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.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОФИЛАКТИКЕ, ДИАГНОСТИКЕ КОНТАМИНИРОВАНИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМАМИ И МЕРАМ ПО ИХ ДЕКОНТАМИНАЦИИ

(Одобрены Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 21 июня 1983 г.)

1. Общие положения.

Применение культур клеток в вирусологических исследованиях, при диагностике вирусных инфекций и на предприятиях по производству противовирусных вакцин, диагностикумов вызывает необходимость разрабатывать методы культивирования клеток, позволяющие обеспечить стабильность культурально-морфологических свойств штаммов, линий клеток и их высокую чувствительность к вирусам.

Одним из факторов, вызывающих изменения в культурах клеток и затрудняющих проведение вирусологических исследований, является контаминация бактериями, микоплазмами, микроскопическими грибами и вирусами. Поэтому совершенствование способов профилактики, диагностики контаминирования микроорганизмами и методов деконтаминации с целью восстановления исходных морфологических и биологических свойств культур клеток — актуальная проблема, решение которой позволит повысить надежность и достоверность проводимых исследований, а также и эффективность биофабричного производства.

По течению инфекция в культуре клеток бывает острой, сопровождающейся дегенерацией чувствительных клеток, и латентной, когда микроорганизм персистирует, не вызывая гибели хозяина.

Микроорганизмы-контаминанты могут располагаться в межклеточ-

ном веществе, цитоплазме, ядре, ядрышках и между азотистыми основаниями нуклеопротеидных нитей хромосом.

Контаминирование культур клеток микроорганизмами происходит через следующие источники инфекции:

рабочие помещения, воздушную среду;
посуду, пипетки, резиновые изделия;
питательные среды, растворы, сыворотку крови;
животные ткани для приготовления культур клеток;
контаминированные штаммы и линии клеток;
сотрудников.

Систематический контроль этих источников инфекции надежно профилактирует контаминирование культур клеток микроорганизмами.

Настоящие рекомендации имеют целью регламентировать приемы и методы профилактики контаминирования клеток микроорганизмами, выявление источников инфекции, а также использование антибактериальных и антимикоплазменных препаратов для предупреждения загрязнения этих материалов бактериальной и микоплазменной микрофлорой с целью деконтаминации клеточных культур.

2. Требования к боксовым помещениям и бактериологический контроль воздушной среды.

2.1. Лаборатория, в которой осуществляется производство питательных сред и культур клеток, должна располагать боксовыми помещениями с приточно-вытяжной вентиляцией со стерильной подачей воздуха, исключающей аэрогенную контаминацию материалов посторонней микрофлорой. При этом для обеспечения необходимого положительного давления, препятствующего проникновению микрофлоры в рабочее помещение, воздух нагнетают в бокс, а вытяжку производят из предбокс-ника. Наиболее оптимальным решением данного вопроса являются боксы с ламинарным потоком стерильного воздуха.

2.2. Боксы оснащают бактерицидными лампами, которые включают на 30 мин до работы, в обеденный перерыв и в конце рабочего дня. При установке ламп следует руководствоваться следующими нормативами: лампа БУВ-30 на 7—8 м^2 или мощность 1 Вт на 1 м^2. Подвешивают их на уровне середины высоты комнаты. Средний срок эксплуатации ламп — 1500 ч. Входить в бокс разрешается только в специально предназначенной для этой цели одежде и обуви, причем халаты, чепчики и марлевые повязки (маски) должны быть предварительно простерилизованы автоклавированием в течение 1 ч при 0,7 атм.

2.3. Работу в боксе проводят у пламени спиртовки или газово горелки. Прежде чем открыть бутыли, флаконы, матрасы или другую посуду с питательной средой, сывороткой, растворами или культурами клеток, горлышки сосудов и резиновые пробки протирают тампоном, смоченным в спирте, и прожигают. Во время работы в контейнеры убирают использованную посуду, резиновые и ватно-марлевые пробки, инструменты, пергаментную бумагу и другие материалы. После окончания работы выносят мусор и делают влажную уборку; столы, стулья, шкафы и другие предметы, а в конце недели и стены, протирают увлажненной стерильной салфеткой. Поверхность рабочих столов дополнительно протирают стерильной салфеткой или ватой, смоченной спиртом-ректификатом, и прожигают. Для смачивания тряпок, салфеток и ваты применяют 2%-ные растворы хлорамина, карболовой кислоты и другие дезсредства. В конце недели уборка боксов завершается проведением аэрозольной дезинфекции (см. п. 2.5).

2.4. С целью учета эффективности стерилизующих фильтров венти-

ляционных систем и для оценки общесанитарного состояния боксовых помещений периодически, не реже одного раза в месяц, проводят бактериологические исследования воздушной среды. Микроорганизмы на воздухе улавливают с помощью аппарата Кротова на твердые баксреды (МПА, кровяной агар), разлитые в чашки Петри. После суточной инкубации чашек при 37°С просматривают и подсчитывают колонии и в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору, определяют микробное число воздуха. Во время работы этот показатель не должен превышать 100 микробных тел в 1 м³.

2.5. Для улавливания быстрооседающего крупнодисперсного бактериального аэрозоля, преимущественно вызывающего аэрогенную контаминацию питательных сред и культур клеток, пробы воздуха отбирают методом седиментации микроорганизмов на открытые чашки Петри со стерильным МПА и кровяным агаром, выставляемые на стол в боксе при экспозиции в 15—30 мин. Результаты исследований, как и в предыдущем пункте, учитывают после суточного выдерживания проб в термостате. Количество микробных тел, оседающих за 1 мин на 1 м² поверхности, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{N \cdot 10^4}{S \cdot c \cdot t},$$

где X — искомое число микроорганизмов; N — общее число колоний, выросших на чашках Петри; S — площадь одной чашки Петри, см²; c — число чашек Петри; t — время экспозиции чашек, мин.

