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.

Временное наставление по применению сибиреязвенного бактериофага «К» ВИЭВ для определения возбудителя сибирской язвы

(Утверждено Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 15 июня 1967 г.)

1. Определение возбудителя сибирской язвы при помощи сибиреязвенного бактериофага «К» ВИЭВ основано на взаимодействии строго специфичного (индикаторного) бактериофага с сибиреязвенной клеткой. Это взаимодействие проявляется в виде адсорбции частиц бактериофага на клетках возбудителя сибирской язвы, что может быть выявлено просмотром в люминесцентном микроскопе препаратов, окрашенных флуоресцирующей антифаговой сывороткой, а также в виде полного или частичного лизиса сибиреязвенной культуры (феномен бактериофагии) и увеличения количества частиц бактериофага в результате его размножения (нарастание титра фага).

При помощи специфического бактериофага можно за 4—6 ч выявить возбудителя сибирской язвы в бактериальных культурах и патологическом материале, а также за 12—18 ч — в различных субстратах и объектах внешней среды. Этот метод может быть использован для определения сибирской язвы в комплексе с другими методами исследования.

2. Сибиреязвенный бактериофаг «К» ВИЭВ является видоспецифическим вирулентным фагом с широким диапазоном литического действия на штаммы возбудителя сибирской язвы. Наиболее чувствительны к воздействию бактериофага молодые (3—6-часовые) культуры сибиреязвенных микробов.

3. Препарат бактериофага «К» ВИЭВ представляет собой прозрачный светло-желтоватого цвета (цвет среды) фильтрат лизированной культуры авирулентного штамма возбудителя сибирской язвы, имеет титр по Аппельману 10^{-9}—10^{-14}, пригоден для применения в течение одного года со дня его изготовления при условии хранения в темном и прохладном помещении или в холодильнике при температуре 2—6°С.

4. Флаконы с бактериофагом перед применением встряхивают и вскрывают с соблюдением правил асептики. Флакон с не полностью использованным в день исследования бактериофагом укупоривают, и этот препарат может быть применен в дальнейшей работе после проверки его на отсутствие загрязнения микрофлорой.

5. Бактериофаг, подвергавшийся замораживанию, имеющий осадок или помутнение, к применению непригоден.

6. При работе с бактериофагом необходимо соблюдать меры, исключающие возможность попадания его на окружающие предметы. Бактериофаг, непригодный к применению, а также флаконы из-под него обезвреживают кипячением.

7. Для идентификации возбудителя сибирской язвы в культурах и определения его в свежем патологическом материале от павших и вынуждено убитых животных рекомендуются следующие методы:

а) микрометод;

б) пробирочный метод;

в) люминесцентно-серологический метод (при помощи системы фаг—флуоресцентный антифаг);

г) метод реакции нарастания титра фага.

Все материалы из объектов внешней среды, содержащие смешанную микрофлору, исследуют при помощи реакции нарастания титра фага (РНФ) или люминесцентно-серологическим методом при помощи системы фаг — флуоресцентный антифаг.

Примечания. 1. При исследованиях могут встречаться существующие в природе лизогенные штаммы возбудителя сибирской язвы, устойчивые к диагностическому бактериофагу. Окончательную идентификацию таких фагорезистентных штаммов возбудителя сибирской язвы проводят путем испытания их на лизогенность и на основании результатов полного бактериологического исследования.

Лизогенность фагорезистентных штаммов можно выявить путем их посева вместе с чувствительным к бактериофагу (эталонным) штаммом № 643/11 возбудителя сибирской язвы на МПА в бактериологические чашки (сплошным газоном) или в дрожжевой бульон.

2. Штамм 643/11 получен в ВИЭВ из вирулентного штамма возбудителя сибирской язвы при помощи воздействия лучистой энергии. Он является спорообразующим, стабильным, авирулентным и фагочувствительным штаммом, используется для изготовления бактериофага «К» ВИЭВ. Штамм 643/11 поддерживают на скошенном дрожжевом агаре pH 7,2—7,4, пересевая один раз в 3—6 мес.

Исследование микрометодом.

