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.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПОЛУЧЕНИЮ И ПРИМЕНЕНИЮ В ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК ИЗ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ПОЧКИ ТЕЛЕНКА

(Согласованы с Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 27 декабря 1976 г.)

1. Определение.

Культуры клеток, которые неопределенно долгое время могут размножаться вне организма, получили название перевиваемых. Перевиваемые линии клеток широко применяются в вирусологических, цитологических и биохимических исследованиях. Простота манипуляций с клетками перевиваемых линий и относительная стандартность являются предпосылкой широкого использования их в вирусологии.

Для получения монослойных культур из перевиваемых линий клеток требуется меньше времени, средств и труда по сравнению с приготовлением первичных культур из различных тканей животных. Для приготовления первично-трипсинизированных культур необходимо каждый раз брать ткань от животного. Клетки перевиваемых линий могут постоянно храниться в лаборатории в виде матричных культур, из которых легко получить культуры в больших количествах. Кроме того, они однородны по клеточному составу и имеют большой спектр чувствительности. Перевиваемые клетки чаще, чем первичные культуры, используются для выделения вирусов из материалов, загрязненных микрофлорой, поскольку они лучше переносят высокие концентрации антибиотиков.

Значительный интерес для теории и практики представляет получение и изучение длительно живущих культур клеток из лимфоидных тканей животных.

В 1971—1975 гг. в лаборатории культур тканей ВИЭВ получены перевиваемые линии клеток из тимуса эмбриона коровы (ТЭК), тимуса теленка (КТТ), почки теленка (ПТ) и один штамм клеток из селезенки эмбриона коровы (СЭК) (табл. 1).

2. Получение первичной суспензии клеток из лимфоидных органов и первичной культуры.

2.1. *Ткани.* В качестве исходных тканей используют тимус и селезенку 4—5-месячных эмбрионов коровы; тимус и почки теленка 4—6-месячного возраста.

2.2. *Дезагрегация ткани.* Для создания первичных культур собирают клетки, полученные путем вымывания из измельченной ткани, а также в процессе трипсинизации. Для механического вымывания кле-

1. Характеристика основных свойств перевиваемых линий и штамма клеток, полученных из органов крупного рогатого скота

Название культуры	Исходная ткань	Вид животного	Тип клеток	Метод выращивания	Питательная среда
ТЭК	Тимус эмбриона коровы, нормальная	Крупный рогатый скот	Эпителиоподобные	В монослое	Игла с 10% сыворотки КРС
КТТ	Тимус теленка, нормальная	То же	То же	То же	То же
СЭК	Селезенка эмбриона коровы, нормальная	»	Фибробластоподобные	»	»
ПТ	Почка теленка, нормальная	»	Эпителиоподобные	»	0,5%-ный гидролизат лактальбумина в растворе Хенкса с 10% сыворотки

ток из измельченной ткани к тканевым кусочкам добавляют раствор Хенкса, колбу ставят для перемешивания на магнитную мешалку и оставляют до помутнения раствора Хенкса. Затем суспензию клеток в растворе Хенкса сливают в центрифужные стаканы и клетки осаждают центрифугированием при 1000 об/мин 10 мин. Такую процедуру повторяют 2—3 раза. К оставшейся ткани добавляют раствор трипсина.

Трипсинизацию лимфоидной ткани проводят дробно с помощью 0,25%-ного раствора трипсина на магнитной мешалке при 37°С. Раствор трипсина добавляют к ткани в соотношении 10 : 1. Продолжительность одного цикла трипсинизации 15—20 мин. Суспензию клеток в трипсине с сывороткой (3%) центрифугируют при 1000 об/мин. Клеточный осадок ресуспендируют в среде Игла с 10% сыворотки. Посевная концентрация должна составлять $2—4 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл среды.

Трипсинизацию почечной ткани проводят по общепринятой методике. Посевная концентрация клеток из почечной ткани должна составлять $4—5 \cdot 10^5$ в 1 мл. Полученную суспензию разливают в пробирки по 1,5—2 мл, в 50-миллилитровые флаконы — по 10 мл, в 250-миллилитровые матрасы — по 30, в 500-миллилитровые — по 60, в литровые — по 100 и в 1,5-литровые матрасы — по 200 мл. На вторые сутки после засева отмечают рост клеток и в это время производят смену питательной среды. Сплошной слой клеток при нормальном росте из лимфоидной ткани образуется на 4—5-й день, а из почечной ткани — на 5—6-й день.