Обсемененность воздуха боксов не должна превышать 10 микробных тел на 1 м² в минуту на протяжении всей работы.

2.6. Превышение отмеченных предельно допустимых концентраций микроорганизмов в воздухе резко увеличивает вероятность бактериальной контаминации изготовляемых в боксах питательных сред и культур клеток, даже при работе с ними в непосредственной близости от пламени горелки, и вызывает необходимость дополнительной дезинфекции таких помещений. Ее проводят при помощи аппарата САГ-1 или других приборов аналогичного назначения путем аэрозольного распыления смеси, состоящей из 3% перекиси водорода в 0,5%-ном водном растворе молочной кислоты, при расходе жидкости 5 мл на 1 м³. Применение этой смеси обеспечивает надежное обеззараживание боксов и в отличие от других известных дезинфектантов (формалин, фенол, уксусная кислота и др.) не сопровождается накоплением в помещении токсических для клеток продуктов

3. Контроль стерильности стеклянной посуды, резиновых изделий и других материалов.

3.1. *Подготовка посуды и других предметов к стерилизации.* Горлышки вымытых и высушенных матрасов, флаконов, колб и бутылей обертывают колпачками из трех слоев бумаги, фольги или из одного слоя бумаги и одного слоя фольги. Каждый колпачок фиксируют на горлышке сосуда шпагатом или суровой ниткой. Пробирки без пробок завертывают в бумагу по 30—50 шт., а флакончики из-под антибиотиков, также используемые для посева клеток, закладывают в биксы в несколько рядов открытым горлышком книзу, дном — кверху. Предназначенные для последующего закрывания стерильной посуды резиновые пробки завертывают в пакеты. Каждый номер пробок упаковывают отдельно. На пакетах простым карандашом делают надписи с указанием номера пробок и даты стерилизации.

В верхние концы пипеток вставляют вату, затем пипетки завертывают в бумагу по 10—20 шт. или помещают в стеклянные или металлические пеналы. На обертке надписывают емкость пипеток. Чашки Петри завертывают в бумагу по 1—5 шт. Воронки, ступки и пестики, а также халаты, колпаки, маски и полотенца завертывают в бумагу, каждый предмет отдельно. Фильтр Сальникова помещают в мешок из полотна. Фильтр Зейтца монтируют на бутыли и накрывают бумажным мешком (Крафта), в области горлышка бутыли его плотно перевязывают суровой ниткой. Бумагу и марлю нарезают кусочками нужных размеров, а вату сворачивают в виде шариков или тампонов. Каждый вид материала отдельно, небольшими порциями, завертывают в бумагу.

3.2. *Стерилизация стеклянной посуды, резиновых пробок, трубок и других материалов.*

3.2.1 Стеклянную посуду стерилизуют в суховоздушных шкафах, посуду с резиновыми пробками и трубками — в автоклавах. Посуду в шкафу размещают таким образом, чтобы воздух свободно циркулировал по всей камере. Для этого полки шкафа заполняют посудой в один ряд, оставляя $^1/_3$ отверстий открытыми. На все полки с посудой помещают контрольные ампулы с порошкообразной сахарозой. Дверки шкафа плотно закрывают. Шкаф устанавливают на режим стерилизации и включают в электросеть, показания температуры через каждый час записывают в специальном журнале. Стерилизацию проводят при достижении 180°С в течение 2 ч. При этом пергаментная бумага не должна обугливаться. Она может лишь слегка пожелтеть под влиянием высокой температуры. При температуре выше 180°С бумага обугливается. При температуре ниже 180°С продолжительность стерилизации удлиняется (табл. 1).

1. Срок стерилизации посуды в суховоздушном шкафу в зависимости от температуры нагрева

Температура, °С	Продолжительность стерилизации, мин	Температура, °С	Продолжительность стерилизации, мин
150	240	170	180
160	180	180	120

После окончания стерилизации и остывания посуды открывают дверки шкафа и проверяют контрольные ампулы с сахарозой. Сахароза должна быть оплавленной, черного цвета. Изменение цвета этого индикатора позволяет судить о достижении необходимой температуры в камере шкафа и правильности стерилизации данной партии посуды.

3.2.2. Бутыли с резиновыми пробками, трубками, фильтры, отдельно резиновые пробки, сифоны стерилизуют в автоклавах. Автоклав одновременно загружают разным материалом. Стерилизацию ведут при режиме полного освобождения от микроорганизмов всех материалов. Стерилизация под давлением в автоклаве надежно обезвреживает микроорганизмы в материале только при соблюдении режима стерилизации и соответствии показаний на манометре давления пара температуре внутри автоклава. Ежегодно соответствие давления и температуры проверяют в официальных государственных учреждениях. Ниже приводятся соотношения между показателями манометра, выражаемые в различных единицах, и температурой внутри автоклава (табл. 2).

По показаниям манометра, регистрирующего давление в автоклаве, можно судить о температуре насыщенного водяного пара в камере в градусах Цельсия. Чем выше упругость пара, тем энергичнее он проникает в стерилизуемый материал, вытесняет из него воздух и быстрее прогревает материал до соответствующей температуры.