8. Критерием идентификации возбудителя сибирской язвы этим методом является полный или частичный лизис специфическим бактериофагом исследуемой культуры, на что указывает отсутствие роста или образование негативных колоний бактериофага на газоне бактериальной культуры.

Микрометодом можно исследовать чистые микробные культуры различного возраста, в том числе и споровые. Для сокращения срока исследования используют молодые (3—6-часовые) культуры микробов, а также свежий патологический материал — кровь и пробы из органов павших и вынуждено убитых животных.

При исследовании агаровых культур из отдельных характерных и подозрительных колоний или из смыва 5—6-часовых культур готовят взвеси бактерий в физраствоpе с концентрацией 125—500 млн. микробных клеток в 1 мл по оптическому бактерийному стандарту.

Бульонные 3—6-часовые культуры исследуют с такой же концентрацией микробных клеток, как и агаровые культуры.

Пробирки со взвесью клеток бактериальной культуры тщательно встряхивают до получения равномерного помутнения и оставляют на 5—10 мин для отстаивания. Комочки и нити из бактерий во взвеси долж-

ны быть разбиты, в противном случае бактериальная культура может быть лизирована бактериофагом не полностью.

Кровь из уха павших животных, пробы из свежего патологического материала от павших и вынуждено убитых животных набирают пастеровской пипеткой и разводят 1 : 5 — 1 : 10 в физрастворе или в дрожжевом бульоне до получения равномерной взвеси. Все манипуляции при подготовке материала проводят с соблюдением правил асептики.

9. Исследование микрометодом проводят в бактериологических чашках.

Накануне дня исследования в чашки разливают дрожжевой или мясо-пептонный 1,5—2%-ный агар (pH 7,4—7,6) ровным слоем толщиной не менее 0,3 см и не более 0,5 см. Допускается разливка агара в день исследования с обязательным подсушиванием его в термостате в течение 2—3 ч для удаления избытка конденсационной жидкости. Агар должен быть прозрачным, без осадка.

Для подавления роста микрофлоры, которая может попасть из воздуха, к расплавленному агару перед разливанием добавляют 0,4%-ный раствор генцианвиолета из расчета 0,1 мл на 1 л среды.

На застывшем агаре шаблоном (бактериологической пробиркой диаметром 1,5—2 см с ровным краем) прорезывают 3 ряда участков по 3 участка в каждом ряду. Каждый ряд участков по вертикали нумеруют и используют для исследования одной микробной культуры или пробы.

10. Подготовленный для исследования материал каждой пробы или культуры наносят при помощи бактериологической петли на 3 участка одного вертикального ряда (одну петлю на участок) и подсушивают 5 мин. Затем на 2 первых участка каждого ряда наносят пастеровской пипеткой с тонко оттянутым концом по одной капле неразведенного бактериофага на участок. Осторожным покачиванием чашки бактериофаг распределяют по всей поверхности в пределах границ участков. 3-й участок каждого ряда служит контролем исследуемой культуры или пробы, на него бактериофаг не наносят. Чашки оставляют на ровном месте при комнатной температуре на 10—15 мин для подсушивания нанесенных капель бактериофага, затем завертывают в бумагу и крышками вниз помещают в термостат при температуре 37°С.

11. Учет результатов проводят при исследовании молодых (3—6-часовых) культур через 2—4 ч, а при исследовании более старых культур и патматериала — через 4—6 ч инкубирования. Учет можно проводить и в более поздний срок — через 12—24 ч.

При учете результатов через 2—4 ч инкубирования участки просматривают под малым (×8) увеличением микроскопа, а в более поздние сроки просмотр участков можно проводить невооруженным глазом или при помощи ручной лупы.

Результаты исследования оценивают по наличию или отсутствию лизиса микробных клеток на участках с бактериофагом в сравнении с ростом культуры на контрольном участке.

Если исследуемая культура или проба патматериала содержали клетки возбудителя сибирской язвы, то через 2—4 ч инкубирования чашек с посевами на участках с бактериофагом отмечается лизис бактериальной культуры в виде зернистого распада всех или части клеток (при частичном лизисе), а в контроле обнаруживают формирующиеся микроколонии. Через 4—6 ч и более инкубирования в контроле виден невооруженным глазом сплошной или в виде сливающихся колоний рост культуры, а на участках с бактериофагом рост отсутствует (полный лизис) или в отдельных случаях могут обнаруживаться единичные мелкие колонии (частичный лизис).