2.3. *Среды.* Для культивирования клеток тимуса эмбриона коровы и теленка, селезенки эмбриона коровы используют среду Игла (прило-

жение 2), а для клеток почки теленка — 0,5%-ный гидролизат лактальбумина в растворе Хенкса (ГЛА). К указанным средам добавляют 10% сыворотки крупного рогатого скота и антибиотики (пенициллин, стрептомицин, канамицин по 100 ЕД/мл); pH при посадке первичных клеточных суспензий — 6,9—7,0; при пересевах перевиваемых клеточных культур — 7,1—7,2; при смене среды — 7,3—7,4.

2.4. *Цитологические исследования.* Для морфологических исследований культуры клеток выращивают на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах, в каждый флакон вносят по 2 мл клеточной суспензии. Через 1, 2, 3 сут и более стеклышки с культурами извлекают из флаконов, промывают в растворе Хенкса и фиксируют в жидкости Буэна для окраски гематоксилинэозином и метиловым спиртом при окрашивании по Романовскому—Гимзе.

3. Получение перевиваемых линий клеток.

3.1. *Перевиваемая линия клеток из тимуса эмбриона коровы (ТЭК).* Полученную первичную культуру клеток ТЭК подвергают длительному субкультивированию.

Субкультура имеет смешанную клеточную популяцию, состоящую из эпителио- и фибробластоподобных элементов с преобладанием последних. Эпителиоподобные клетки растут колониями, равномерно распределенными по всей площади матраса. Образование колоний эпителиоподобных клеток отмечают в первых четырех пассажах, причем их количество с каждым последующим пассажем увеличивается. В дальнейшем происходит смешивание эпителиоподобных и фибробластоподобных элементов.

В течение последующих пассажей скорость размножения эпителиоподобных клеток резко возрастает, и морфологический состав культур претерпевает изменения. К 30-му пассажу эпителиоподобные клетки полностью вытесняют ранее преобладавшие фибробластоподобные элементы. За 4-летний срок культивирования клетки ТЭК пассируются более 100 раз.

3.2. *Перевиваемая линия клеток тимуса теленка (КТТ).* Для получения линии КТТ используют первичную культуру клеток тимуса теленка, выращенную в матрасе Ру. В течение 25 дн. после трипсинизации тимусной ткани клетки выдерживают в термостате, производя смену питательной среды через каждые 4—5 дн. В течение этого срока значительная часть клеток первичной культуры подвергается дегенерации (в основном фибробластоподобные клетки). Сохраняется только небольшая часть эпителиальных клеточных колоний. Размеры колоний постепенно увеличиваются, достигнув спустя 14 дн. 1—2 см. При малом увеличении микроскопа (ок. 7, об. 10) можно видеть, что колонии состоят из нескольких слоев клеток. После снятия колоний смесью версена с трипсином клетки пересевают в матрас Повитской емкостью 100 мл, в котором уже через 6 дн. они образуют монослойную культуру. При последующих пересевах монослой формируется на 3—4-й день. Культура КТТ — эпителиоподобного типа. Линия клеток КТТ пассируется в течение 3 лет более 90 раз.

3.3. *Штамм клеток селезенки эмбриона коровы (СЭК).* Способ получения СЭК такой же, что и ТЭК. На вторые сутки выращивания клеток происходит формирование рыхлого слоя фибробластоподобных клеток. К 3—4-м сут в культурах формируется плотный монослой. Коэффициент пересева культуры 1 : 2. На всем протяжении культивирования ростовые свойства клеток сохраняются на одинаковом уровне. За 10 мес

штамм клеток СЭК перевит 36 раз. В течение этого времени культура представлена исключительно фибробластоподобными элементами.

3.4. *Перевиваемая линия почечных клеток теленка (ПТ).* Первичная культура представлена полиморфными клетками. По мере пассирования в культуре происходит стабилизация морфологии клеток фибробластоподобного типа. Для клеток этого типа характерно группирование в ориентированные комплексы. Границы клеток отчетливо выражены, ядра округлой или овальной формы, содержат 2—4 ядрышка. В первых 25 пассажах рост клеток энергичный, формирование монослоя происходит на 4—5-е сут. Рост клеток в последующих пассажах замедленный, монослой формируется на 8—10-е сут. Через 17 мес наблюдается морфологическая трансформация культуры: если первоначально культура представлена в основном клетками фибробластоподобного типа, то в дальнейшем в ней превалируют клетки эпителиоподобного типа, что совпадает со значительным увеличением скорости роста культур. Эта линия за 5 лет пассируется более 90 раз.