Фактическое достижение заданной температуры контролируют с помощью порошкообразных индикаторов с известной температурой плавления: бензонафтола — 110°С; антипирина — 115°С; резорцина — 118°С; серы — 119°С; бензойной кислоты — 121°С. К навеске 100 г индикатора для его подкраски добавляют 0,01 г сафранина или 0,005 г фуксина, перемешивают, расфасовывают по 1—2 г и запаивают в ампулы. Если автоклавирование ведут при 1 атм, то вместе с материалом в камеру помещают ампулы с резорцином и бензойной кислотой, а если при 0,5 атм, то — с бензонафтолом и антипирином. Наличие окрашенного сплава или порошка в ампулах позволяет судить о фактической температуре в стерилизационной камере. Посуду, резиновые изделия и другие материалы стерилизуют в автоклаве при 1,5—2,0 атм в течение $1^1/_2$—2 ч.

2. Зависимость температуры от давления пара в автоклаве

Температура насыщенного пара в камере, °С	Давление пара, атм или кг/см²	Давление пара, гектопаскалей (ГПа)	Давление пара, мм рт. ст.	Давление пара, фунтов на кв. дюйм
100	0	1013	760	0
111,8	0,5	1470,9	1103,3	7,0
115,0	0,7	1621,2	1216,0	9,5
120,6	1,0	2016	1520,0	14,0
127,8	1,5	2522	1910,0	21,0
133,9	2,0	3110	2280,0	28,0

4. Контроль стерильности питательных сред, растворов и сыворотки.

4.1. Использование в работе контаминированных клеточных культур, питательных сред, растворов и сыворотки крупного рогатого скота недопустимо. В связи с этим их подвергают тщательному и многоэтапному контролю на стерильность, что является обязательной и обычной процедурой в системе мероприятий по профилактике обсемененности культур клеток микрофлорой.

4.2. Во всех случаях при исследовании на обсемененность микроорганизмами культуральных питательных сред, сывороток и культур клеток используют следующий минимальный набор бактериологических сред:

мясо-пептонный бульон (МПБ) с 0,5% глюкозы;

кровяной агар;

жидкая среда Сабуро;

тиогликолевая среда;

среда Эдварда—Хейфлика или ее модифицированный вариант — 2%-ный раствор мышечного ферментативного гидролизата (ФГМС) на растворе Хенкса с добавлением 10% сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта.

Микробиологические высевы на бактерии и микоплазмы помещают на 14 сут в термостат при 37°С, а среду Сабуро на микроскопические гри-

бы выдерживают в течение такого же срока при 20—22°С и ведут за ними повседневное наблюдение.

4.3 Для контроля мелких и крупномасштабных серий питательных сред, сыворотки и растворов, стерилизуемых фильтрованием и фасуемых в посуду различной емкости, из 2—3 бутылей или флаконов в начале, середине и конце каждой серии в асептических условиях отбирают по 50 мл. Взятые пробы исследуют методом прямого посева в пробирки и чашки Петри с соответствующими бактериологическими средами.

4.4. Кроме того, с целью выявления контаминации, связанной с погрешностями в подготовке посуды и пробок, а также с аэрогенным инфицированием в процессе разлива, всю серию среды или раствора непосредственно после фильтрации выдерживают в течение 7 дн. при 37°С, а затем — еще неделю при комнатной температуре (20—22°С). На протяжении всего этого периода среды и растворы должны оставаться прозрачными и не иметь осадка. Жидкости, содержащие индикатор фенолрот, не должны менять исходную окраску и иметь красно-оранжевый цвет.

4.5. При отрицательных результатах бактериологических высевов во всех пробах и отсутствии визуальных признаков обсемененности контролируемую серию среды, сыворотки или раствора считают стерильной и передают для использования или до употребления выдерживают в холодильнике (холодной комнате) при 4°С в пределах установленных сроков хранения. Большую партию стерильной сыворотки можно хранить в замороженном состоянии при температуре минус 10—15°С.

4.6. Проверяемую серию выбраковывают, если отмечают рост микроорганизмов на бактериологических средах, опалесценцию или помутнение сред, сыворотки и растворов, наличие плесени или изменение pH в кислую сторону более чем на 30% единиц посуды.

4.7. При наличии макроскопических изменений в отдельных бутылях и флаконах (менее 30% от всей партии) их выбраковывают, а остальную часть серии среды, сыворотки или раствора признают условно стерильной и помещают на временное хранение при 4°С. Допускают ее к использованию только после получения отрицательных результатов дополнительного бактериологического исследования с высевом проб на баксреды из расчета 10% от партии.

4.8. При росте микроорганизмов на бактериологических средах, но в отсутствие визуальных признаков контаминации также проводят дополнительное бактериологическое исследование удвоенного числа проб. При повторном обнаружении обсемененности всю серию признают нестерильной. Если же в этом случае микроорганизмы не будут выделены, то контролируемую серию следует считать пригодной для использования.

4.9. Контроль на стерильность расфасованных сред и растворов, стерилизуемых автоклавированием, осуществляют так же, как изложено в п. 4.3, с той лишь разницей, что пробы для бактериальных высевов берут не в порядке очередности изготовления, а выборочно (в пределах 3—5% от серии).

4.10. Стерильность сыворотки крови животных, ростстимулирующих добавок (дрожжевой и эмбриональные экстракты, АМЖ) или иных термолабильных компонентов ростовых сред проверяют без их передержки в разных температурных условиях (при 37°С и комнатной температуре) методом прямого посева проб на бактериологические среды.

