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 ПРИМЕНЕНИЮ КУЛЬТУР КЛЕТОК В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОЛУЧЕНИЮ, КУЛЬТИВИРОВАНИЮ И ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В НАУЧНЫХ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ ПЕРВИЧНЫХ, ПЕРЕВИВАЕМЫХ И ДИПЛОИДНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

(Одобрены Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 26 января 1978 г.)

1. Обработка посуды, резиновых изделий и инструментов.

При выращивании возбудителей болезней животных, вирусов, бактерий, грибов, простейших в культуре клеток используют бутыли, колбы, флаконы, матрасы, пипетки, резиновые трубки и пробки.

Посуда для выращивания клеточных культур должна быть из нейтрального или натриевого стекла, пробки — из очищенной резины. В качестве моющих средств применяют гексаметафосфат, тринатрийфосфат, двууглекислую соду, стиральные порошки «Новость», «Лотос», «Астра», соляную и серную кислоты, раствор двухромовокислого калия в серной кислоте (хромпик).

1.1. Приготовление хромпика. Берут 40 г двухромовокислого калия, помещают в фарфоровую кружку и растворяют в небольшом количестве воды. Затем добавляют осторожно концентрированную серную кислоту до общего объема 1 л. Раствор хромпика должен быть желтовато-коричневого цвета. Хромпик считается отработанным тогда, когда его цвет изменится в зеленый. Это свидетельствует о том, что хромовая кислота восстановилась; такие растворы непригодны для употребления и бракуются. Хромовая смесь обладает крайне едкими свойствами, поэтому с ней надо работать, соблюдая большую осторожность.

1.2. Обработка стеклянной посуды. Основным требованием, предъявляемым к стеклянной посуде для выращивания клеточных культур, является хорошая ее обработка, так как методика культивирования клеток непосредственно на стекле требует абсолютно чистой поверхности.

В каждой лаборатории используется метод, наиболее удобный, экономичный и дающий наилучшие результаты. Наиболее распространенными способами обработки посуды являются следующие.

1.2.1. *Первый способ.* Новую посуду очищают от загрязнения ершами механическим путем, ополаскивают водой и обрабатывают хромовой смесью (хромпиком). Хромовую смесь вносят в сосуд, обводя внутреннюю поверхность. Избыток сливают. Контакт хромпика со стеклом продолжается в течение 2—3 ч. После обработки хромпиком посуду необходимо промыть водопроводной водой (не менее 10 раз) и сполоснуть 8—10 раз дистиллированной водой. При этом необходимо внимательно следить за тем, чтобы вода равномерно стекала со стенок посуды.

1.2.2. *Второй способ.* Всю посуду, бывшую в употреблении, помещают в воду. В этом случае остатки белковых веществ не будут высыхать, что очень облегчает последующее мытье. Такую посуду обрабатывают 0,3—0,5%-ным раствором детергента (порошки «Новость», «Лотос» и др.). Моют посуду в теплом растворе детергента ершами. Затем тщательно ополаскивают в теплой проточной водопроводной воде (6—8 раз), причем каждый раз набирают полный сосуд и сильно встряхивают, пока вода полностью не выльется. После этого столько же раз промывают в дистиллированной воде. Применение детергентов сокращает процессы обработки посуды: отпадает необходимость кипятить ее и промывать в растворе соляной кислоты.

1.2.3. *Третий способ.* Новую стеклянную посуду очищают от загрязнения ершами, ополаскивают водопроводной водой, затем погружают в бак с моющим раствором (150 г тринатрийфосфата или 30 г одного из вышеуказанных стиральных порошков на 10 л воды) и посуду кипятят в этом растворе в течение 1 ч. При этом посуда должна быть полностью погружена в раствор. После этого ее моют ершами в теплой воде и тщательно промывают струей водопроводной воды, помещают в 1—2%-ный раствор соляной кислоты для нейтрализации щелочи на 5 мин или 3—4 раза ополаскивают в этом растворе, вновь ополаскивают 4—5 раз проточной водопроводной водой и 5—6 раз — дистиллированной водой.

В ряде лабораторий, на некоторых биофабриках вымытую посуду перед сушкой кипятят в дистиллированной воде 1—3 ч. Равномерное стекание дистиллированной воды с поверхности и отсутствие капелек воды на стенках сосудов являются показателем хорошей мойки.

Если после ополаскивания капельки воды видны на стенках, посуду моют повторно вышеуказанным способом. Ванны, бак и тазы для мойки посуды должны быть обезжирены кальцинированной содой или хромпиком.

1.2.4. Посуду, загрязненную жиром, необходимо прокипятить в растворе тринатрийфосфата, промыть горячей водопроводной водой и вымыть, как указано выше. Если при этом посуда остается жирной, ее следует дополнительно обработать раствором хромпика, тщательно прополоскать проточной водопроводной водой и в трех сменах дистиллированной воды.

1.2.5. Отработанные пипетки хранят в банке с дистиллированной водой, затем их обрабатывают хромпиком, тщательно промывают проточной дистиллированной водой.

1.3. Стерилизация посуды. Вымытую посуду сушат в сухожаровых шкафах, устанавливая вниз горлышками.

Высушенную посуду монтируют: матрасы, флаконы, бутыли закрывают ватно-марлевыми пробками, сверху покрывают листом бумаги из пергамента или полупергамента и завязывают суровой ниткой.

Стеклянную посуду стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 150°С 2 ч, 160°С — 1 ч, при 180°С — не менее 30 мин (следует иметь в виду, при 170°С бумага и вата желтеют и при более высокой температуре обугливаются). Контролем стерильности посуды является почернение сахарозы, которую помещают в запаянных пробирках на всех полках, где размещена посуда. Горячую посуду выгружать из сушильного шкафа не рекомендуется, так как она при быстром остывании вне сушильного шкафа запотевает и в нее засасывается нестерильный воздух. Стеклянную посуду с ватно-марлевыми и резиновыми пробками стерилизуют в автоклаве в течение 1 ч при 1—1,5 атм.

Контролем соблюдения режима стерилизации служит индикатор бензойная кислота, которая плавится при температуре свыше 121°С. Ампулы с кислотой кладут в контейнеры перед автоклавированием. Открывать автоклав следует только после полного остывания и когда стрелка манометра находится на нуле. При несоблюдении этих правил посуда может лопнуть от быстрой смены температуры или запотеть, что нежелательно.

