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.

Временные методические указания по постановке реакции диск-преципитации при диагностике сибирской язвы и идентификации ее возбудителя

(Утверждены Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 24 июня 1980 г.)

1. Общие положения.

1.1. Реакция диск-преципитации используется при диагностике сибирской язвы и дифференциации ее возбудителя от подобных ему сапрофитных микробов рода Bacillus.

1.2. Реакция диск-преципитации основана на взаимодействии антигена — нативных продуктов метаболизма растущего в жидкой питательной среде возбудителя сибирской язвы — с антителами преципитирующей сибиреязвенной сыворотки, выражающемся образованием диска преципитации в слое агарового геля, расположенного между антигеном и сывороткой.

1.3. Реакцию диск-преципитации используют при исследовании только свежего патологического материала.

Загнивший материал исследуют по реакции преципитации, поставленной общепринятым пробирочным методом с экстракцией антигенов.

2. Компоненты реакции, материалы и приготовление системы.

2.1. Для постановки реакции диск-преципитации необходимо иметь:

преципитирующую сибиреязвенную сыворотку;

очищенный 1%-ный агаровый гель (приготовление см. в приложении) или 1%-ный агар Дифко;

жидкую питательную среду, пригодную для культивирования возбудителя сибирской язвы (мясо-пептонный бульон, среда ГКИ, бульон Хоттингера с 40% инактивированной сыворотки крови или др.);

стерильные бактериологические пробирки, мерные и пастеровские пипетки.

2.2. Приготовление системы для постановки реакции диск-преципитации.

2.2.1. Преципитирующую сибиреязвенную сыворотку разливают по 0,5—1 мл в стерильные бактериологические пробирки.

2.2.2. На поверхность сыворотки, по стенке пробирки, наслаивают мерной или пастеровской пипеткой расплавленный и охлажденный до 45—50°С 1%-ный агаровый гель столбиком высотой 5—7 мм. Пробирки необходимо держать в вертикальном положении до застывания агара.

2.2.3. На поверхность застывшего агара вносят 1—1,5 мл жидкой питательной среды. При идентификации культур, выделенных из объек-

тов внешней среды и сырья животного происхождения, в качестве жидкой питательной среды лучше использовать среду ГКИ или бульон Хоттингера с сывороткой крови, в этом случае одновременно можно провести исследование на капсулообразование.

2.2.4. Систему готовят и используют в день постановки реакции.

3. Постановка реакции диск-преципитации.

3.1. При исследовании патологического материала и мяса вынужденно убитых животных посев проводят пастеровской пипеткой в мясопептонный бульон, находящийся над слоем агарового геля. Не следует вносить в среду большое количество крови или крупные кусочки кровенаполненных органов, так как это затрудняет обнаружение специфического диска преципитации вследствие окрашивания геля.

3.2. При идентификации культур посевы делают из каждой колонии в отдельности или высевают суспензию, приготовленную из нескольких колоний (5—10).

3.3. Посевы выдерживают в термостате при 37—38°С в течение 16—20 ч.

4. Учет результатов.

4.1. Учет результатов проводят визуально через 16—20 ч инкубации посевов в термостате и при отрицательном результате — повторно через 3—4 ч дополнительной инкубации.

4.2. Пробирки вынимают из термостата и оставляют на 10—15 мин при комнатной температуре, после чего просматривают в проходящем свете на черном фоне.

4.3. Возбудитель сибирской язвы образует в средней части столбика агарового геля тонкую с четкими границами белую линию (диск) преципитации, которая сохраняется в течение 4 дн.

4.4. Почвенные сибиреязвенноподобные сапрофитные бациллы, за исключением некоторых штаммов Bac. anthracoides, дают отрицательный результат (диск преципитации отсутствует). Эти штаммы через 16—20 ч образуют в нижней части агарового столбика на границе с преципитирующей сывороткой рыхлую зону преципитации, которая не имеет четких границ и значительно толще, чем диск преципитации, образуемый возбудителем сибирской язвы. Через 36—40 ч зона преципитации, образуемая Bac. anthracoides, разрыхляется и сливается с преципитирующей сывороткой.

4.5. В качестве контроля при постановке реакции могут быть использованы посевы из противосибиреязвенной вакцины СТИ.

5. Оценка результатов.

5.1. При исследовании патологического материала и мяса вынужденно убитых животных полученные результаты оценивают, как и результаты реакции преципитации, поставленной общепринятым методом.

5.2. При исследовании выделенных культур поступают следующим образом.

5.2.1. Культуры, давшие положительные результаты по реакции диск-преципитации или нечеткие результаты (рыхлое кольцо), идентифицируют общепринятыми методами в соответствии с действующими методическими указаниями.

5.2.2. В случае обнаружения диска преципитации при посеве суспензии из нескольких культур каждую культуру, включенную в суспензию, исследуют отдельно теми же методами.

5.2.3. Культуры, давшие отрицательный результат, дальнейшему исследованию не подлежат.

Приложение

Приготовление очищенного 1%-ного агарового геля

Сначала готовят нейтральную дистиллированную воду (pH 7,0). Для этого определяют pH имеющейся дистиллированной воды и в зависимости от полученных результатов ее нейтрализуют 1%-ным раствором двууглекислой соды (при кислой реакции) или 0,1%-ным раствором соляной кислоты (при щелочной реакции).

Необходимое для нейтрализации количество раствора определяют следующим способом: к 100 мл воды небольшими порциями (миллилитрами или каплями) добавляют один из указанных растворов, постоянно определяя pH; по достижении нейтральной реакции (pH 7,0) точно учитывают количество раствора, пошедшее на нейтрализацию 100 мл воды. Затем рассчитывают количество раствора, необходимое для нейтрализации всего объема дистиллированной воды.

Берут 5 г агар-агара, заливают 300 мл нейтральной дистиллированной воды, ставят в кипящую водяную баню и нагревают до полного расплавления агар-агара.

Одновременно готовят водный раствор белка куриного яйца. Берут охлажденное яйцо массой не менее 56 г и отделяют белок, который тщательно взбивают до образования пенистой массы, и растворяют в 200 мл нейтральной дистиллированной воды. Приготовленный раствор белка делят на две части по 100 мл.

В расплавленный агар добавляют 0,5 г хлористого кальция ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$), растворяют его и охлаждают до 50°С. Затем вливают 100 мл водного раствора белка куриного яйца, ставят в кипящую водяную баню и нагревают до появления хлопьев коагуляции (примерно 15—20 мин).

Если белок не свертывается или коагуляция происходит плохо, то вносят еще 0,25—0,5 г хлористого кальция и продолжают нагревать до появления хлопьев коагуляции.

Горячий агар фильтруют через предварительно смоченный в горячей дистиллированной воде и отжатый ватный фильтр.

К профильтрованному агару добавляют вторую часть (100 мл) водного раствора яичного белка, хорошо смешивают и снова нагревают в кипящей водяной бане до появления хлопьев коагуляции. В случае плохого свертывания белка поступают так же, как и при внесении первой порции (см. выше).

После свертывания белка агар вновь фильтруют в горячем виде.

Очищенный 1%-ный агаровый гель должен быть прозрачным.

Отфильтрованный агаровый гель разливают в пробирки или колбы и стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм в течение 20 мин.

Если после автоклавирования выпадает осадок, агаровый гель фильтруют и стерилизуют повторно.

Готовую среду хранят в холодильнике (2—4°С) и используют в течение 6 мес.

gost.e-ecolog.ru