4.11. Культуральные среды, изготавливаемые в реакторах большой емкости (100, 250, 630 л и более) и стерилизуемые фильтрованием или термическим способом, контролируют на стерильность методом осаждения возможных контаминантов на мембранные фильтры («Владипор»,

«Миллипор», «Гельман») с размером пор 0,20—0,22 мкм. Для этого в асептических условиях из реактора берут пробы среды по 0,5 л и пропускают их через стерильные фильтры, чем достигается концентрирование микроорганизмов на поверхности. По окончании этой процедуры фильтрующую мембрану (или ее часть) захватывают стерильным пинцетом и накладывают на кровяной агар в чашке Петри, а также помещают в МПБ с 0,5% глюкозы или в тиогликолевую среду. Далее исследования проводят по обычной методике.

4.12. Среды и растворы, содержащие антибиотики или ингибиторы роста бактерий, проверяют на стерильность, как и в п. 4.11 — методом мембранного фильтрования. Однако при этом фильтры помещают в бактериологические среды только после промывки 5-кратным объемом стерильного физраствора, пропускаемого через них вслед за фильтрованием пробы среды.

4.13. Ростовые среды компонуют из заранее проверенных и заведомо стерильных материалов (нативная культуральная питательная среда, сыворотка, различные добавки). Тем не менее после объединения всех компонентов проводят дополнительный бактериологический контроль готовой среды путем высева взятых из нее проб на бактериологические среды. Кроме того, в процессе испытания питательной ценности и токсичности каждой новой серии ростовой среды, проводимого в течение 5—6 последовательных пассажей на эталонной клеточной культуре (постоянно используемые в лаборатории перевиваемые штаммы и линии клеток с известными свойствами), в ряде случаев удается выявить обсемененность среды бактериями, плохо или совсем не размножающимися на обычных бактериологических средах. Наличие таких контаминантов устанавливают по изменениям в культуре клеток (незначительная опалесценция среды, замедленный рост клеток, стертость межклеточных границ и т. д.) и подтверждают с помощью фазоконтрастной микроскопии или других специальных методов исследований.

4.14. Сыворотка животных является обязательным компонентом всех ростовых сред. Наиболее часто используют сыворотку крови крупного рогатого скота (лучше — телят и эмбриона коровы). Каждую серию сыворотки наряду с установлением ростстимулирующей активности и наличия вируснейтрализующих антител необходимо контролировать на бактериальную, микоплазменную и вирусную контаминацию.

При бактериологическом контроле сыворотку (1 мл) высевают на жидкие среды (10 мл), использование более высоких доз инокулята (25 мл) и среды (100 мл) значительно повышает чувствительность метода. Кроме того, используют полужидкую тиогликолевую среду. 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. 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 или анаэробы), ставят в термостат с температурой 37°С, две пробирки (для выявления микроскопических грибов) оставляют при 20—25°С. Для лучшего обнаружения аэробных бактерий и микроскопических грибов в общую схему контроля стерильности рекомендуется дополнительно вводить 1%-ные растворы гидролизатов лактальбумина или плацентарно-эмбрионально-маточные (производится Казанским ветеринарным институтом) с 1%-ной глюкозой. Каждую пробу сыворотки высевают в

4 колбы (склянки) со средой. Из них половину инкубируют при температуре 20—22°С, вторую половину ставят в термостат при 37°С.

Микоплазменную контаминацию устанавливают на бульоне Эдварда—Хейфлика или на его модифицированных вариантах. Для этого высевают 25 мл сыворотки на 100 мл бульона. Следует иметь в виду, что микоплазмы лучше растут в атмосфере 95% CO_2.

Для контроля сыворотки на культуре клеток с целью исключения вирусной контаминации составляют контрольную систему, которая включает культуру клеток (перевиваемые штаммы и линии клеток), питательную среду с исследуемой сывороткой, растворы версена или трипсина (для снятия и диспергирования 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 культивировании в присутствии заведомо хорошей сыворотки; они также должны обладать широким диапазоном чувствительности к наиболее вероятным вирусам-контаминантам (для сыворотки крупного рогатого скота ими являются вирусы парагриппа-3, ринотрахеита и диареи). Исследование неизвестной сыворотки следует проводить в течение 5 последовательных пересевов клеток с использованием одних и тех же компонентов контрольной системы. Клетки 5-го пересева в нативном, окрашенном препаратах и в метафазной пластинке исследуют для выявления общих морфологических изменений в культуре, посторонних включений в цитоплазме, нарушений структуры хромосом. Исследование сыворотки на распространенные миксопарамиксовирусы проводят по реакции гемагглютинации и гемадсорбции на гемагглютинирующие агенты.

Вопрос о необходимости прогревания сыворотки (при 56°С в течение 30 мин) решается индивидуально с учетом результатов контрольных исследований и требований к данной культуре клеток; прогревание ухудшает ростовые свойства сыворотки.

5. Контроль стерильности клеточных культур.

5.1. Стерильность клеточных культур на всех этапах их приготовления и хранения обеспечивается не только тщательным выполнением изложенных выше мероприятий, но и бактериологическими исследованиями донорских тканей, матричных и производственных линий клеток, а также клеточных расплодок, что позволяет своевременно отбраковывать контаминированные материалы.

5.2. Контроль на стерильность клеточных культур осуществляют:

при изготовлении первичных культур клеток (образцы исходных тканей, готовая суспензия свежеизолированных клеток);

при поддержании перевиваемых линий клеток матричных культур через 5—10 пассажей, но не реже одного раза в месяц, а производственных культур — во время рассадки каждой партии;

при крупномасштабном суспензионном культивировании клеток — в каждом пассаже;

при закладке на хранение в условиях жидкого азота и восстановления клеточных расплодок после низкотемпературной консервации;

при поступлении культур клеток из других учреждений и лабораторий;

во всех случаях возникновения признаков контаминации (опалесценция или помутнение культуральной среды, ее резкое закисление, изменение ростовых характеристик и морфологии клеток, неспецифи-

ческая дегенерация клеточного монослоя или массовая гибель клеток в суспензионных культурах и т. д.).