4. Условия культивирования перевиваемых линий клеток.

Работу с культурами клеток проводят в специальных помещениях (стерильных комнатах), изолированных от всех других, где работают с вирусами. В процессе работы следует строго соблюдать правила асептики. При одновременной работе с различными линиями клеток принимают меры для предотвращения перекрестной контаминации одной линии клеток другой. Поддержание клеток перевиваемых линий достигается периодическими пассажами. В процессе многократных перевивок не исключена возможность загрязнения культур бактериями, микоплазмами и грибами, что может привести к потере клеточных линий. Поэтому при работе с перевиваемыми клеточными линиями необходимо тщательно контролировать стерильность питательных сред, раствора и особенно сыворотки.

Необходимо проводить контроль каждой новой серии сыворотки на бактериологическую и микоплазменную контаминацию и биологическую активность. Контроль биологических свойств сыворотки проводят на перевиваемой культуре клеток почки теленка (ПТ).

Клеточную суспензию готовят на 0,5%-ном гидролизате лактальбумина в растворе Хенкса с 10% испытуемой сыворотки крупного рогатого скота (pH 7,1—7,2). Параллельно эту же клеточную суспензию высевают с проверенной сывороткой. Концентрация клеток составляет $10 \cdot 10^4$ в 1 мл. Суспензию клеток высевают в три 0,1-литровых матраса по 15 мл в каждый.

Сыворотку считают пригодной для работы, если монослойная культура формируется на 3—4-е сут культивирования во всех матрасах.

Все среды, растворы, сыворотки и клеточные культуры, оказавшиеся нестерильными по результатам исследований, признаются негодными и из работы исключаются. Все имеющиеся в лаборатории культуры необходимо регулярно проверять на наличие микоплазм.

В настоящее время наиболее распространенным способом культивирования перевиваемых клеток является метод выращивания их на поверхности стекла. Обычно для поддержания матричных культур, т. е. для размножения клеток в больших количествах, используют матрасы различной емкости (от 100 мл до 1—1,5 л).

Полноценная популяция может быть получена только от культуры, состоящей из жизнеспособных клеток. Поэтому просмотр и оценка качества монослоя имеют решающее значение при выборе культур для пе-

рсева. О характере роста в матрасах (пробирках) судят на основании просмотра их под малым увеличением микроскопа (ок. 7, об. 10).

При хорошем состоянии культуры между клетками четко различаются границы, а сами клетки имеют типичную для данной культуры морфологию. Наличие в поле зрения большого количества округленных клеточных элементов, появление клеток с вакуолями, включениями и другими признаками цитопатологии делают данную культуру непригодной для пассажа.

Морфологическая картина перевиваемой культуры ТЭК и КТТ имеет сходный характер. Клетки плотно прилегают друг к другу, образуя пласт. Форма клеток — полигональная с эксцентрично расположенным ядром. Обе культуры (КТТ и ТЭК) представлены клетками эпителиоподобного типа. Соотношение ядра и цитоплазмы в клетках 1 : 2—1 : 3. Ядро имеет овальную или круглую форму. Хроматин — мелкосетчатой структуры, внутри ядра находятся 2—3 ядрышка неправильной формы. Изредка встречаются клетки большого размера с очень крупным ядром.

В перевиваемой культуре ПТ клетки однородны, преимущественно полигональной формы, с хорошо выраженными границами, крупнее клеток КТТ и ТЭК.

Цитоплазма мелкозернистая, реже имеет зернисто-сетчатый вид. Вакуолизация цитоплазмы встречается крайне редко. Ядра — овально-округлые, разной величины, с 2—5 ядрышками. Перевиваемая линия клеток ПТ эпителиоподобного типа.

Штамм СЭК представлен фибробластоподобными клетками вытянутой формы и располагающимися в виде правильно ориентированных тяжей, плотно прилегающих друг к другу. Ядра клеток овальные, разного размера, с 2—3 ядрышками.