1.4. **Обработка резиновых изделий.** Новые, не бывшие в употреблении резиновые трубки и пробки кипятят в течение 30 мин двукратно в 5%-ном растворе двууглекислой соды ($NaHCO_3$). После каждого кипячения их тщательно отмывают водопроводной водой. После этого резиновые трубки, пробки кипятят в 2%-ном растворе соляной кислоты в течение 10—15 мин, промывают водопроводной и дистиллированной водой, кипятят 30 мин в дистиллированной воде, промывают и автоклавируют при 1,5 атм 1—$1^1/_2$ ч. Резиновые трубки и пробки, бывшие в употреблении, промывают водопроводной водой, затем дистиллированной водой, кипятят 10 мин в дистиллированной воде, монтируют и автоклавируют при 1,5 атм 1—$1^1/_2$ ч.

1.5. **Обработка инструментов.** Инструменты моют водопроводной водой, загрязненные части очищают ватным тампоном с двууглекислым натрием, промывают дистиллированной водой, вытирают насухо чистым полотенцем и дополнительно просушивают в сушильном шкафу или на открытом воздухе. Перед работой инструменты кипятят в дистиллированной воде 30 мин.

2. **Растворы и питательные среды.**

Для выращивания культур клеток применяют солевые изотонические растворы, на основе которых готовят питательные среды. Все растворы готовят из химически чистых солей на деминерализованной (сопротивление не более $1—2 \cdot 10^{-6}$ Ом/см) или свежеприготовленной бидистиллированной воде.

2.1. Сбалансированные солевые растворы Хенкса, Эрла, Тироде, г/л

Компоненты	Растворы		
	Хенкса	Эрла	Тироде
NaCl	8,0	6,8	8,0
KCl	0,4	0,4	0,2
$CaCl_2$	0,14	0,2	0,2
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1	—	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	0,1	—
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,06	—	—
KH_2PO_4	0,06	—	—
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	0,125	0,05
Глюкоза (медицинская)	1,0	1,0	1,0
Фенолрот (водорастворимый)	0,02	0,02	0,02
$NaHCO_3$	0,6	2,2	1,0

Соли растворяют в строгой последовательности, указанной в прописи. Последующую соль добавляют только после полного растворения предыдущей. Приготовленный раствор стерилизуют фильтрацией через

пластины СФ или EKS-2 (или миллипоровые фильтры). Хранят раствор при 4°С в течение 2 мес.

Солевые растворы Хенкса, Эрла, Тироде можно стерилизовать автоклавированием при 0,7 атм в течение 30 мин, но с условием, что растворы $CaCl_2$, $MgCl_2$ и глюкозы стерилизуют в отдельных колбах, и после остывания все три раствора соединяют в стерильных условиях с растворами остальных солей.

2.2. Рабочий раствор Хенкса (для промывания тканей). При приготовлении рабочего раствора Хенкса последовательно растворяют, г/л: NaCl — 8,0; KCl — 0,4; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,1; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,06; KH_2PO_4 — 0,06; фенолрот — 0,02 (или 2 мл 0,5%-ного водного раствора).

Приготовленный раствор (упрощенный, без $CaCl_2$, глюкозы и соды) стерилизуют автоклавированием при 0,7 атм в течение 30 мин. Перед работой pH раствора Хенкса доводят до 7,2 стерильным 7,5%-ным раствором соды.

2.3. Растворы, применяемые для подведения pH среды.

2.3.1. *Раствор двууглекислого натрия* ($NaHCO_3$). Для приготовления 7,5%-ного раствора соответствующую навеску соды ($NaHCO_3$) высыпают в бутыль с отмеренным количеством теплой бидистиллированной воды, тщательно перемешивают и после полного растворения соды раствор разливают по флаконам и стерилизуют автоклавированием при 0,7 атм 30 мин.

2.3.2. *Раствор фосфорнокислого калия однозамещенного* (KH_2PO_4) *и уксусной кислоты* (C_6H_8O). Для подкисления среды используют 10%-ный раствор фосфорнокислого калия или 3%-ный раствор уксусной кислоты, который готовят из ледяной уксусной кислоты. И тот и другой растворы стерилизуют автоклавированием при 0,7 атм 30 мин.

2.4. Раствор версена (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). Версен применяют для снятия монослоя выросших клеток со стекла. Его готовят, как 0,02%-ный раствор соли в бидистиллированной воде. Для приготовления 0,02%-ного раствора версена последовательно растворяют, г/л: NaCl — 8,0; KCl — 0,2; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ — 1,15; KH_2PO_4 — 0,2; версен — 0,2.

Приготовленный раствор разливают по флаконам и стерилизуют автоклавированием при 0,7 атм в течение 30 мин. Перед работой pH раствора доводят до 7,2—7,4 раствором соды.

2.5.0,3%-ный раствор гидролизата мышечных белков (среду ГМБ) на растворе Хенкса применяют как питательную среду для культур клеток. Для приготовления среды ГМБ в 1 л солевого раствора Хенкса растворяют 3 г порошка гидролизата мышечных белков (сухого Хоттингера). Как и при приготовлении среды ГЛА, в среду ГМБ добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 100 000 ЕД/л) и фенолрот; pH среды доводят до 7,0—7,2. Стерилизуют среду ГМБ фильтрованием через пластины СФ, EKS-2 или миллипоровые фильтры.

2.6. Приготовление среды Игла из сухих компонентов (производство Олайнского завода химреактивов Латвийской ССР). Завод выпускает упаковку сухой среды Игла, состоящую из трех флаконов. Каждая такая упаковка рассчитана на приготовление 10 л среды Игла. Флакон № 1 содержит набор аминокислот и витаминов на 10 л среды; флакон № 2 содержит набор солей для раствора Эрла; флакон № 3 содержит натрий двууглекислый для доведения pH среды до значения 7,0—7,2 или выше.

Технология приготовления среды Игла:

а) флакон № 1, содержащий аминокислоты и витамины, растворить

в колбе с 1 л теплой бидистиллированной воды. В случае неполного растворения колбу необходимо подогреть до 40—50°С;

б) соли, глюкозу и индикатор фенолрот, содержащиеся во флаконе № 2, растворить в основной бутыли, в которую предварительно налить около 5 л бидистиллированной воды;

в) слить вместе раствор аминокислот и солевой раствор и довести общий объем до 10 л;

г) из флакона № 3 взять навеску соды ($NaHCO_3$) 3,0 г и растворить ее в общем объеме приготовленной среды;

д) для получения привычной окраски среды Игла можно добавить 10 мл 0,5%-ного раствора фенолрота;

е) добавить антибиотики — пенициллин и стрептомицин по 100 000 ЕД/л;

ж) стерилизовать фильтрацией через стерилизующие пластины СФ, EKS-2 или мембранные фильтры.

2.7. Раствор трипсина. Раствор трипсина готовят по следующей прописи, г/л: NaCl — 8,0; KCl — 0,2; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1; $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ — 1,42; KH_2PO_4 — 0,2; трипсин (Дифко) — 2,5 или (рижский) 5,0 г; бидистиллированной воды — до 1 л.