5.3. Стерильность клеточных культур проверяют посредством высевов на бактериологические среды проб растворов (по 0,5 мл), использованных для промывки и диспергирования тканей, а также клеточной суспензии и культуральной жидкости. Для бактериологического контроля суспензионных культур, выращиваемых с применением антибиотиков, отобранную пробу в количестве 25—100 мл с целью освобождения от клеток предварительно центрифугируют при 1000 об/мин 10 мин, а надосадочную жидкость затем исследуют методом мембранного фильтрования, как это указано в пп. 4.11 и 4.12 настоящих рекомендаций.

5.4. Материал на контаминирование вирусами исследуют в вирусологических лабораториях, используя приводимые ниже методы:

общее обследование культуры на наличие характерных цитопатических изменений (ЦПД, симпласты, трансформация и т. п.);

методы, основанные на прямом или косвенном связывании антигена-контаминанта со специфическими антителами иммунной сыворотки (реакции нейтрализации, связывания комплемента, преципитации, иммунофлуоресценции, иммунопероксидазный, радиоиммунный). Для установления контаминанта по реакции нейтрализации и РСК требуется значительное количество антигена. При использовании других приведенных методов расходуется меньше антигена, чувствительность их выше. Эти методы универсальны, практически пригодны для выявления различных видов вирусов. К их недостаткам следует отнести необходимость постоянного наличия большого набора гипериммунной сыворотки к различным штаммам и видам контаминантов;

заражение исследуемым материалом лабораторных животных, появление характерной клиники, образование специфических антител и изучение их одной из реакций, указанных в предыдущем пункте. Метод универсален, может быть использован для установления многих видов контаминантов. К его основным недостаткам следует отнести трудоемкость. Более того, контаминанты, персистирующие длительное время в культуре, изменяются и могут не вызывать заболевание животного. Если заболевание и наступает, клиническое течение инфекции может быть нехарактерным;

исследование окрашенных препаратов под световым и люминесцентным микроскопами на тельца-включения (аденовирусы, вирусы ринотрахеита, бешенства). По техническому выполнению метод прост, доступен и легко осуществим в условиях обычных лабораторий;

электронная микроскопия. Данный вид универсален, позволяет обнаружить практически все виды вирусной контаминации, за исключением тех вирусов, которые инкорпорированы в нуклеопротеидные нити хромосом. Процесс определения контаминанта несложен, требует мало времени. Недостатком электронно-микроскопического метода исследования является трудность обнаружения вируса при слабой инфицированности;

гемадсорбция и гемагглютинация позволяют выявлять вирусы, несущие на своей поверхности рецепторы-агглютинины, взаимодействующие с комплементарными рецепторами поверхности эритроцитов, в результате чего они склеиваются. При гемадсорбции эритроциты обнаруживаются прикрепленными к поверхности инфицированных клеток. Реакцию гемагглютинации ставят отдельно с культуральной жидкостью или вместе с разрушенными клетками. При исследовании контаминированной культуры эритроциты, связываясь с вирусами, агглютинируются и оседают на дне лунки панели в виде круга с изъеденными краями. Вна-

чале эти реакции использовались для обнаружения миксовирусов. Впоследствии было показано, что при подборе условий и эритроцитов соответствующих видов животных при помощи реакций гемагглютинации и гемадсорбции можно обнаруживать и другие вирусы, а также микоплазмы;

феномены экзальтации (усиление активности одного вируса при взаимодействии с другим), интерференции (подавление активности одного вируса при взаимодействии с другим вирусом), интерферонообразования (подавление активности одного вируса благодаря стимулированию интерферонообразования другим вирусом), предусматривающие широкое применение разных вирусов, больше используют при разработке научных вопросов и малопригодны для практики вирусологического контроля;

определение обратнотранскриптазной активности и реакцию гибридизации между нуклеиновыми кислотами клетки и вируса используют для выявления контаминирования клеток онкогенными вирусами, локализованными в геноме клетки. Оба метода сложны и могут быть выполнены в специализированных лабораториях. Приобретение клетками трансформированного фенотипа в результате взаимодействия их с онкогенными вирусами устанавливают на основании способности трансформированных клеток размножаться в полужидкой агаровой среде (в этих условиях нормальные клетки не растут) и агглютинироваться в присутствии лектинов;

метод равновесного центрифугирования в градиенте сахарозы концентрированной культуральной жидкости, инкубированной в присутствии радиоактивных предшественников синтеза нуклеиновых кислот.

При выборе метода исследования учитывают вид предполагаемого вируса-контаминанта, срочность получения ответа и реальные возможности использования того или иного метода.

6. Методы выявления микоплазм в клеточных культурах.

6.1. Для выявления микоплазм используют следующие методы: посев на питательные среды, цитологические, радиоавтографические, электронно-микроскопические.

6.1.1. *Метод выделения микоплазм на средах Эдварда — Хейфлика, 2%-ном ФГМС (ферментативный мышечный гидролизат) и модифицированной среде ВИЭВ* (на основе среды Мартена), включающих в себя специфическую основу, дрожжевой экстракт (10%-ный) и сыворотку лошади или крупного рогатого скота (10%-ный).

Для выделения контаминантов жидкие и полужидкие среды разливают в пробирки по 5—10 мл, твердые — в чашки Петри по 15 мл. Материалом для исследования (посевным материалом) служит суспензия подозреваемых на контаминацию клеток, питательные среды культур клеток, взятые из культуральных флаконов на 2—4-е сут культивирования.