На случай загрязнения перевиваемых культур необходимо иметь в запасе резервные (дубликаты) культуры, которые сохраняют при комнатной температуре, в рефрижераторе, в термостате и в условиях жидкого азота (минус 196°С). Пересевы клеток осуществляют после образования сплошного слоя через каждые 3—4 дня. Для этого из матрасов с выросшим монослоем клеток удаляют питательную среду, в них вносят подогретую до 36°С смесь растворов версена (0,02%) с трипсином (0,25%) в соотношении 9 : 1 и помещают в термостат на 5—10 мин при 37°С, за это время матрасы несколько раз слегка покачивают.

Количество добавляемой в сосуд смеси раствора версена с трипсином зависит от площади поверхности, на которой выращены клетки. Смеси раствора версена с трипсином наливают: в 1,5-литровый матрас — 80 мл, в литровый — 50, в 0,5-литровый — 30, в 0,25-литровый — 20, в 0,1-литровый матрас — 10 мл.

Раствор версена связывает двухвалентные катионы магния и кальция, трипсин расщепляет межклеточное вещество, в результате чего пласт клеточной культуры разделяется на отдельные клетки и отслаивается от стекла.

Существуют два метода отделения клеток от диспергирующего раствора — центрифужный и бесцентрифужный.

Центрифужный метод. Как только клетки в результате воздействия диспергирующего вещества начнут отделяться от стекла и переходить в среду, матрас осторожно встряхивают, и клетки полностью отслаиваются от стекла.

Для того чтобы прекратить действие версена и трипсина на клетки, к суспензии добавляют 2—3% сыворотки крупного рогатого скота. Взвесь клеток помещают в центрифужные стаканы и центрифугируют при 800—

1000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадки клеток ресуспендируют в небольшом количестве питательной среды. Затем берут 1 мл клеточной суспензии и подсчитывают клетки.

Бесцентрифужный метод в настоящее время при работе с клеточными культурами широко используется.

В матрасы с монослоем клеток вносят диспергирующий раствор (смесь версена с трипсином), помещают на короткое время (5 мин) в термостат и, как только небольшая часть клеток начнет отслаиваться от стекла, матрасы осторожно переворачивают так, чтобы клеточный пласт находился вверху. Через 3—5 мин основную часть (90—95%) этого раствора сливают.

Во время слива диспергирующий раствор должен находиться на свободной от клеток поверхности. С целью отделения клеток от стекла матрасы энергично встряхивают и к полученной суспензии добавляют небольшое количество свежей питательной среды без сыворотки; матрасы еще раз встряхивают и берут пробу для подсчета общего количества клеток.

Затем к 1 мл пробы суспензии клеток добавляют 1 мл раствора краски (0,1%-ный раствор кристаллвиолета на 0,1 н. растворе лимонной кислоты) и подсчитывают клетки в камере Горяева.

Состав краски для окрашивания клеток в суспензии: кристаллвиолет — 100 мг, лимонная кислота — 1,92 г, вода бидистиллированная — до 100 мл.

Подсчитывают только клетки с хорошо выраженным ядром и неповрежденной цитоплазмой. Конгломераты клеток, количество которых четко не выражено, принимают за одну клетку. Когда концентрация клеток в суспензии большая и подсчет затруднен, суспензию предварительно разводят питательной средой до удобной концентрации. Подсчет производят под микроскопом (ок. 7, об. 20) по всей площади камеры, четырехкратно, каждый раз заряжая камеру вновь, причем во внимание берут только те клетки, которые расположены в камере в границах, очерченных сеткой (225 больших квадратов).

Число клеток в 1 мл среды определяют по формуле

$$X = \frac{a \cdot 1000 \cdot 2}{0{,}9},$$

где X — число клеток в 1 мл; a — среднее число клеток в 4 пробах; 0,9 — объем камеры Горяева, мм^3; 2 — коэффициент разведения суспензии раствором красителя; 1000 — число кубических миллиметров в 1 см^3.

Для упрощения подсчета среднее количество клеток в одной сетке умножают на 2200. Если суспензия предварительно разводилась 2, 3 или 5 раз, число клеток в камере умножают на разведение, а затем на 2200.

Например, если среднее количество клеток в камере 140, суспензия предварительно была разведена тремя объемами среды, то $140 \times 3 = 420$; $420 \times 2200 = 924\,000$ клеток в 1 мл. Для дифференцированного подсчета живых и мертвых клеток применяют 0,5%-ный водный раствор трипановой сини. При этом методе живые клетки не окрашиваются, а мертвые окрашиваются в синий цвет.