Если исследуемый материал содержал другие виды бактерий, то рост бактериальной культуры как на участках с бактериофагом, так и на контрольных участках будет одинаковым.

12. Заключение на сибирскую язву при исследовании микрометодом может быть положительное или отрицательное:

положительное — при полном или частичном лизисе испытуемой бактериальной культуры на участках с бактериофагом и сплошном росте культуры на контрольном участке в виде формирующихся микро- или макроколоний;

отрицательное — при одинаковом росте испытуемой культуры как на участках с бактериофагом, так и в контроле.

Примечание. В случае загрязнения испытуемой культуры или пробы патматериала посторонней микрофлорой на участках с бактериофагом вырастают отдельные колонии, отличающиеся от колоний возбудителя сибирской язвы, а в контроле обнаруживается густой рост смешанной культуры.

Исследование пробирочным методом.

13. Для исследования каждой культуры или пробы патматериала, подготовленных, как указано в п. 8, берут четыре пробирки с дрожжевым бульоном по 4,5 мл (pH 7,4—7,6). Бульон должен быть прозрачным без осадка. В первую и четвертую пробирки вносят по 0,5 мл бактериофага с титром 10^{-9}—10^{-10} (бактериофаг с более высоким титром предварительно разводят дрожжевым бульоном или МПБ до указанного титра). После встряхивания из первой пробирки переносят 0,5 мл бактериофага во вторую. Затем в первые три пробирки вносят 0,1 мл (практически 2—3 капли) взвеси испытуемой культуры или пробы. Третья пробирка служит контролем культуры или пробы, и в нее бактериофаг не вносят. Четвертая пробирка служит контролем стерильности бактериофага. Контроль бактериофага может быть общим для всех экспертиз данного исследования.

14. Учет результатов проводят через 4—6 ч инкубирования. Он может быть проведен и через 12—20 ч. Однако необходимо учитывать, что в результате неточного количественного соотношения между частицами бактериофага и микробными клетками, а также по другим причинам оставшиеся нелизированными отдельные бактериальные клетки за этот период (12—20 ч) могут дать так называемый вторичный рост. При учете результатов пробирки слегка встряхивают и просматривают на свету. Результаты исследования оценивают по наличию или отсутствию лизиса культуры в опытных пробирках в сравнении с ростом культуры в контроле.

При просмотре посевов через 4—6 ч инкубирования в контроле обнаруживают интенсивный рост культуры в виде хлопьевидной, хлопьевидно-волокнистой взвеси или диффузного помутнения питательной среды, а в пробирках с бактериофагом рост бактериальной культуры отсутствует. Лизис (среда прозрачная), если испытуемая культура или проба патматериала содержала клетки возбудителя сибирской язвы. При содержании в исследуемом материале других видов бактерий рост будет одинаковый как в опытной, так и в контрольной пробирках. Контрольная пробирка с посевом бактериофага должна быть во всех случаях прозрачной (без бактериального роста).

15. Заключение на сибирскую язву при исследовании пробирочным методом может быть положительным или отрицательным:

положительное — при отсутствии роста испытуемой бак-

териальной культуры (полный лизис) или слабом росте в виде опалесценции в одной или двух первых пробирках с бактериофагом (частичный лизис) и интенсивном росте культуры в третьей — контрольной пробирке;

отрицательное — при одинаковом росте испытуемой культуры как в пробирках с бактериофагом, так и в контрольной пробирке.

Исследование люминесцентно-серологическим методом при помощи системы фаг — флуоресцентный антифаг.

16. Люминесцентно-серологический метод исследования при помощи системы фаг — флуоресцентный антифаг является непрямым. Он основан на использовании явления специфической адсорбции частиц сибиреязвенного индикаторного бактериофага на клетках чувствительного гомологичного микроба, специфической реакции их с антифаговой флуоресцирующей сывороткой и на последующем выявлении возбудителя путем люминесцентной микроскопии. Специфическое свечение бактериальных клеток в препаратах, обработанных системой фаг — флуоресцентный антифаг, указывает на наличие в исследуемом материале возбудителя сибирской язвы.