К раствору добавляют пенициллин 100 000 ЕД/л и стрептомицин 100 мг/л, устанавливают pH 7,4—7,6 добавлением 1%-ного раствора NaOH и фильтруют через пластины СФ или EKS-2 или миллипоры. Готовый раствор хранят при температуре 4—6°С в течение 8—10 дн. или в замороженном состоянии при минус 20°С — до месяца.

При разливе трипсина после фильтрации делают высевы на МПА и МПБ на стерильность, а также отливы раствора трипсина во флаконы (контроль на бактериальный пророст), которые оставляют при 37°С до использования трипсина в работу.

2.8. 0,5%-ный раствор гидролизата лактальбумина (среда ГЛА) на растворе Хенкса (расчет на 1 л). В 1 л рабочего раствора Хенкса растворяют 5 г порошка гидролизата лактальбумина, pH устанавливают добавлением 0,15 г сухой навески соды $NaHCO_3$ или 7,5%-ным раствором $NaHCO_3$ до 7,0—7,1, добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 100 000 ЕД/л) и фильтруют через стерилизующие пластины. Перед фильтрованием растворов трипсина и лактальбумина фильтровальные пластины промывают бидистиллированной водой из расчета 3 л на одну 300-миллиметровую пластину.

Первую порцию фильтруемого раствора (1,5—2 л) выбрасывают. После фильтрации, при разливе среды, для проверки на стерильность делают высевы среды на сахарный бульон и МПА. Всю серию среды оставляют на 7 дн. при 37°С и затем на 10 дн. при 16—18°С для проверки на бактериальную и грибковую контаминацию, после этого срока среду используют. Хранят питательную среду при 4°С до 4—6 мес.

2.9. Сыворотка крупного рогатого скота. Сыворотку крупного рогатого скота получают из крови клинически здоровых животных, доставленных из пунктов, благополучных по инфекционным заболеваниям скота. Кровь берут из яремной вены стерильным полым ножом с резиновым шлангом (в условиях мясокомбината) в стерильные бутыли емкостью 5 л. Каждую бутыль наполняют до 3 л крови.

Для полного отделения сыворотки кровь выдерживают при 37°С в течение 30 мин, обводят ее и оставляют при 4°С на 24 ч, после чего сыворотку сливают и центрифугируют (иногда 2—3 раза), чтобы получить прозрачную сыворотку. Стерилизуют сыворотку путем фильтрации через пластины СФ или EKS-2. После фильтрации сыворотку проверяют на стерильность путем высева на МПА и МПБ, полужидкий агар на

триптическом переваре бычьего сердца (на микоплазмы) и токсичность для клеточных культур. При выявлении контаминантов сыворотки не используют (отбраковывают).

Можно использовать сыворотку крупного рогатого скота (без консерванта), выпускаемую мясокомбинатом. Перед использованием ее проверяют на стерильность вышеуказанным способом. Хранят сыворотки при 2—4°С в течение 6 мес.

Все среды и растворы, используемые для выращивания культур клеток, должны быть стерильными, прозрачными и не иметь осадка. Растворы и среды, содержащие индикатор фенолрот, имеют красно-оранжевый цвет.

Питательные свойства вновь приготовленных серий среды ГЛА и сыворотки проверяют путем сравнения с заведомо качественными образцами сред и сыворотки. Смесь заведомо известных сред и сывороток или вновь приготовленных используют для выращивания культур клеток.

Пригодность среды и сыворотки оценивают методом исключения по следующей схеме.

Среда	Сыворотка	Рост клеток почки эмбриона коровы (ПЭК) в однослойной культуре
Известная	Неизвестная	
Неизвестная	Известная	
Известная	Известная	

Среда ГЛА с 10% сыворотки крупного рогатого скота должна обеспечить образование монослоя клеток ПЭК в матрасах в течение 4—5 дн. при посевной дозе 400—500 тыс. клеток/мл, со сменой среды через сутки культивирования.

А. Первичные клеточные суспензии и однослойные культуры

3. Приготовление однослойной культуры клеток почки эмбриона коровы (ПЭК).

3.1. Подготовка эмбрионов. В целях соблюдения правил асептики вся работа с клеточными культурами производится в стерильных условиях.

Используют эмбрионы крупного рогатого скота 2—7-месячного возраста, доставленные с мясокомбината в стерильных бидонах не позднее 2—3 ч после убоя животного. Эмбрионы раскладывают на стерильные эмалированные кюветы, поверхность эмбрионов фламбируют горящим ватным тампоном, смоченным в спирте, разрезают в области поясничных позвонков (со стороны спины) и извлекают почки на стерильные чашки Петри.

3.2. Подготовка ткани. После извлечения почек следует удалить капсулу, почку разрезать ножницами вдоль, вырезать почечную лохань и, поместив почки в стерильные стеклянные банки, измельчить на кусочки величиной 1—3 мм.

Кусочки ткани тщательно (6—7 раз) отмывают от эритроцитов и обрывков ткани рабочим раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500 ЕД/мл) и помещают в колбу для трипсинизации (колба стерильная под резиновой пробкой с магнитом). На 10—15 г ткани добавляют 150—200 мл 0,25%-ного раствора трипсина фирмы «Difco» pH 7,4—7,6, подогретого до 32—35°С, и помещают в колбу на инкубацию при 37°С на 30—40 мин. После этого колбу с кусочками тка-

ни и трипсином помещают на магнитную мешалку для дезагрегации кусочков.

Дезагрегацию проводят дробно до полного истощения ткани, т. е. через 10—15 мин перемешивания сливают суспендированные клетки в центрифужные флаконы, куда добавляют 5 мл сыворотки на 250 мл клеточной суспензии для инактивации трипсина, а в колбу с кусочками ткани заливают свежую порцию трипсина. В течение 5—6 экстракций происходит полная дезагрегация кусочков ткани. Выход клеток из 1 г ткани составляет 40—50 млн. Центрифугирование суспензии производят при 800—1000 об/мин 10 мин в центрифужных флаконах емкостью 0,25—0,5 л.

После центрифугирования надосадочную жидкость сливают (выбрасывают), а осадок клеток ресуспендируют в определенном объеме питательной среды — 0,5% ГЛА без сыворотки с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин) по 100 ЕД/мл. После подсчета клеток суспензию разбавляют до требуемого объема питательной средой с 10% сыворотки, pH которой 6,9—7,0. Эмбриональная почечная ткань после измельчения и промывания может быть оставлена на ночь в растворе 0,1%-ного трипсина в рефрижераторе при температуре 2—4°С. Трипсинизацию в этом случае проводят на следующий день.

3.3. Определение концентрации клеток. Концентрацию клеток в суспензии определяют путем подсчета в камере Горяева. К 1 мл пробы суспензии клеток добавляют 1 мл раствора краски (0,1%-ный раствор кристаллвиолета на 0,1 М раствора лимонной кислоты).