После подсчета суспензию клеток дополнительно разводят до нужной посевной концентрации в 1 мл среды. Например, 15 мл суспензии (в каждом миллилитре по 924 000 клеток) необходимо развести до концентрации 50 000 в 1 мл. Общее количество клеток — $924\,000 \times 15 =$

=13 860 000. Необходимо знать, во сколько раз нужно развести питательной средой суспензию: 13 860 000 : 50 000=277 раз.

Для этого объем суспензии доводят питательной средой до 15× ×277=4 л 155 мл. Таким образом получаем общий объем суспензии, равный 4 л 155 мл, и каждый миллилитр такой суспензии будет содержать 50 000 клеток.

В соответствии с результатами подсчета общий объем суспензии доводят до требуемой концентрации клеток добавлением той же питательной среды. При этом учитывают добавление к общему объему среды стерильной сыворотки крупного рогатого скота в количестве 10%, прогретой при 56°С в течение 30 мин. Во все питательные среды и растворы при пересевах необходимо добавлять антибиотики: пенициллина и стрептомицина по 100 ЕД/мл, можно использовать канамицин, линкомицин, тилан по 100 ЕД/мл.

При выращивании культур в пробирках концентрация клеток в суспензии должна быть $10 \cdot 10^4$ в 1 мл. При засеве суспензии в пробирки содержимое колбы необходимо постоянно перемешивать с помощью пипетирования или периодическим встряхиванием вручную, чтобы поддерживать равномерную концентрацию клеток. После внесения в пробирки по 1 мл взвеси их плотно закрывают резиновыми пробками, укладывают в лоток в слегка наклонном положении (под углом 5°) пробкой вверх и помещают в термостат.

Для посева в матрасы используют суспензию с концентрацией клеток $5 \cdot 10^4$ в 1 мл. Матрасы укладывают на полки термостата в горизонтальном положении. Важно, чтобы пробки плотно закрывали матрасы и пробирки, иначе за счет поступления воздуха извне произойдет сдвиг pH среды в щелочную сторону. Последнее обстоятельство неблагоприятно сказывается на росте клеток.

На одной из сторон матрасов (пробирок) делается отметка (карандашом по стеклу) о их верхней поверхности. Культуры клеток выращивают при температуре 37°С в стационарных условиях.

Полученные перевиваемые культуры растут без смены питательной среды.

Клетки, осев на поверхности стекла, прикрепляются к нему в течение 3—4 ч.

При просмотре пробирок под микроскопом на другой день можно наблюдать образование островков в результате размножения прикрепившихся клеток. Размеры островков постепенно увеличиваются, далее они сливаются, образуя сплошной слой. Выращивание клеток продолжается в течение 3—4 дн., после чего культура клеток может быть использована для очередного пассажа и для вирусологических работ.

При использовании клеточной культуры для работы с вирусами из матрасов и пробирок удаляют ростовую питательную среду и заменяют ее поддерживающей средой, не содержащей сыворотки.

При поддерживании матричной культуры пересев производят не менее чем в 2 матраса. Один из них служит для последующего пассажа, а второй сохраняют до тех пор, когда в пассажных культурах будет установлен удовлетворительный рост. При обнаружении неравномерного, недостаточного роста, а также дегенеративных изменений в клетках такие культуры выбраковывают.

Наибольшая митотическая активность перевиваемых клеточных культур приходится через 24—48 ч культивирования, к этому времени она составляет для культур ТЭК, КТТ и ПТ 30—40%, а для культуры СЭК — 12—16%. Индекс пролиферации клеток тимуса и почки равен 4—6, а клеток селезенки — 2—3.

Ввиду сходной пролиферативной активности разных линий клеток для получения новых расплодок используют при посадке примерно равные количества клеток. Так, в 1,5-литровые матрасы высевают 8 млн.; литровые — 6; 0,5-литровые — 4; 0,25-литровые — 2 и 0,1-литровые — 1 млн. клеток.

Коэффициент пересева клеточных линий 1 :-4—1 : 6, а штамма СЭК — 1 : 2—1 : 3. Клетки, снятые с одного матраса, рассевают на 4—6 аналогичных матраса для культур ПТ, ТЭК и КТТ и на 2—3 матраса для культуры СЭК. С одного литрового матраса Ру получают урожай клеток 28—35 млн. для культуры ТЭК, КТТ и ПТ и 10—15 млн. для культуры СЭК.

