брадзот овец 44
Методические указания по лабораторной диагностике брадзота овец 44
Инфекционная энтеротоксемия животных и анаэробная дизентерия ягнят 48
Методические указания по лабораторной диагностике инфекционной энтеротоксемии животных и анаэробной дизентерии ягнят 48
Столбняк 52
Методические указания по лабораторной диагностике столбняка 52
Ботулизм 53
Методические указания по лабораторной диагностике ботулизма 53
Некробактериоз 56
Методические указания по лабораторной диагностике некробактериоза 56
Копытная гниль овец и коз 58
Приложение к «Инструкции по профилактике и ликвидации копытной гнили овец и коз» 58

Временные методические указания по обнаружению возбудителя копытной гнили в патологическом материале от больных овец с помощью непрямого метода иммунофлуоресценции 59
Бруцеллез 60
Наставление по диагностике бруцеллеза животных . . . 60
Паратуберкулез 89
Наставление по диагностике паратуберкулезного энтерита (паратуберкулеза) крупного рогатого скота 89
Методика обнаружения в патологическом материале возбудителей туберкулеза и паратуберкулеза методом люминесцентной микроскопии 92
Временное наставление по постановке реакции связывания комплемента для диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота и овец с антигеном Сибирского научно-исследовательского ветеринарного института 94
Сап 104
Методические указания по лабораторной диагностике сапа 104
Кампилобактериоз (вибриоз) 112
Извлечение из временной инструкции по диагностике, профилактике и ликвидации вибриоза крупного рогатого скота и овец 112
Наставление по применению вибриозных агглютинирующих моноспецифических сывороток 116
Наставление по применению кампилобактериозных (вибриозных) люминесцирующих сывороток при лабораторной диагностике кампилобактериоза (вибриоза) животных 120
Рекомендации Центральной ветеринарной лаборатории по приготовлению и применению сафранино-жел зо-новобиоциновой среды (СЖН) при лабораторной диагностике вибриоза 123
Временные рекомендации Центральной ветеринарной лаборатории по приготовлению и применению плотной среды ВИЭВ для изоляции кампилобактерий 125
Наставление по применению кампилобактериозного (вибриозного) антигена для реакции агглютинации с вагинальной слизью (РАВС) 126
Лептоспироз 128
Методические указания по лабораторной диагностике лептоспироза животных 128
Методические указания по применению групповых агглютинирующих лептоспирозных сывороток 146
Методические указания по применению флуоресцирующего глобулина для диагностики лептоспироза 148
Листериоз 151
Наставление по лабораторной диагностике листериоза животных 151
Методические указания по применению набора лиофилизированных бактериофагов для идентификации возбудителя листериоза 169
Рожа свиней 170
Методические указания по лабораторным исследованиям на рожу свиней 170
Наставление по применению сухих рожистых люминесцирующих сывороток (для прямого метода иммунофлуоресценции) 173

Пастереллез 175
Наставление по лабораторной диагностике пастереллеза птиц 175
Сальмонеллезы 177
Методические указания по бактериологической диагностике сальмонеллезов животных 177
Наставление по применению наборов сывороток сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих для экспресс-идентификации сальмонелл в РА на стекле 192
Наставление по применению комплексной и групповых сальмонеллезных флуоресцирующих сывороток (для прямого метода иммунофлуоресценции) 195
Временная методика серологической диагностики сальмонеллеза овец в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА) 205
Наставление по применению серогрупповых антигенов и сывороток B, C_1 и D_1 для диагностики сальмонеллеза в пробирочной реакции агглютинации (РА) 207
Колибактериоз 209
Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных 209
Наставление по применению агглютинирующих О-колисывороток 218
Диплококковые заболевания 221
Методические указания по лабораторным исследованиям на пневмококковую (диплококковую) инфекцию животных 221
Стрептококкозы сельскохозяйственных животных 224
Методические указания по лабораторной диагностике стрептококкоза животных 224
Методические указания по лабораторной диагностике стрептококковой септицемии птиц 228
Методические указания по лабораторной диагностике стрептококкового полиартрита ягнят 230
Методические указания по лабораторной диагностике мыта 233
Псевдомоноз 235
Временное наставление по применению набора О-агглютинирующих сывороток для диагностики псевдомоноза 235
Гемофилезы 237
Временные методические указания по лабораторной диагностике гемофилезного полисерозита свиней 237
Временные методические указания по лабораторной диагностике гемофилезной плевропневмонии свиней 240
Методические указания по лабораторной диагностике контагиозного метрита лошадей 243
Микоплазмозы 248
Методические указания по лабораторной диагностике инфекционной агалактии овец и коз 248
Методические указания по лабораторной диагностике инфекционной плевропневмонии коз 253
Наставление по диагностике респираторного микоплазмоза птиц 257
Реакция агглютинации для диагностики респираторного микоплазмоза птиц с цельной кровью (ККРА) и сывороткой крови (СКРА) 264

Наставление по постановке РСК при перипневмонии крупного рогатого скота 265
Дизентерия свиней 268
Методические указания по лабораторным исследованиям на дизентерию свиней, вызываемую трепонемой 268
Методические указания по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных 270
Методические указания по применению культур клеток в диагностических исследованиях 279
Методические рекомендации по получению, культивированию и использованию в научных и производственных ветеринарных лабораториях первичных, перевиваемых и диплоидных культур клеток животного происхождения 279
Наставление по применению гидролизата мышечных белков ферментативного сухого (ФГМ-С) для питательных сред тканевых культур 298
Рекомендации по профилактике, диагностике контаминирования культур клеток микроорганизмами и меры по их деконтаминации 299
Методические указания по получению и применению в вирусологической практике перевиваемых линий клеток из лимфоидных органов крупного рогатого скота и почек теленка 314
Методические рекомендации по очистке сыворотки крови крупного рогатого скота, используемой для культивирования клеточных культур 326
Временное наставление по получению, контролю и использованию сыворотки крови животных для культивирования клеток и вирусологических исследований 337
Предметный указатель 347

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ:
Бактериальные инфекции

Составители: *Борис Иванович Антонов, Валерия Валентиновна Борисова, Галина Михайловна Волкова* и др.

Заведующий редакцией *В. Г. Федотов.* Редактор *В. Н. Сайтаниди.* Художник *А. И. Бершачевская.* Художественный редактор *М. Д. Северина.* Технический редактор *Е. В. Соломович.* Корректоры *Н. Я. Туманова, Т. Н. Бобрикова, М. В. Писарева*

ИБ № 4308

Сдано в набор 13.06.85. Подписано к печати 06.12.85. Т-22156. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага тип. № 3. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 18,48. Усл. кр.-отт. 18,48. Уч.-изд. л. 27,27. Изд. № 360 Тираж 29000 экз. Заказ № 419 . Цена 1 р. 40 к.

Ордена Трудового Красного Знамени ВО «Агропромиздат», 107807, ГСП, Москва, Б-53, ул. Садовая-Спасская, 18

Набрано в ордена Октябрьской Революции и ордена Трудового Красного Знамени МПО «Первая Образцовая типография имени А. А. Жданова» Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли: 113054, Москва, Валовая, 28

Отпечатано с матриц во Владимирской типографии Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 600000, г. Владимир, Октябрьский проспект, д. 7.

gost.e-ecolog.ru