Состав краски для окрашивания клеток в суспензии: кристаллвиолет — 100 мг, лимонная кислота — 2,4 г, вода бидистиллированная — до 100 мл.

После перемешивания окрашенную суспензию вносят в камеру. При этом методе все клетки окрашиваются в темный цвет, и подсчитывается общее количество клеток. Подсчет производят при увеличении микроскопа: окуляр 7, объектив 20, по всей площади камеры, четырехкратно, каждый раз заряжая камеру вновь, причем во внимание берутся только те клетки, которые расположены в камере в границах, очерченных сеткой (225 больших квадратов). 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.

Число клеток в 1 мл среды определяют по формуле

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

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

Для упрощения подсчета среднее количество клеток в одной сетке умножают на 2200. Если суспензия предварительно разводилась в 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. После подсчета суспензию клеток дополнительно разводят до нужной посевной концентрации

в 1 мл среды. Например, 150 мл суспензии (в каждом миллиметре по 924 тыс. клеток) необходимо развести до концентрации 350 тыс. в 1 мл. Общее количество клеток $924\,000 \times 150 = 138\,600\,000$. Необходимо знать, до какого количества необходимо развести питательной средой суспензию $138\,600\,000 : 350\,000 = 396$, т. е. объем суспензии доводят до 396 мл, и каждый миллилитр такой суспензии будет содержать 350 тыс. клеток. В соответствии с результатами подсчета общий объем суспензии доводят до требуемой концентрации клеток добавлением той же питательной среды.

Жизнеспособность клеток в суспензии определяют с помощью 5%-ного водного раствора трипановой сини (в 100 мл бидистиллированной воды растворяют 500 мг краски, после этого раствор фильтруют через бумажный фильтр). При этом методе живые клетки не окрашиваются, а мертвые окрашиваются в синий цвет.

Процент жизнеспособности клеток в суспензии определяют по формуле

$$\frac{(\text{общее число клеток} - \text{число мертвых клеток})}{\text{общее число клеток}} \times 100.$$

Например, общее количество клеток в 1 мл — 462 000, из них число мертвых клеток 23 000:

$$\frac{462\,000 - 23\,000}{462\,000} \times 100 = 95\%.$$

Таким образом, жизнеспособность клеток в этой суспензии 95%.

Жизнеспособность клеток в первично-трипсинизированной суспензии колеблется в пределах 65—90%, в суспензии перевиваемых линий при пересевах 95—100%.

3.4. Приготовление однослойной культуры клеток почки эмбриона коровы (ПЭК). Для приготовления однослойной культуры концентрированную суспензию фильтруют через двухслойный марлевый или однослойный маркизетовый фильтр, разводят средой ГЛА с 10% сыворотки крупного рогатого скота (при посеве pH 6,9—7,0, при смене среды 7,2—7,3) так, чтобы в 1 мл содержалось 400—500 тыс. клеток, и засевают в культуральные сосуды: в литровые матрасы по 100 мл, в 1,5-литровые — по 200 мл, в пробирки — по 1,0 мл. Сосуды закрывают резиновыми пробками, на верхней поверхности матраса или пробирки делают надпись (почка эмбриона коровы, сокращенно — ПЭК) с указанием даты посева и инкубируют при 37°С надписью вверх до образования сплошного клеточного слоя. Через 24—48 ч сменяют среду в культурах на ГЛА с 5% сыворотки крупного рогатого скота, pH 7,2—7,3. Культура ПЭК формирует монослой на 4—5-е сут.

Перед заражением вирусом клеточные культуры просматривают макро- и микроскопически. Макроскопически среда в матрасах должна быть прозрачной и иметь красноватый цвет с легкой опалесценцией. Микроскопически культура должна покрывать стенку сосуда сплошным пластом фибробластоподобных и эпителиоподобных клеток.

Примечание. Так как при фильтрации клеточной суспензии происходит потеря не менее $^1/_3$ клеток, вместо фильтрации можно использовать отстаивание суспензии и аккуратный разлив готовой суспензии после подсчета клеток и доведения ее до нужного объема.

4. Приготовление однослойной культуры клеток тестикулов быка (ТБ)

4.1. Подготовка ткани. Тестикулы бычков 2—3-месячного возраста в мошонке с перевязанными семенными канатиками, помещенными в стерильный сосуд, доставляют с мясокомбината через 2—3 ч после убоя животного. Пинцетами Кохера помощник захватывает тестикулы и обжигает их над пламенем горелки, затем, также на весу, кожу мошонки обжигает тампоном со спиртом и после этого срезает ножницами кончик кожи мошонки и, подтягивая тестикул за семенной канатик, извлекает его.

После извлечения тестикулы помещают на стерильную чашку Петри, удаляют белочную оболочку, разрезают вдоль и вылущивают содержимое в стерильную стеклянную банку. Ткань тестикулов тщательно промывают рабочим раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500 ЕД/мл). После слива промывной жидкости ткань измельчают стерильными ножницами и помещают в трипсинизационную колбу с магнитом и трипсином. Соотношение ткани и трипсина 1 : 10—1 : 15. Для трипсинизации тестикулов следует использовать 0,15%-ный раствор трипсина на фосфатном буфере. Дезагрегацию ткани производят щадящим методом, дробно; длительность каждой экстракции 5—7 мин. Первую экстракцию проводят раствором трипсина, вторую — только солевым раствором Хенкса, затем повторяют процесс в той же последовательности.

После центрифугирования надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок клеток ресуспензируют в питательной среде (ГЛА с пенициллином и стрептомицином по 100 ЕД/мл), pH 6,9—7,0.

Подсчет клеток тестикулов производят вышеописанным методом. После подсчета клеток суспензию разбавляют до требуемого объема питательной средой с 10% сыворотки крупного рогатого скота.

4.2. Приготовление однослойной культуры тестикулов бычков (ТБ). Для приготовления однослойной культуры концентрированную суспензию разводят ГЛА с 10% сыворотки крупного рогатого скота до концентрации 200—300 тыс. клеток и засевают в культуральные сосуды: в литровые матрасы — по 100 мл, в 1,5-литровые — по 200 мл, в пробирки — по 1 мл. Сосуды закрывают резиновыми пробками и помещают надписями с датой посева вверх для выращивания при 37°С до формирования сплошного монослоя. Смену среды с 5% сыворотки и pH 7,0—7,2 следует производить через сутки. Монослой формируется на 2—3 сут.

Перед заражением клеточные культуры просматривают макро- и микроскопически, как указано для культуры ПЭК.

5. Приготовление однослойной культуры клеток почки эмбриона свиньи (ПЭС).