При длительном культивировании не установлено изменений в морфологии клеток, пролиферативной активности и чувствительности к различным вирусам.

Клетки линий ТЭК и КТТ размножаются в суспензионном состоянии на магнитной мешалке и роллерных устройствах, клеточные культуры ПТ, КТТ и ТЭК имеют гетероплоидный набор хромосом, а штамм СЭК — *диплоидный набор хромосом.*

5. Хранение клеточных культур в условиях термостата при 37°С.

Все полученные перевиваемые культуры клеток сохраняются длительное время при температуре 37°С. Для хранения отбирают матрасы с наиболее качественным монослоем клеток, ставят в термостат и меняют среду через 6—10 дн. Таким способом можно сохранять монослойные культуры тимусных и почечных клеток в течение 8—10 нед; клетки СЭК — 3—4 нед.

6. Хранение клеточных культур при комнатной температуре (18—20°С).

Матрасы с хорошим монослоем клеток помещают при комнатной температуре. Смену среды в них производят через 8—10 дн. Культуру клеток сохраняют в этих условиях в течение 2—3 мес. Для дальнейшего культивирования этих культур при 37°С в них производят смену среды и помещают на 1—2 дня при 37°С для адаптации, а затем культуры клеток пересевают обычным способом.

7. Хранение клеточных суспензий при температуре рефрижератора (4—6°С).

Берут клеточную суспензию с концентрацией $2—5 \cdot 10^5$ в 1 мл и помещают в рефрижератор. При хранении используют те же среды с сывороткой, что и при выращивании монослойных культур. Клетки ТЭК, КТТ и ПТ сохраняют жизнеспособность в течение 15 дн. хранения, а клетки СЭК — в течение 6 дн.

8. Хранение клеточных суспензий в жидком азоте (минус 196°С).

Монослойные культуры клеток, выращенные в матрасах, просматривают под малым увеличением микроскопа и отбирают те из них, которые находятся в хорошем морфологическом состоянии. Пласт клеток снимают, используя смесь растворов версена и трипсина в соотношении 9 : 1. Отслоившиеся клетки центрифугируют при 1000 об/мин 10 мин.

Клеточный осадок суспендируют в сыворотке крупного рогатого скота (90%) с диметилсульфоксидом (10%). Суспензию клеток доводят консервирующей средой до концентрации $5—10 \cdot 10^6$ в 1 мл. Взвесь клеток разливают в 5-миллилитровые ампулы по 3 мл с соблюдением стерильности. Ампулы запаивают над пламенем газовой горелки и держат в рефрижераторе при 4°С в течение 1—2 ч (для контакта клеток с консервантами — процесс эквилибрации). Охлаждение ампул от 10 до ми-

нус 70°С проводят в смеси сухого льда со спиртом, контролируя понижение температуры по показаниям низкотемпературного термометра.

Замораживание суспензий перевиваемых линий клеток осуществляют по двухступенчатому режиму понижения температуры от 0 до минус 30°С со скоростью 1°С в мин; от минус 30°С до минус 70°С со скоростью 4—6°С в мин. Охлажденные до минус 70°С ампулы с суспензией клеток помещают на хранение в сосуды Дьюара с жидким азотом в специальных кассетах. Если ампулы хранятся в сосудах Дьюара емкостью 20 л, то в них производят доливку жидкого азота через 2 нед, а 30-литровые сосуды Дьюара заправляют жидким азотом через каждые 3 нед.

Через 2—3 года хранения (срок наблюдения) в жидком азоте клетки сохраняют исходные морфологические и культуральные свойства, а также чувствительность к вирусам.

Образцы замораживаемых суспензий должны быть проверены на бактериальную, грибковую и микоплазменную контаминацию. На бактериальную контаминацию пробу суспензии высевают на МПА и МПБ по одной пробирке. На грибковую контаминацию пробу суспензии высевают на среду (агар) Сабуро в одну пробирку. На микоплазменную контаминацию пробу суспензии высевают на полужидкий агар (0,3%-ный) на триптическом переваре бычьего сердца с 10% сыворотки лошади (крупного рогатого скота), 10% дрожжевого экстракта и 100 ЕД/мл пенициллина в две пробирки и контролируют в течение 3 пассажей на этой среде. Посевы на МПА и МПБ выдерживают в течение 10 сут при 37°С, на полужидком агаре — 14 дн. при 37°С, на среде Сабуро — 15 дн. при комнатной температуре (20—22°С). В случае наличия одного из контаминантов партию суспензии бракуют и уничтожают.