Материал для исследования отбирают стерильно. В одну пробирку с 10 мл питательной среды вносят 1 мл исследуемого материала. Посев в полужидкие агары производят пипетками (Пастера или одномиллилитровыми) по уколу так, чтобы посевной материал равномерно распределялся по всему столбику среды.

При посеве на твердые среды посевной материал равномерно распределяют шпателем на поверхности агара. Использование больших объемов инокулята (25 мл) и жидкой среды (100 мл) в значительной степени повышает чувствительность метода обнаружения микоплазм в исследуемом материале.

Инокулированные среды помещают в термостат при 37°С и просмат-

ривают ежедневно в течение 10—15 дн. Видимый рост появляется обычно на 2—4-е сут. На жидких средах он проявляется в виде легкой опалесценции, слабого осадка и нежной поверхностной пленки. На полужидких средах рост микоплазм характеризуется скоплением серовато-белых микроколоний по пути инокулирования посевного материала. На твердых питательных средах микоплазмы образуют характерные, вросшие в агар, округлые колонии с вдавленным центром и возвышенной периферией.

6.1.2. *Цитологические методы исследования.* Для контроля в световом микроскопе на контаминирование культур микоплазмами суспензию клеток высевают в пробирки или пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Концентрация клеток в суспензии должна быть $1{,}5—2\times10^5$ в 1 мл; объем суспензий 1,5—2 мл. Через определенные промежутки времени (1, 2, 3 и т. д. суток культивирования) покровные стекла вынимают, промывают в подогретом до 37°С растворе Хенкса или физрастворе (pH 7,0—7,2), подсушивают фильтровальной бумагой и фиксируют в одной из фиксирующих смесей: жидкости Карнуа (96°-ного спирта-ректификата 6 ч., хлороформа 3 ч., ледяной уксусной кислоты 1 ч.), метиловом спирте или других фиксаторах с последующей окраской цитологических препаратов. Наиболее часто используют для окраски препаратов один из простых и доступных методов — по Романовскому—Гимзе. Выдержанные в краске в течение 2 ч препараты споласкивают водопроводной водой, высушивают при комнатной температуре и заделывают в канадский бальзам для исследования. Применяют и другие методы окрашивания, например гематоксилинэозином. По этому методу сначала гематоксилином окрашивают ядро. Для этого хранившиеся в 70°-ном спирте фиксированные препараты споласкивают в дистиллированной воде и помещают в краску на 2—3 мин, после чего споласкивают водопроводной водой и просматривают под микроскопом. Контуры ядра и ядрышек должны быть четкими, хорошо окрашенными. В случае необходимости окрашивание препарата продолжают, чередуя 2—3-минутное выдерживание в краске, споласкивание водопроводной водой и исследование под микроскопом. Затем в течение 30—60 с докрашивают цитоплазму. В готовом препарате на розовом фоне цитоплазмы обнаруживают фиолетовые ядра. После этого стеклышки с клетками подсушивают путем осторожного накладывания фильтровальной бумаги, проводят через спирты с возрастающей концентрацией: 70, 80, 96°-ный (1-й спирт), 96°-ный (2-й спирт), 100°-ный+ксилол (1 : 1), ксилол (1-й ксилол), ксилол (2-й ксилол) и в заключение препарат заделывают в бальзам на предметном стекле.

На цитологических препаратах, окрашенных по Романовскому — Гимзе или гематоксилинэозином, при наличии микоплазменной инфекции видно, что монослой разрыхленный, плотного прилегания клеток нет. На отдельных участках наблюдаются пространства без клеток («окна»). В цитоплазме и в межклеточном пространстве обнаруживаются микоплазмы в виде мелких фиолетовых зерен.

Для исследования на микоплазмы в люминесцентном микроскопе клетки окрашивают по методу Фельгена. Последовательность обработки препарата следующая:

фиксировать клетки в жидкости Карнуа в течение 15 мин;

отмыть от фиксатора в 96°-ном спирте;

провести по спиртам убывающей концентрации до воды (96, 70, 50°-ный, дистиллированная вода);

поместить в 1 н. раствор HCl на 10 мин при 60°С с целью гидролиза ДНК; сполоснуть в 2 сменах дистиллированной воды по 3—5 мин;

окрасить реактивом Шиффа в течение 20 мин;
отмыть в дистиллированной воде и провести через спирты 50 и 70°-ный; дважды промыть в солевом этаноле по 5 мин;
на предметное стекло нанести каплю дистиллированной воды и опустить на нее покровное стекло клетками вниз. Препарат исследуют в люминесцентном микроскопе: в цитоплазме контаминированных клеток, а также вне на желтом фоне обнаруживаются оранжево-красные зерна микоплазм.

Приготовление реактива Шиффа для люминесцентной микроскопии: в 200 мл дистиллированной воды растворить 250 г акридинового оранжевого, 500 мг метабисульфита калия и добавить 20 мл 1 н. раствора HCl. Колбу с краской герметически закрыть и оставить в холодильнике при 4°С на 3 сут. Содержимое колбы периодически встряхивать.

Раствор Шиффа непосредственно перед использованием профильтровать через стеклянный фильтр № 4 под давлением. Первую порцию фильтрата выбросить. Реактив Шиффа повторно не используют.

6.1.3. *Выявление микоплазм методом радиоавтографии.* Принцип выявления микоплазменной инфекции в исследуемой культуре заключается в способности микоплазм при кратковременном инкубировании культур клеток в питательной среде, содержащей H^3-тимидин, включать его как предшественник полинуклеотидной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Таким образом, в радиографах наряду с меткой, находящейся над ядрами клеток, обнаруживается радиоактивная метка и над местами расположения микоплазм.