5.1. Подготовка эмбрионов. Используют эмбрионы свиньи до 2—3-месячного возраста, доставленные с мясокомбината не позднее 2—3 ч после убоя животного. Эмбрионы раскладывают на стерильные эмалированные кюветы, фламбируют поверхность их ватным спиртовым тампоном, разрезают в области поясничных позвонков (со стороны спины) и извлекают почки на стерильные чашки Петри.

5.2. Подготовка ткани. После извлечения почек следует удалить капсулу, почку разрезать ножницами вдоль, вырезать почечную лоханъ и, поместив почки в стерильные стеклянные банки, измельчать до величины кусочков 1—3 мм. Кусочки ткани тщательно (5—6 раз) отмывают от эритроцитов и обрывков ткани рабочим раствором Хенкса

с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500 ЕД/мл) и помещают в колбу для трипсинизации (колба стерильная с резиновой пробкой и магнитом). На 10—15 г ткани добавляют 150—200 мл 0,25%-ного раствора трипсина фирмы «Difco» с pH 7,4—7,6, подогретого до 32—35°С. Колбу с кусочками ткани и трипсином помещают на магнитную мешалку для дезагрегации кусочков после инкубации при 37°С в течение 30—40 мин.

Дезагрегацию проводят дробно, до полного истощения ткани, т. е. через каждые 7—10 мин перемешивания сливают суспензированные клетки в центрифужные флаконы, а в колбу заливают свежую порцию трипсина. В течение 5—6 экстракций происходит полная дезагрегация кусочков ткани. Выход клеток на 1 г ткани составляет 30—40 млн. Центрифугирование суспензии производят в центрифуге при 800—1000 об/мин 10 мин в центрифужных флаконах емкостью 0,25—0,5 л.

После центрифугирования надосадочную жидкость сливают (выбрасывают), а осадок клеток ресуспензируют в определенном объеме питательной среды (0,5% ГЛА с 10% сыворотки крупного рогатого скота) и антибиотиками (пенициллин и стрептомицин) по 100 ЕД/мл.

5.3. Определение концентрации клеток. Концентрацию клеток в суспензии определяют путем подсчета в камере Горяева.

5.4. Приготовление однослойной культуры почки эмбриона свиньи (ПЭС). Для приготовления однослойной культуры концентрированную суспензию фильтруют через двухслойный марлевый фильтр или однослойный маркизетовый, разводят ГЛА с 10% сыворотки крупного рогатого скота (pH 6,9—7,0) так, чтобы в 1 мл содержалось 400—500 тыс. клеток, и засевают в культуральные сосуды: в литровые матрасы — по 100 мл, в 1,5-литровые матрасы — 200 мл, в пробирки — по 1,0 мл. Сосуды закрывают резиновыми пробками с указанием даты посева и инкубируют при 37°С надписью вверх до образования сплошного клеточного пласта. Через 24—48 ч в культурах сменяют среду на ГЛА с 5% сыворотки крупного рогатого скота. Культура ПЭС формирует монослой на 3—4-е сут.

Макроскопически — среда в матрасах и флаконах должна быть прозрачной и иметь красноватый цвет с легкой опалесценцией. Микроскопически культура должна покрывать стенку сосуда сплошным пластом эпителиоидных клеток.

Культура ПЭС используется для изготовления вакцин, диагностических препаратов и для индикации различных вирусов.

6. Приготовление однослойной культуры клеток почки эмбриона овцы (ПЭО).

6.1. Подготовка эмбрионов. Используют эмбрионы овцы 1—4-месячного возраста. Все остальные операции по подготовке эмбрионов и ткани производят, как указано для эмбрионов коровы и свиньи.

6.2. Процесс трипсинизации ткани и определение концентрации клеток производят так, как указано для тканей эмбрионов коровы.

6.3. Приготовление однослойной культуры почки эмбриона овцы (ПЭО). Для приготовления однослойной культуры почки эмбриона овцы (ПЭО) концентрированную суспензию клеток после фильтрации и подсчета клеток разводят ГЛА с 10% сыворотки крупного рогатого скота или овец (pH среды 7,0—7,2) так, чтобы в 1 мл содержалось 300—400 тыс. клеток, и засевают в культуральные сосуды. Через 48 ч культивирования сменяют среду на ГЛА с 5% сыворотки. Культура ПЭО формирует монослой на 3—4-е сут.

7. Приготовление однослойной культуры почки теленка (ПТ).

7.1. Подготовка ткани. Используют почки телят до 2—4-месячного, иногда более старшего возраста, доставленные с мясокомбината в стерильной посуде в растворе Хенкса с антибиотиками (по 500 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина) не позднее 2—3 ч после убоя животного. Почки раскладывают на стерильные эмалированные кюветы, фламбируют поверхность ватным спиртовым тампоном, удаляют капсулу, срезают ножницами корковый слой каждой доли почки и, поместив его в стерильную стеклянную баночку, измельчают до величины кусочков 1—3 мм. Кусочки тщательно (6—7 раз) промывают рабочим раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500 ЕД/мл) и помещают в колбу для трипсинизации. На 10—15 г ткани добавляют 150—200 мл 0,25%-ного раствора трипсина фирмы «Difco» с pH 7,4—7,6, подогретого до 32—35°С. Ткань инкубируют в трипсине 40—60 мин при 37°С, после чего колбу с кусочками ткани и трипсином помещают на магнитную мешалку для дезагрегации кусочков. Дезагрегацию проводят дробно теплым трипсином, т. е. через 15—20 мин перемешивания сливают суспензированные клетки в центрифужные флаконы, а в колбу заливают свежую порцию трипсина. Таким способом дезагрегацию проводят до полного истощения кусочков.

Можно проводить дезагрегацию ткани одномоментно, т. е. кусочки ткани заливают трипсином и колбу помещают на магнитную мешалку на 1 ч для дезагрегации, после этого суспензию клеток в трипсине сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют. Центрифугирование суспензии производят в центрифуге ЦЛР-1 (или другой) при 800—1000 об/мин 10 мин в центрифужных флаконах емкостью 0,25—0,5 л.

После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспензируют во флаконе в определенном объеме питательной среды с антибиотиками, но без сыворотки. В этот флакон собирают все осадки для подсчета. После подсчета разводят суспензию до концентрации клеток 300—400 тыс/мл.

7.2. Приготовление однослойной культуры почки теленка (ПТ). Для приготовления однослойной культуры концентрированную суспензию фильтруют через двухслойный марлевый или однослойный маркизетовый фильтр и разводят ГЛА с 10% сыворотки крупного рогатого скота (pH 7,0—7,1) так, чтобы в 1 мл содержалось 300—400 тыс. клеток, и засевают в культуральные сосуды. Культуры инкубируют при 37°С через 48—72 ч, сменяют среду на ГЛА с 5% сыворотки крупного рогатого скота pH 7,2—7,4. Культура почки теленка формирует монослой на 5—7-е сут.