В случае необходимости ампулы с замороженными клеточными суспензиями извлекают из сосудов Дьюара и для оттаивания помещают в водяную баню с температурой 37°С. Оттаянную суспензию клеток переносят из ампул в матрасы, в которые вносят небольшое количество ростовой среды. Одновременно производят подсчет клеток в камере Горяева с витальным красителем (трипановой синью) и концентрацию клеток доводят средой до $10 \cdot 10^4$ в 1 мл.

Например, объем суспензии 20 мл, концентрация клеток в 1 мл — 750 000, т. е. в 20 мл содержится 15 млн. клеток. Для того чтобы конечная концентрация клеток в суспензии составляла 100 000 в 1 мл, объем суспензии доводят питательной средой с сывороткой до 150 мл. Это количество суспензии разливают по 100 мл в матрас Ру емкостью 1 л и по 50 мл в матрас емкостью 0,5 л.

Через сутки роста клеток в матрасах производят смену среды для удаления криозащитного вещества. Монослой клеток формируется на 3—4-е сут. В дальнейшем проводят пассирование восстановленных клеточных культур.

9. Транспортировка культур клеток.

В настоящее время образцы перевиваемых культур клеток перевозят на большие расстояния. Наиболее опасны при перевозке клеток резкие колебания температуры. В зависимости от времени года клеточные культуры необходимо транспортировать в условиях, исключающих замерзание или перегревание. Желательно культуры в пути сохранять при 4—6°С, допускается транспортировка их при комнатной температуре (18—22°С). Клеточные культуры при комнатной температуре сохраняются в течение 3—5 дн.

Клетки могут транспортироваться как в виде суспензии, так и в виде монослоя на стекле.

Клеточную суспензию с концентрацией $1—2 \cdot 10^5$ в 1 мл помещают в пробирку в количестве 10 мл. Пробирку герметично закрывают резиновой пробкой, заклеивают лейкопластырем, обертывают ватой и бумагой и в таком виде транспортируют. В процессе транспортировки клетки могут выделять в среду цитотоксины, поэтому такую суспензию при доставке в лабораторию необходимо отцентрифугировать при 1000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок клеток разводят в свежей питательной среде того же состава (10 мл) с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Суспензию высевают в 100-миллилитровый флакон и помещают на культивирование в термостат при 37°С.

Монослойную культуру лучше транспортировать в матрасах емкостью 50—100 мл. Матрасы с выросшей культурой заливают свежей питательной средой с сывороткой (10%) до горлышка, плотно закрывают резиновой пробкой и заклеивают лейкопластырем.

При транспортировке клеточных культур необходимо стремиться к быстрой доставке (в течение 2—3 дн.) их в пункт назначения.

При поступлении перевиваемых клеточных культур в лабораторию делается расплодка их в 5—6 матрасах. Часть клеток снимают с матрасов и закладывают на хранение в ампулах в жидкий азот (минус 196°С), в 2—3 матрасах культуры пассажируют при 37°С.

Если по каким-то причинам в течение 2—3 нед своевременный пересев провести нельзя, то в этом случае клеточные культуры, выращенные в матрасах, помещают на хранение при комнатной температуре или в рефрижератор (2—4°С). Клетки можно транспортировать также после глубокого замораживания в жидком азоте (минус 196°С) в сосуде Дьюара.

10. Чувствительность перевиваемых линий к различным вирусам. Указанные культуры чувствительны к вирусам ящура, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, болезни Ауески и бычьего герпеса. Для этих целей испытаны как нативные, так и культуральные вирусы. Все вирусы хорошо пассируются в этих культурах. Результаты цитоморфологических и вирусологических исследований показывают следующее.

10.1. *Вирус ящура.* Через 6 ч после заражения культуры клеток СЭК нарушается целостность клеточного монослоя, появляются клетки округлой формы. К 10 ч в инфицированных клетках наблюдается интенсивный распад цитоплазмы и ядра. Через 20 ч в культуре отмечают цитоплазматические тяжи, «голые» ядра. К 28 ч отмечают полное отслоение клеток от стекла.