Препараты просматривают в световом микроскопе (об. 90, ок. 10—15) по всей площади. Мечеными считаются клетки, над ядрами которых обнаруживают не менее 5 зерен восстановленного серебра. При наличии в данной культуре клеток микоплазм зёрна восстановленного серебра располагаются не только над ядром клеток, но и в цитоплазме и в межклеточном пространстве.

Для контроля уровня радиоактивного фона необходимо параллельно с изучаемой культурой брать в опыт еще 1—2 культуры клеток, одна из которых должна быть заведомо свободна от микоплазм. Лучше всего для этой цели подходят первично-трипсинизированные культуры клеток.

6.1.4. *Электронно-микроскопическая диагностика микоплазм в культуре клеток.* На срезах при просмотре в электронном микроскопе обращают внимание на наличие микоплазм в межклеточных пространствах, около цитоплазматической мембраны или непосредственно в контакте с мембраной, в цитоплазме клеток. Микоплазмы имеют округлую, овальную или вытянутую форму, иногда в виде ракетки, размер их 0,1—1,0 мкм. Оболочка микоплазм не имеет клеточной стенки и представляет собой элементарную цитоплазматическую мембрану. Внутренняя структура представлена тяжами, микрофибриллами, рибосомоподобными структурами. Внутри клетки микоплазмы расположены, как правило, в вакуолях-фагосомах.

7. Использование противомикробных препаратов для профилактики контаминации и деконтаминации клеточных культур.

7.1. Предупредить размножение и подавить случайно попавшие в клеточную структуру бактерии удается с помощью противомикробных препаратов (антибиотиков и других средств), добавляемых в ростовые среды непосредственно перед их использованием. Однако ввиду токсичности этих препаратов и их способности при длительном воздействии на перевиваемые культуры вызывать определенные изменения свойств клеточных популяций (утрату исходных характеристик, возникновение новых трофовариантов) их следует строго дозировать и применять диф-

ференцированно. Их использование является необходимым условием при возрастании риска контаминации в процессе получения первичных клеточных культур, при крупномасштабном суспензионном выращивании линий клеток, при массовом производственном культивировании перевиваемых пристеночных популяций, а также во всех случаях объединения клеточного материала. В отличие от этого матричные пристеночные культуры перевиваемых клеток выращивают без применения антибиотиков, поэтому для большей гарантии их сохранности всю партию матрасов делят на две равных части, пересевы которых проводят в чередующейся последовательности. При возникновении контаминации эти культуры уничтожают, не подвергая «лечению», а культивирование возобновляют из резервных расплодок, хранящихся в жидком азоте. Только редкие и уникальные культуры подлежат деконтаминации.

7.2. При работе с культурами клеток используют многие антимикробные препараты. Оптимальные (нетоксичные) дозы и характер действия их приведены в таблице 3.

7.3. Выбор эффективного препарата для комплекса препаратов зависит от чувствительности к ним конкретных контаминантов. В связи с этим предварительно определяют чувствительность микрофлоры ткани, используемой при получении первичных клеточных культур, а также выделяемой в процессе бактериологического контроля воздуха, питательных сред и культур клеток к возможно более широкому кругу препаратов, рекомендованных в предыдущем пункте и имеющихся в распоряжении лаборатории. При изоляции однотипной или высокочувствительной к какому-либо из антибиотиков микрофлоры часто бывают достаточным применение монопрепарата, тогда как в случае выделения смешанных культур или резистентных форм микроорганизмов необходимо использовать комплекс препаратов.

Чувствительность микрофлоры к тем или иным препаратам определяют с помощью стандартных дисков антибиотиков (согласно прилагаемой к ним инструкции) или методом серийных разведений веществ, как это рекомендуется руководствами по микробиологии.

В первом случае на чашку Петри с кровяным агаром вносят 0,5 мл суточной бульонной культуры-контаминанта, равномерно распределяют инокулят по всей поверхности агара и через 40 мин накладывают диагностические диски соответствующих антибиотиков на расстоянии 28—30 мм друг от друга и от края чашки. Результаты учитывают через 24 ч; при этом предпочтение отдают препаратам, обеспечивающим зону задержки роста микроорганизмов с диаметром не менее 20—35 мм.

Во втором случае на МПБ готовят серийные разведения исследуемого препарата, содержащие убывающие его концентрации, после чего в пробирки вносят контаминант с плотностью 10^5—10^6 микробных тел в 1 мл. Для последующей работы считают пригодными препараты, дающие бактерицидный эффект в дозах, не превышающих оптимальные для культур клеток.

7.4. Выраженным противомикробным действием по отношению к наиболее часто встречающимся контаминантам клеточных культур обладает комплекс следующего состава: пенициллин — 100 ЕД/мл, гентамицин (или мономицин) — 100 мкг/мл, полимиксин — 50 ЕД/мл, фурагин — 5 мкг/мл. Для подавления плесневой флоры, в случае такой необходимости, в этот комплекс рекомендуется добавлять натриевую соль нистатина в концентрации 50 ЕД/мл.