8. Методика приготовления однослойной культуры клеток почек новорожденных крольчат.

Для приготовления культуры клеток берут 2—5-дневных крольчат. Под наркозом их обезглавливают, отрезают лапки, хвост, снимают шкуру, а тушки кладут на стерильную салфетку на кювет. В боксе тушки крольчат прикрепляют спинкой вверх к парафиновой доске, предварительно обожженной. Спинку обрабатывают горящим спиртовым тампоном, вскрывают на уровне поясничных позвонков, извлекают почки и помещают их в стерильную чашку Петри, снимают капсулу, вырезают мозговое вещество, а корковую часть почек измельчают ножницами на кусочки величиной 1—3 мм. Тщательно отмывают кусочки ткани от остатков крови солевым раствором Хенкса или фосфатно-буферным раствором и подвергают дезагрегации в 0,25%-ном растворе трипсина. Трипсинизация может быть дробной или одномоментной с предварительной

инкубацией кусочков при 37°С 30—40 мин. Центрифугируют клетки при 800—1000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок ресуспендируют в питательной среде. Посевная доза клеток — 300—400 тыс. в 1 мл. Для роста клеток используют среды: Игла, 0,5%-ный гидролизат лактальбумина, 0,3%-ный гидролизат мышечных белков с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота; pH ростовой среды должен соответствовать при посеве клеток 7,0—7,2, при смене — 7,3—7,4. Монослой формируется на 3—4-е сут. Антибиотики добавляют в тех же концентрациях, что и для других видов тканей.

9. Методика приготовления однослойной культуры клеток из почек морских свинок.

1—2-дневных морских свинок под наркозом обезглавливают, обрезают лапки, снимают шкурку. Тушки кладут на обожженную парафиновую доску, прикалывают спинкой вверх, фламбируют, разрезают в области поясничных позвонков, удаляют почки. Почки помещают на чашку Петри, снимают капсулу, разрезают их вдоль, удаляя почечную лоханъ. Кусочки измельчают до 1—3 мм величиной, промывают в колбе солевым раствором Хенкса или буферным раствором до прозрачности раствора. Трипсинизируют кусочки ткани в 0,25%-ном растворе трипсина, обязательно с предварительной инкубацией ткани в течение 30 мин при 37°С в растворе трипсина (инкубация необходима, так как ткань почек морской свинки довольно жесткая, подобно мышиной и кроличьей). Трипсинизацию целесообразно проводить дробно до полного истощения кусочков ткани. Сливы производят через 15—20 мин; центрифугируют при 800—1000 об/мин 10—15 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок ресуспендируют в питательной среде. Посевная доза клеток морской свинки — 250—300 тыс/мл. Культивируют клетки в средах: Игла, 0,5%-ном гидролизате лактальбумина, 0,3%-ном гидролизате мышечных белков с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Монослой формируется на 3—4-е сут.

10. Методика приготовления однослойной культуры почек мыши.

Для получения однослойной культуры используют мышей 6—10-дневного возраста. Мышей под наркозом обезглавливают, тушки прикалывают к парафиновой доске спинкой вверх и обрабатывают горящим спиртовым тампоном. Вскрывают ножницами на уровне поясничных позвонков и извлекают почки на стерильные чашки Петри. С почек снимают капсулу, почки измельчают ножницами на кусочки величиной 1—3 мм, измельченную ткань промывают в стеклянной банке раствором Хенкса, перекладывают кусочки в колбу с магнитом и 0,25%-ным раствором трипсина. Трипсинизация — дробная, желательно с предварительной инкубацией в течение 30 мин. Каждая экстракция по 10—15 мин, центрифугируют при 1000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость сливают (выбрасывают), а осадок ресуспендируют в питательной среде, подсчитывают клетки. Посевная доза клеток почек эмбрионов мыши — 250—300 тыс. в 1 мл. Сплошной монослой формируется на 3—4-е сут. Для культивирования используют среды: 0,5%-ный гидролизат лактальбумина, 0,3%-ный гидролизат мышечных белков с 10% сыворотки крупного рогатого скота (pH 7,0—7,1).

11. Методика получения культур клеток из тканей куриного эмбриона.

Куриный эмбрион может служить исходным материалом для приготовления различных культур клеток. Чаще всего используют целые

эмбрионы. Для получения суспензии клеток берут куриные эмбрионы (КЭ) 9—11-дневного возраста, которые просматривают на овоскопе, отбирая яйца с подвижными эмбрионами и с хорошо выраженными сосудами. На скорлупе простым карандашом отмечают воздушное пространство (пугу). Яйца помещают в металлический лоток, поверхность их протирают йодированным спиртом и обжигают спиртовым факелом. Ножницами срезают скорлупу над пугой, пинцетом раскрывают скорлупную и хорионаллантоисную оболочку, извлекают эмбрионы и переносят в чашку Петри, удаляют голову и внутренние органы. Ткань измельчают ножницами на кусочки величиной 1—2 мм. Полученную массу 3—5 раз промывают раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 300 ЕД/мл) от слизи и кровяных элементов. Ткань КЭ дезагрегируют 0,15%-ным раствором трипсина, подогретого до 35°С с помощью пипетирования или при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Один цикл трипсинизации продолжается 10—15 мин. Процесс трипсинизации продолжают до полного истощения ткани. Клеточную суспензию в трипсине центрифугируют при 1000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок клеток ресуспендируют в питательной среде 0,5%-ного гидролизата лактальбумина в растворе Хенкса с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. Затем суспензию клеток фильтруют через 2 слоя стерильной марли и отбирают 1 мл суспензии для подсчета клеток. После подсчета клеток взвесь разводят питательной средой до концентрации 500—600 тыс. в 1 мл среды. Средний выход клеток из ткани одного 10-дневного эмбриона составляет 35—40 млн. Сплошной монослой клеток в культурах образуется через 2—3 дня при температуре 37°С.

Б. Перевиваемые клеточные культуры

12.1. Поддержание и использование перевиваемой линии клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Перевиваемая линия клеток СПЭВ получена в 1959 г. К. С. Куликовой и другими в Московском научно-исследовательском институте вирусных препаратов.

Клетки выращивают на среде 199 с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Сплошной монослой образуется через 3—4 дня после посева. Коэффициент пересева культур 1 : 4—1 : 6. Для снятия клеток со стекла используют 0,02%-ный раствор версена. Культура снимается бесцентрифужным способом. Время контакта с клетками при 37°С — 10—20 мин. Легкое покачивание культурального флакона ускоряет процесс версенизации. Версенизацию проводят до тех пор, пока при микроскопическом исследовании (об. 10, ок. 7) не будет обнаружено, что бо́льшая часть клеток отслоилась.