Для исследования этим методом необходимо иметь:

индикаторный сибиреязвенный бактериофаг с титром не ниже 10^{-9};

флуоресцирующую антифаговую сыворотку в рабочем титре;

чистые, хорошо обезжиренные стекла для мазков;

культуры 5—6-часового роста авирулентного штамма № 643/11 возбудителя сибирской язвы и штамма антракоида или псевдоантракса для контроля специфичности свечения;

испытуемые бактериальные культуры 3—6-часового роста или пробы патологического материала. Материалы для исследования готовят, как указано в п. 8.

17. Процесс исследования люминесцентно-серологическим методом при помощи системы фаг — флуоресцентный антифаг складывается из приготовления препаратов, обработанных флуоресцирующей антифаговой сывороткой, и просмотра их в люминесцентном микроскопе.

Для приготовления препарата бактериологической петлей или пипеткой наносят каплю суспензии патологического материала или клеток агаровой (бульонной) культуры на подготовленное предметное стекло (ближе к одному из его концов). Мазок высушивают на воздухе и фиксируют путем погружения на 10—15 мин в этиловый 96°-ный спирт или метанол. После фиксации мазок промывают физраствором или дрожжевым бульоном 1—2 мин и высушивают на воздухе. Затем на мазок наносят 2—3 капли индикаторного бактериофага, помещают во влажную камеру и ставят в термостат при 37°С или оставляют при комнатной температуре на 15—20 мин. Бактериофаг можно наносить на мазок до его фиксации. При этом на предметное стекло наносят бактериологической петлей или пипеткой одну каплю суспензии клеток испытуемой культуры или патматериала и две капли индикаторного бактериофага, смешивают и помещают во влажную камеру. Через 10—15 мин мазок быстро высушивают на воздухе (лучше под вентилятором) и фиксируют, как описано выше.

После этого мазки осторожно промывают карбонатно-бикарбонатным буфером или физраствором (pH 7,2—7,4), высушивают и наносят на них по 1—2 капли флуоресцирующей антифаговой сыворотки в рабочем титре и снова помещают во влажную камеру на 15—20 мин при комнатной температуре или на 5—10 мин при 37°С.

Для удаления избытка сыворотки препарат тщательно промывают

физраствором или карбонатно-бикарбонатным буфером путем орошения в течение 10—15 мин или последовательного проведения его через один из этих растворов, налитых в 5—6 кюветов (стаканчиков). Значительно быстрее (5—7 мин) препарат можно отмыть проточной водопроводной водой.

Отмытые препараты высушивают на воздухе, заключают под покровное стекло в забуференный глицерин (9 частей нейтрального глицерина и 1 часть карбонатно-бикарбонатного буфера). Затем препараты просматривают в люминесцентный микроскоп с иммерсионной системой в падающем ультрафиолетовом свете со светофильтром ФС-1 и окулярным фильтром Т-2Н (№ 2 в микроскопе МЛ-2).

В качестве иммерсионной среды используют специальное нефлуоресцирующее масло или его заменители: минеральное масло СО100, нефлуоресцирующее иммерсионное масло ГДР, анизол (метилфениловый эфир), диметилфталат.

18. Результаты микроскопии оценивают по степени специфического свечения.

Характер сечения	Оценка результатов
ярко-зеленое сияющее крапчатое свечение по всей поверхности клетки	++++
ярко-зеленое крапчатое свечение по всей поверхности клетки	+++
недостаточно интенсивное желтовато-зеленое крапчатое свечение, неравномерно распределенное по поверхности клетки	++
слабое желтовато-зеленоватое неравномерное свечение по поверхности клетки	+
свечение клеток отсутствует, клетки видны в виде еле заметных теней	—

Примечание. Яркость специфического свечения может зависеть от ряда факторов, в том числе от активности индикаторного бактериофага (его титра и интенсивности адсорбции на клетках сибиреязвенного микроба), а также от качества флуоресцирующей антифаговой сыворотки и т. д.