При пристеночном культивировании комплекс антимикробных препаратов применяют однократно во время посева клеток, а при круп-

3. Противомикробные препараты для культур клеток

Наименование	Чувствительные микроорганизмы	Тип антимикробного действия	Оптимальная концентрация для культур клеток, ЕД/мл или мкг/мл
Пенициллин	Б+	Бактерицидное	100,0
Стрептомицин	Б±		100,0
Мономицин	Б±, М	То же	100,0
Неомицин	Б±, М	»	50,0
Канамицин	Б±, М	»	200,0
Гентамицин	Б±, М	»	200,0
Полимиксин	Б±	»	50,0
Фурагин	Б±	»	8,0
Тетрациклин	Б±, М	Бактериостатическое	30,0
Эритромицин	Б±		50,0
Линкомицин	Б±, М	То же	100,0
Левомицетин (хлорамфеникол)	Б±, М	»	30,0
Тилозин	М	»	10,0
Олеандомицин	М	»	15,0
Препарат № 1	М	»	10,0
Препарат № 2	М	»	10,0
Нистатин	М Г	Фунгистатическое	50,0
Амфотерицин	М Г		2,5

Обозначения. (Б+) — грамположительные бактерии; (Б±) — грамотрицательные бактерии; М — микоплазмы; препарат № 1 — моноэфир сахарозы и жирных кислот; препарат № 2 — полисахарид; МГ — микроскопические грибы.

номасштабном суспензионном культивировании, когда происходит быстрая инактивация антибиотиков, его вносят повторно еще раз через 48—72 ч.

7.5. При инфицировании редких и уникальных перевиваемых культур клеток микоплазмами, бактериями и дрожжами их деконтаминацию проводят с применением указанного в п. 7.4 комплекса антимикробных препаратов по следующей схеме:

перед пересевом следует обезвредить микроорганизмы и улучшить состояние больной культуры — слабые клетки не выдерживают пересева, погибают. Для этого в зависимости от формы проявления контаминирования культуральную жидкость с интервалом 1—3 дня несколько раз сменяют с целью доведения ее до прозрачного состояния и устранения зернистости цитоплазмы. Лучшие результаты получают при применении для контаминации среды 199 с 10—15% свежеприготовленной сыворотки и антибиотиками, обладающими бактерицидностью и широким спектром действия на бактерии, микоплазмы (неомицин, канамицин, гентамицин, мономицин и их комбинации с другими антимикробными препаратами). Антибиотики следует применять в больших, но не токсичных дозах;

проводят 5 пассажей культуры на ростовой среде, содержащей рабочие концентрации комплекса;

параллельно определяют чувствительность выделенного из клеточной культуры контаминанта к противомикробным препаратам, имею-

щимся в лаборатории (см. п. 7.3), и уже на втором пассаже вносят соответствующую корректировку в используемый комплекс;

через 5 пассажей культуру проверяют на стерильность методом мембранного фильтрования (см. пп. 4.11, 4.12 и 5.3 настоящих рекомендаций), и если из нее вновь выделяют контаминирующий агент (агенты), то клеточную популяцию подвергают повторной обработке по полному циклу;

далее клетки культивируют на среде без антибактериальных препаратов.

7.6. Культуру клеток после 4—5 последовательных пересевов исследуют и считают ее деконтаминированной на основании следующих показателей:

при посеве культуральной жидкости и разрушенных клеток на элективные среды микроорганизмы не выделяются;

при исследовании монослойной культуры в нативном виде в световом микроскопе цитоплазма гомогенная, прозрачная, без следов зернистости, с признаком тургора, благодаря чему контуры клеток четкие, с хорошо выраженной рельефностью поверхности монослоя; по общей морфологии, кариологии, пролиферативной активности и чувствительности к вирусам деконтаминированные клетки не должны отличаться от исходной здоровой родительской популяции;

при окрашивании клеток, культивированных в течение 96 ч и более по Романовскому—Гимзе, в цитоплазме не должны быть посторонние включения; продолжительность окрашивания — не менее 2 ч.

8. Требования, предъявляемые к сотрудникам.

Сотрудники могут быть причиной инфицирования культур клеток, например, при заболевании острыми и хроническими инфекциями, отсутствии навыков работы, небрежности и невнимательности, несоблюдении правил личной гигиены и санитарного режима лаборатории. С целью исключения возможности инфицирования культур клеток сотрудниками последние обязаны неукоснительно выполнять предусмотренные правила работы.

8.1. Непосредственно перед заходом в бокс они должны тщательно мыть руки с мылом и щеткой в течение 5—10 мин с последующей обработкой теплым раствором 0,5%-ного нашатырного спирта. В боксе руки протирают ваткой или кусочками марли, смоченными 96°-ным спиртом-ректификатом, обращая особое внимание на подногтевые пространства. По мере необходимости у них проверяют руки на бактериальную обсемененность.

8.2. Сотрудники при подозрении в заболевании острыми и хроническими инфекциями, с гнойными ранами к работе приступают только после получения соответствующего медицинского заключения.

8.3. Каждый сотрудник должен в совершенстве владеть техникой работы с культурами клеток и пунктуально соблюдать правила асептики. Во время пересева культуры клеток, приготовлении и разливе сред, растворов не разрешается производить насасывание и выдувание при помощи рта; следует пользоваться автоматическими дозаторами, резиновыми грушами.

8.4. Боксы следует заблаговременно обеспечивать всем необходимым для работы; все предметы, связанные с пересевом культуры, располагают под рукой; максимально ограничивают хождение, категорически запрещается выход из бокса в процессе работы. Во время работы движения рукой должны быть умеренными, чтобы не сбивать пламя го-

релки; разговор, особенно при открывании сосуда с клетками и средами, ограничивают.

8.5. Сосуды с культурами клеток, средами, сыворотками и другими растворами, контаминированные микроорганизмами, не вскрывают; они подлежат предварительному автоклавированию, после чего их направляют на мойку.

8.6. Сотрудники в течение всего рабочего времени должны соблюдать санитарный режим лаборатории.

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