Морфологические изменения, развивающиеся в клетках ТЭК под действием вируса, наступают позднее. Полное разрушение монослоя происходит через 36 ч. В культуре ТЭК и СЭК вирус размножается и накапливается в титре 3,0—4,0 lg $ТПД_{50}$/мл.

10.2. *Вирус инфекционного ринотрахеита.* Цитопатическое действие вируса обнаруживается в культурах через 18—24 ч. Проявляется оно в виде округления клеток и скопления их в группы. Полная гибель клеток отмечается к 60—96 ч. Титр вируса при размножении в этих культурах (ТЭК, СЭК, КТТ и ПТ) достигает 4,0—6,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

10.3. *Вирус болезни Ауески.* Вирус размножается в перевиваемых культурах ТЭК, СЭК, КТТ, ПТ и вызывает однотипные морфологические изменения, которые выражаются в появлении гроздьевидных скоплений округлившихся клеток. К 24—36 ч наступает полная деструкция клеток. В клетках почечной и лимфоидной тканей вирус хорошо размножается без предварительной адаптации. При серийном пассиро-

вании вирус хорошо размножается в культуре клеток (всех линий) и накапливается в титре 5,0—6,5 lg $ТЦД_{50}$/мл.

10.4. *Вирус бычьего герпеса.* В перевиваемых культурах ТЭК и СЭК вирус бычьего герпеса, размножаясь, вызывает частичное цитопатическое действие.

На культуре ТЭК цитопатическое действие вируса наступает на 4—6-е сут после заражения в виде мелкого округления клеток на поверхности монослоя. Постепенно округлых клеток становится все больше, и монослой в отдельных участках разрушается. Через 8—10 сут половина клеток дегенерирует. Оставшиеся участки клеток в течение 20 дн. (срок наблюдения) не подвергаются дегенерации.

Титр вируса, размноженного в культуре ТЭК, составляет 3,36—4,2 lg $ТЦД_{50}$/мл. Аналогичные изменения под действием вируса наступают в культуре клеток СЭК.

11. Новые перевиваемые культуры клеток (ТЭК, КТТ, СЭК, ПТ) рекомендуются для практического использования в вирусологических исследованиях в научных учреждениях и производственных лабораториях.

12. Клеточные культуры будут выдаваться по требованию из лаборатории культур тканей и питательных сред ВИЭВ (адрес: 109472, Москва, Кузьминки, ВИЭВ, лаборатория культур тканей и питательных сред).

13. При получении на каждую культуру выдается паспорт (см. приложение 1), в котором будут перечислены основные свойства и условия культивирования линий клеток.

Приложение 1

ЛАБОРАТОРИЯ КУЛЬТУР ТКАНЕЙ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ВИЭВ

ПАСПОРТ

на перевиваемую линию (штамм) клеток

1. Место, время получения, автор и название линии (штамма)
2. Пассаж
3. Питательная среда и pH среды при пересевах
4. Снятие клеток производят
5. Индекс пролиферации
6. Коэффициент пересева
7. Время образования монослоя
8. Кариологическая характеристика культуры
9. Проверка туморогенных свойств клеток на сирийских хомячках
10. Размножение клеток в суспензии
11. Чувствительность культур клеток к вирусам
12. Морфология культуры клеток

Зав. лабораторией
культур тканей и питательных сред ВИЭВ

Приложение 2

Пропись основной среды Игла

(производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов)

Компоненты среды	мг/л
Соли	
NaCl	6800,0
KCl	400,0
$CaCl_2$ (безводный)	200,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200,0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	140,0
$NaHCO_3$	2200,0
Глюкоза	1000,0
Феноловый красный	10,0
Аминокислоты	
L-аргинин, гидрохлорид	21,0
L-цистин, гидрохлорид	15,65
L-глутамин	292,0
L-гистидин	8,0
L-изолейцин	26,2
L-лейцин	26,2
L-лизин, гидрохлорид	36,5
L-метионин	7,5
L-фенилаланин	18,0
L-треонин	24,0
L-триптофан	4,0
L-тирозин	18,0
L-валин	24,0
Витамины	
Биотин	1,0
Пантотенат кальция	1,0
Холин-хлорид	1,0
Фолиевая кислота	1,0
Инозитол	2,0
Никотинамид	1,0
Пиридоксаль, гидрохлорид	1,0
Рибофлавин	0,10
Тиамин, гидрохлорид	1,0

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