Контролем специфичности свечения служат препараты, обработанные тем же способом:

мазок из чистой культуры авирулентного штамма № 643/11 возбудителя сибирской язвы — положительный контроль;

мазок из культуры гетерологичного микроба (антракоид, псевдоантрацис и пр.) — отрицательный контроль.

19. Заключение на сибирскую язву при исследовании люминесцентно-серологическим методом при помощи системы фаг — флуоресцентный антифаг может быть положительным и отрицательным:

положительное — при специфической крапчатой флуоресценции бактериальных клеток (++++; +++; ++);

отрицательное — при отсутствии или тусклом однообразном свечении клеток (+; —).

Исследование при помощи реакции нарастания титра фага (РНФ).

20. Метод диагностики при помощи РНФ основан на свойстве строго специфичного, так называемого индикаторного, бактериофага размножаться только в клетках гомологичного микроба. Размножение бакте-

риофага сопровождается увеличением количества его частиц, а следовательно, и повышением его титра. Увеличение количества частиц (повышение титра) сибиреязвенного бактериофага в опытной пробе по сравнению с контролем будет свидетельствовать о наличии в исследуемом материале возбудителя сибирской язвы. Титр бактериофага определяют методом агаровых слоев по Грациа.

Метод агаровых слоев, предложенный Грациа в 1936 г., является наиболее удобным и точным для количественной характеристики бактериофага и, в частности, для определения его титра.

Сущность метода и техника работы заключаются в следующем. Накануне для исследования в бактериологические чашки разливают по 25—30 мл 1,5%-ного мясо-пептонного или дрожжевого агара. Для подавления роста микрофлоры, которая может попасть из воздуха, к расплавленному агару перед разливом добавляют 0,04%-ный спиртовой раствор генцианвиолета из расчета 0,1 мл на каждые 100 мл агара. Чашки с агаром подсушивают, оставляя на ночь в боксе, или на 2—3 ч помещают в термостат для удаления избытка конденсата влаги с поверхности агара. Для второго слоя используют 0,7%-ный агар, заготовленный в пробирках по 2,5 мл. Перед применением его расплавляют в водяной бане и затем охлаждают до 46—48°С. Расплавленный 0,7%-ный агар, охлажденный до 46—48°С, следует использовать в течение часа, так как позже он приобретает гелеобразную консистенцию и становится непригодным.

При исследовании в пробирку с расплавленным 0,7%-ным агаром вносят 0,1—0,2 мл смыва физраствором агаровой культуры эталонного штамма № 643/11 возбудителя сибирской язвы 5—6-часового роста с концентрацией 2 млрд. микробных клеток в 1 мл. Туда же вносят из 10-кратных разведений 0,5 или 1,0 мл исследуемого на содержание бактериофага материала, все быстро и тщательно перемешивают вращением пробирки между ладонями и выливают в чашку на поверхность первого слоя агара. Смесь легким покачиванием чашки равномерно распределяют по поверхности агара. Чашки оставляют на ровном месте на 20—30 мин (до застывания агара), а затем завертывают в бумагу и помещают в термостат при температуре 37°С крышками вниз на горизонтальную поверхность (во избежание стекания агара).

Учет результатов проводят через 6—10 ч инкубирования, однако в более поздний срок (16—18 ч) негативные колонии бактериофага становятся наиболее четкими и удобными для подсчета. Для определения титра подсчитанное количество негативных колоний бактериофага на чашке умножают на фактор разведения исследуемого материала (число негативных колоний соответствует числу частиц бактериофага в исследуемом материале).

Например, в 1 мл разведения 10^{-8} исследуемого материала на чашке подсчитано 27 негативных колоний, следовательно, титр бактериофага будет равен $2{,}7 \times 10^{9}$.

21. РНФ можно использовать для выявления возбудителя сибирской язвы в пробах патматериала, кожсырья, фуража, почвы, воды, воздуха и в смывах с предметов внешней среды без выделения чистой культуры, а также для контроля результатов дезинфекции.

