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.

БОТУЛИЗМ

Методические указания по лабораторной диагностике ботулизма

(Утверждены Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 2 ноября 1982 г.)

1. Общие положения.

1.1. Ботулизм — острая кормовая токсикоинфекция, вызываемая токсином возбудителя этой болезни и протекающая с характерными поражениями центральной нервной системы.

Возбудитель — строгий спорообразующий анаэроб Cl. botulinum типов A, B, C, D, E, F. Все типы сходны по морфологическим и культуральным свойствам, но различаются иммунологически: каждый из них нейтрализуется только гомологичной антитоксической сывороткой.

1.2. Диагноз на ботулизм ставят на основании обнаружения боту-

линического токсина в пробах корма и патологического материала или выделения культуры возбудителя болезни.

1.3. Для исследования в лабораторию направляют пробы подозрительных кормов (силос, зерно, комбикорма, мясные и рыбные отходы), а также содержимое желудка, кусочки печени павших и кровь от больных животных.

Патологический материал берут не позднее чем через 2 ч после гибели животных.

2. Подготовка материала к исследованию.

2.1. Доставленный материал исследуют одновременно на наличие ботулинических токсинов и возбудителя, кровь — только на наличие ботулинических токсинов.

2.2. Пробы корма, содержимое желудка, кусочки печени массой 25—30 г тщательно растирают в ступке со стерильным песком и заливают равным или двойным объемом физиологического раствора. Полученную гомогенную взвесь оставляют на 2 ч при комнатной температуре для экстрагирования. Две трети взвеси используют для обнаружения токсина и одну треть — для выделения возбудителя.

2.3. Кровь больного животного исследуют без разведения. Ботулинический токсин в крови быстро разрушается, поэтому исследовать ее следует на месте (в хозяйстве).

3. Обнаружение ботулинического токсина.

3.1. Экстракты проб корма и патологического материала фильтруют через вату или центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин, делят на две части и одну из них прогревают в кипящей водяной бане в течение 20—30 мин.

3.2. Каждым фильтратом (кипяченым и некипяченым) исследуемого материала заражают внутривенно или внутрибрюшинно двух белых мышей массой 16—18 г в дозе 0,5—0,8 мл. Морским свинкам массой 300—350 г материал вводят подкожно в дозах 3—5 мл (одной свинке — кипяченый фильтрат, другой — некипяченый).

При наличии ботулинического токсина животные, зараженные некипяченым фильтратом, погибают на 2—5-е сут с характерной клиникой ботулизма (шаткая походка, учащенное дыхание, расслабление скелетной мускулатуры, западание брюшной стенки — «осиная талия»). Животные, которым вводили кипяченый фильтрат, остаются здоровыми.

3.3. Кровь больных животных сразу после взятия вводят внутрибрюшинно двум белым мышам или морским свинкам в дозах, указанных в п. 3.2. Наблюдение за животными ведут в течение 5 сут и судят о наличии токсина по появлению клинических признаков.

3.4. При обнаружении в исследуемом материале токсина ставят реакцию его нейтрализации с типовыми ботулиническими сыворотками, которые выпускают для практического использования предприятия Минздрава СССР.

3.5. Так как в исследуемом материале могут находиться 2 (или больше) типа токсинов, реакцию нейтрализации ставят по следующей схеме.

3.5.1. Сыворотки типов А, В, С, D, Е, взятые в объеме 0,2 мл, смешивают в одной пробирке и добавляют в нее 1,0 мл исследуемой взвеси. Смесь выдерживают в течение 15 мин при комнатной температуре или 30 мин при температуре 35—37°С. Затем по 0,8 мл вводят внутрибрюшинно двум белым мышам массой 16—18 г. Одновременно двум другим животным вводят исследуемый материал в той же дозе в смеси с равным количеством физиологического раствора (контроль). При на-

личии ботулинического токсина белые мыши, которым исследуемый материал вводили в смеси с сыворотками, остаются живыми, а контрольные — погибают на 2—4-е сут с характерной клинической картиной ботулизма. При отсутствии необходимости определения типовой принадлежности токсина полученные результаты являются основанием для постановки диагноза.

3.5.2. Для определения типовой принадлежности ботулинического токсина ставят реакцию нейтрализации по следующей схеме: исследуемый материал по 2,4 мл разливают в шесть пробирок, в пять из которых добавляют по 0,6 мл типовых сывороток: в первую — тип А, во вторую — тип В, в третью — тип С, в четвертую — тип D, в пятую — тип Е, в шестую — такой же объем физиологического раствора. Пробирки со смесью выдерживают, как указано в подпункте 3.5.1. Затем смесь каждой сыворотки с исследуемым материалом вводят отдельным шприцем внутривенно или внутрибрюшинно двум белым мышам в дозе 0,8—1,0 мл. Результаты реакции нейтрализации учитывают в течение 4 дней.

Животные, которым исследуемый материал вводили в смеси с гомологичной сывороткой, остаются живыми, а остальные — погибают с клиническими признаками ботулизма.

3.6. При обнаружении в исследуемом материале ботулинического токсина дальнейшую работу по выделению культуры не проводят.

4. Выделение возбудителя.

4.1. Пробы корма и патологического материала, подготовленного, как указано в п. 2.2, высевают в жидкие питательные среды (Китта — Тароцци, бульон Хоттингера) с pH 7,2—7,4 под вазелиновым маслом с обязательным добавлением стерильного раствора глюкозы в количестве 0,5% (в пересчете на сухое вещество). Среды перед посевом и добавлением глюкозы подвергают регенерации. Среду Китта — Тароцци прогревают в кипящей водяной бане в течение 15—30 мин, после чего быстро охлаждают до 45—50°С. Посев лучше делать во флаконы емкостью 100—250 мл, которые на две трети заполняют питательной средой. Слой масла должен быть не менее 0,5 см.

Каждый образец материала высевают не менее чем в два флакона. Один из них прогревают в течение 1 ч при 80°С. Одновременно делают посев на обычные среды (МПБ и МПА) для контроля на аэробную контаминацию.

4.2. Посевы помещают в термостат при температуре 30—35°С. Рост ботулинического микроба характеризуется постепенным помутнением среды (на 2—3-и сут) и газообразованием с характерным запахом прогорклого масла.

При микроскопическом исследовании полученной культуры обнаруживают грамположительные палочки с концевыми спорами, по конфигурации напоминающие теннисную ракетку.

4.3. При появлении характерного роста и обнаружении в мазках из культур палочек, сходных с Cl. botulinum, наличие токсина в культуральной жидкости определяют на 5—7-е сут в соответствии с методикой, изложенной в пп. 3.2 и 3.5.

4.4. Для выделения чистой культуры возбудителя ботулизма первичный посев прогревают в течение 1 ч при 80°С и делают дробный посев в чашки Петри с кровяным агаром Цейсслера. Чашки помещают в анаэростат, где создаются необходимые условия для анаэробиоза, учитывая, что возбудитель ботулизма — строгий анаэроб (разрежение воздуха не выше 5 мм рт. ст.).

Через 2—4 сут культивирования просматривают и отбирают вырос-

шие колонии. Колонии Cl. botulinum круглые или с корневидными отростками, бесцветные или сероватые с интенсивной зоной прозрачного гемолиза.

4.5. Диагноз считают установленным:

при обнаружении ботулинического токсина в исследуемом материале (без выделения культуры);

при выделении из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя ботулизма, с последующим определением биологическим методом ее токсичности.

gost.e-ecolog.ru