Культура представлена эпителиоподобными клетками. Цитоплазма клеток в основном гомогенная, иногда мелко вакуолизирована.

В цитоплазме около ядра отдельных клеток встречаются эозинофильные образования. Ядра клеток округлой или овальной формы с 2—5 ядрышками. Культура пересевается 2 раза в неделю. Если культура выращивается 6—7 дн., то при этом питательная среда слегка мутнеет за счет отслоения клеток в питательную среду. Мутность среды повышается при удлинении сроков инкубации с одновременным изменением pH среды в кислую сторону. Во всех подозрительных случаях необходим бактериологический контроль для выяснения причин помутнения.

Клетки, снятые с одного матраса Ру, можно высеять в 200 пробирок или 4—6 аналогичных матраса. Сбор клеток с литрового матраса достигает в среднем 35—40 млн.

12.2. Перевиваемая линия клеток почки овцы (ПО) получена в

1968 г. З. П. Мутузкиной в ВИЭВ в лаборатории культур тканей и питательных сред.

Культура клеток выращивается на 0,5%-ном гидролизате лактальбумина в растворе Хенкса с 10% сыворотки крупного рогатого скота.

Формирование монослоя происходит на 4—5-е сут. Выросшая культура отделяется от стекла смесью раствора версена с трипсином бесцентрифужным способом. Коэффициент пересева культуры 1 : 2—1 : 3. Культура представлена эпителиоподобными клетками и пересевается один раз в неделю. Митотический индекс этой культуры равен 16—20%.

Линия клеток почки овцы прошла более 250 пассажей.

12.3. Перевиваемая линия почки теленка (ПТ). Получена в ВИЭВ А. А. Поздняковым в 1971 г. Клетки выращивают на среде ГЛА с 10% сыворотки. Монослой формируется на 4—5-е сут, пересев осуществляется 1—2 раза в неделю. Клетки отделяют от стекла смесью раствора версена с трипсином 9 : 1 бесцентрифужным методом. Коэффициент пересева 1 : 4—1 : 6.

Клетки ПТ эпителиоподобного типа, полигональной формы, с хорошо выраженными границами. Линия пассируется более 90 пассажей.

12.4. Перевиваемые линии клеток из лимфоидных органов крупного рогатого скота (тимуса, селезенки).

12.4.1. *Линия клеток из тимуса эмбриона коровы (ТЭК)* получена в ВИЭВ А. А. Поздняковым и Л. С. Ратнером в 1972 г. Клетки выращивают на среде Игла с 10% сыворотки.

12.4.2. *Линия клеток из тимуса теленка (КТТ)* получена в ВИЭВ А. А. Поздняковым и Л. С. Ратнером в 1973 г. Культура клеток выращивается на среде Игла с 10% сыворотки.

Морфологическая картина перевиваемых культур ТЭК и КТТ сходна. Клетки эпителиоподобного типа, полигональной формы, плотно прилегают друг к другу.

Соотношение ядра и цитоплазмы 1 : 2—1 : 3, ядро овальной или округлой формы. Пересеиваются культуры через каждые 3—4 дня бесцентрифужным методом. Коэффициент пересева 1 : 4—1 : 6. Митотический индекс 30—40%.

Клетки ТЭК и КТТ могут культивироваться в суспензионном состоянии на магнитной мешалке и в роллерных устройствах. Клетки ТЭК прошли более 100 пассажей, КТТ — 90.

12.4.3. *Штамм клеток селезенки эмбриона коровы (СЭК)* выращивается на среде Игла с 10% сыворотки. Клетки культуры вытянутой формы, фибробластоподобного типа, формируют монослой на 3—4-е сут. Ядра клеток овальные, разного размера, с 2—3 ядрышками.

Пересев — через каждые 3—4 дня, коэффициент пересева 1 : 2. Штамм перевит 36 раз и сохраняет исходные свойства.

12.5. Условия культивирования перевиваемых линий клеток. Работа с культурами клеток проводится 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 следует принять 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, растворов и особенно сыворотки.

Необходимо проводить контроль каждой новой серии сыворотки на бактериальную 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 100 тыс. в 1 мл. Суспензия клеток высевается в три 100-миллилитровых матраса по 15 мл в каждый.

Сыворотка считается 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, пользуются матрасами 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 пересева. 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 делает данную культуру непригодной для пассажа.

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 пересева после отделения клеток от стекла с помощью 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 в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок клеток ресуспендируют в небольшом количестве питательной среды. Затем берут 1 мл клеточной суспензии и подсчитывают клетки.

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

В матрасы с монослоем клеток вносится диспергирующий раствор (смесь версена с трипсином), и их 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 поверхности, свободной от клеток. 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.

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 100 тыс. в 1 мл. При засеве суспензии в пробирки содержимое колбы необходимо постоянно перемешивать с помощью пипетирования или периодическим встряхиванием вручную, чтобы поддержать равномерную концентрацию клеток. При внесении 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 ра тут без смены питательной среды.

Клетки, осев на поверхности стекла, прикрепляются к нему в течение нескольких часов.

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 поддержании матричной культуры пересев производится не менее чем в 2 матраса. Один из них служит для последующего пассажа, а второй сохраняется до тех пор, пока в пассажных культурах будет установлен удовлетворительный рост.

При обнаружении неравномерного, недостаточного роста, а также дегенеративных изменений в клетках такие культуры выбраковываются.

Наибольшая митотическая активность перевиваемых клеточных культур наблюдается через 24—48 ч культивирования, к этому времени она составляет для культур СПЭВ, ТЭК, КТТ и ПТ 30—40%, а для культуры ПО и 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 высевается 8 млн., литровые — 6 млн., 0,5-литровые — 4 млн., 0,25-литровые — 2 млн. и 0,1-литровые матрасы — 1 млн. клеток.

Коэффициент пересева клеточных линий СПЭВ, ПТ, ТЭК, КТТ 1 : 4—1 : 6, а для ПО и штамма СЭК — 1 : 2—1 : 3. Клетки, снятые с одного матраса, рассеивают на 4—6 аналогичных матрасов для культур СПЭВ, ПТ, ТЭК и КТТ и на 2—3 матраса для культуры ПО и СЭК.

В. Диплоидные клеточные штаммы

Для получения диплоидных штаммов клеток животного происхождения используют как эмбриональные, так и постнатальные ткани, но лучшей потенцией роста обладают эмбриональные ткани.

13.1. Подготовка эмбрионов. Используют эмбрионы коров 1—3-месячного, эмбрионы овец 1—2-месячного, эмбрионы свиней — до 2-месячного возраста. Эмбрионы доставляют с мясокомбината не позднее 2—3 ч после убоя животного, раскладывают на стерильные эмалированные кюветы, фламбируют спиртовым тампоном и разрезают для изъятия почек со стороны спины в области поясничных позвонков. Для изъятия сердца или легкого эмбрион разрезают со стороны грудной клетки. Органы извлекают на стерильные чашки Петри.

13.2. Подготовка ткани. После извлечения органов их измельчают в стеклянной банке до величины кусочков 1—3 мм, тщательно (5—6 раз) отмывают рабочим раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500 ЕД/мл) и помещают в колбу для трипсинизации.

В настоящее время используют два метода дезагрегации ткани при получении диплоидных клеток в зависимости от возраста эмбрионов: трипсинизацию проводят путем пипетирования кусочков (эмбрионы до месячного возраста) или механическим способом. В колбочку с кусочками ткани заливают 5—10 мл трипсина и пипетируют кусочки до полного их растворения в 1—2 порциях трипсина, после чего суспензию клеток сливают в центрифужные флаконы и центрифугируют при 800—1000 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость удаляют, а клетки ресуспендируют в среде Игла с 10% (pH 7,2—7,3) фетальной сыворотки или сыворотки крупного рогатого скота. После подсчета клеток их засевают в культу-

ральные флаконы для выращивания монослоя. Если возраст эмбрионов более месяца, трипсинизацию следует проводить на магнитной мешалке дробно, т. е. каждую экстракцию клеток сливать через 5—7 мин перемешивания кусочков ткани в трипсине. Центрифугируют клетки при 800—1000 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок ресуспендируют в среде Игла, pH 7,2—7,3, с 10 % фетальной или сыворотки крупного рогатого скота. Подсчитывают клетки в камере Горяева, ресуспендируют до конечной концентрации (300—400 тыс. клеток в 1 мл для клеток почек, 500—600 тыс.— для клеток сердца и легкого) и разливают в культуральные флаконы, которые помещают при 37°С для выращивания в термостат.

Через 3—4 сут после формирования монослоя ростовую среду удаляют из сосуда, пласт клеток заливают подогретым до 35—37°С раствором трипсина или смесью трипсина с версеном в соотношении 9 : 1 и оставляют для контакта на 3—5 мин. После набухания клеток, что устанавливается при макроскопическом наблюдении, жидкость сливают (на выброс) и оставляют этой смеси на один матрас РУ — 5—10 мл. После полного отделения клеток от стекла их тщательно пипетируют градуированной пипеткой, добавляют свежей питательной среды и после перемешивания клеток до однородной взвеси ее разбавляют средой 1 : 2 и разливают во флаконы. Флаконы с клеточной суспензией помещают в термостат надписью кверху, где пишут название штамма, номер пассажа и дату пересева. Обычно клетки пересевают в разведении 1 : 2, а если через 4—5 дн. не сформировался монослой, то следует произвести очередной пассаж, но не уменьшая концентрации клеток, т. е. производят пересев 1 : 1 с предварительной неполной сменой среды в культуре за 1—2 сут до очередного пассажа. Наиболее активное размножение клеток диплоидных штаммов наблюдают в период от 5 до 20 пассажей, затем активность клеточного метаболизма значительно снижается, что можно наблюдать по изменениям pH ростовой среды в щелочную сторону. Необходимо отметить, что клетки диплоидных штаммов не обладают такой высокой метаболической активностью, как клетки перевиваемых линий; и резкого закисления среды в период роста диплоидных клеток до формирования монослоя не наблюдается, что свойственно перевиваемым клеткам. Пересев клеток проводят через 3—4 сут после того, как сформировался монослой. Этот процесс называется пассированием. В диплоидной культуре в результате митотического деления образуются генетически равноценные дочерние популяции клеток, которые сохраняют диплоидный набор хромосом. Диплоидные штаммы путем пересева можно поддерживать в течение 50—55 пассажей.

На уровне 5—10 — 20-го пассажей клетки высевают во флаконы со стеклами для цитоморфологического и цитохимического контроля. Ежедневно, начиная с 1 сут и до формирования монослоя, стекла с культурой фиксируют в растворе Буэна и окрашивают гематоксилинэозином. Для кариологических исследований готовят метафазные пластинки, подсчитывают не менее 50 пластинок, определяют количество хромосом и составляют кариологическую характеристику диплоидных штаммов (кариотип), выделяя стволовую линию. Сохранение клеточными штаммами фибробластоподобного типа роста и нормального для соматических клеток данного вида животных набора хромосом свидетельствует о диплоидности штамма.

Разработаны методы длительного хранения диплоидных клеток в жидком азоте. Это позволяет создать большой запас клеток, тщательно проверенных по всем показателям. Консервация клеток штаммов дает

возможность проводить исследования в одной и той же клеточной системе в течение продолжительного времени.

В качестве исходного материала используют флаконы со сформировавшимся монослоем.

Ниже приведены данные о количестве хромосом в клетках тканей некоторых видов лабораторных и домашних животных.

Количество хромосом у человека, домашних и лабораторных животных (2 n)

Человек	46	Золотистый хомяк	44
Лошадь	66	Крыса	42
Корова	60	Кошка	38
Овца	54	Мышь домовая	40
Коза	60	Собака	78
Свинья	38	Голубь	80
Кролик	44	Утка	80
Морская свинка	64	Индейка	82

14. Субкультуры.

Субкультуры можно получить практически из всех первично-трипсинизированных тканей. Экономичность субкультур очевидна. По чувствительности к вирусам субкультуры не уступают первичным клеточным культурам.

При получении субкультур отделять клетки от стекла можно механически (соскабливанием пипеткой) или химическим путем — воздействием смеси 0,02%-ного раствора версена и 0,25%-ного раствора трипсина в соотношении 9 : 1, подогретых до 35—37°С.

При получении субкультур можно использовать центрифужный и бесцентрифужный методы. Предпочтительнее последний, при котором наблюдается меньшая потеря клеток и меньше опасности контаминировать клетки.

Из сосудов с выросшим клеточным монослоем удаляют ростовую питательную среду, добавляют смесь, указанную выше, в количестве 50—100 мл в литровый матрас, 25—50 мл — в 0,5-литровый и 10—15 мл — во флакон емкостью 100 мл и оставляют флаконы для взаимодействия с диспергирующим раствором на 5—10 мин. После макроскопически видимого набухания клеток диспергирующую смесь удаляют (отбрасывают), оставляя в литровом матрасе 5—10 мл, в 0,1-литровом — 1—2 мл до полного отделения клеток от стенок сосуда.

После полного отделения клеток их тщательно дезагрегируют градуированной пипеткой до получения однородной взвеси, вносят свежую питательную среду с 5% сыворотки крупного рогатого скота (желательно инактивированной при 56°С 30—60 мин), разливают суспензию в сосуды для выращивания 1 : 2 и помещают в термостат. Через 2—3 сут субкультура формирует монослой.

Куриные фибробласты не поддаются субкультивированию.

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