В РНФ используют бактериофаг «К» ВИЭВ с точно установленным титром по методу Грациа. В целях исключения передозировки бактериофага его применяют в рабочем разведении с титром, не превышающим 10^{4}—10^{5}.

22. На каждую исследуемую пробу берут соответственно по 3 пробирки или флакона (колбочки): № 1 — опытная, № 2 — контроль на

свободный бактериофаг, № 3 — контроль титра индикаторного бакте, риофага (контроль титра бактериофага ставят один на группу анализов, проводимых одновременно).

В зависимости от характера и количества исследуемого материала РНФ ставят в объеме 5, 10 или 100 мл по следующей схеме:

Общий объем РНФ, мл	Пробирки (флаконы)		Питательная среда, мл	Исследуемый материал, мл	Индикаторный бактериофаг, мл
	№	назначение			
5	1	Опытная	4,0	0,5	0,5
	2	Контроль на свободный бактериофаг	4,5	0,5	—
	3	Контроль индикаторного бактериофага	4,5	—	0,5
10	1	Опытная	8,0	1,0	1,0
	2	Контроль на свободный бактериофаг	9,0	1,0	—
	3	Контроль индикаторного бактериофага	9,0	—	1,0
100	1	Опытная	10,0 концентрир.	80,0	10,0
	2	Контроль на свободный бактериофаг	10,0 концентрир.+ +10,0 дрожжев. бульона	80,0	—
	3	Контроль индикаторного бактериофага	90,0 дрожжев. бульон	—	10,0

23. В связи с тем что в зараженных пробах воды, фуража, почвы и смывах с предметов внешней среды возбудитель сибирской язвы обычно находится в небольшой концентрации и в споровой форме вместе с большим количеством различной микрофлоры, перед постановкой РНФ проводят концентрирование возбудителя, материалы прогревают при 80°С 10—15 мин для инактивации сопутствующей микрофлоры, а затем подращивают (см. п. 27).

24. Чувствительность РНФ характеризуется следующими показателями (возбудителя сибирской язвы можно выявить в течение 12—18 ч):

в почве, искусственно зараженной 10—100 спорами на 1 г;

в воде, зараженной 100—1000 спорами на 1 л;

в фураже, зараженном 100—1000 спорами на 100 г массы.

Чувствительность метода повышается в несколько раз, если концентрировать возбудителя в исследуемом материале фильтрованием или центрифугированием и увеличить на 2—4 ч сроки инкубирования смеси исследуемого материала с бактериофагом.

25. Исследование патологического материала от павших и вынуж-

денно убитых животных при помощи РНФ проводят по схеме в объеме 5 мл.

В пробирки наливают питательную среду (дрожжевой бульон или бульон Хоттингера с содержанием аминного азота 200 мг%, pH 7,4—7,6): в № 1—4 мл, № 2 и 3 по 4,5 мл. Патологический материал, подготовленный для исследования, как указано в п. 8, вносят в пробирки № 1 и 2 в объеме 0,5 мл. Затем в пробирки № 1 и 3 вносят по 0,5 мл бактериофага в рабочем разведении с титром 10^4—10^5. После встряхивания все три пробирки помещают в термостат при 37°С. Через 4—6 ч инкубирования пробирки встряхивают и из каждой отбирают пробы в объеме 1 мл в стерильные пробирки. Пробирки с исходными посевами снова ставят в термостат на 2—4 ч, затем оставляют при комнатной температуре до конца исследования на случай необходимости проведения повторного анализа.

Отобранные пробы разводят дрожжевым бульоном или МПБ с таким расчетом, чтобы при высеве по методу Грациа 0,5 или 1 мл из пробирки № 3 (контроль титра бактериофага) в чашках получилось сосчитываемое количество (единицы или десятки) негативных колоний бактериофага. Допустим, что индикаторный бактериофаг был взят в рабочем разведении с титром 10^4, тогда содержимое пробирок разводят в 20 раз, т. е. ожидаемое количество негативных колоний в контроле будет соответственно равно 25 или 50. Разведенные смеси в 3 пробирках освобождают от микробных клеток путем центрифугирования при 3,5—4 тыс. об/мин в течение 15 мин или фильтрованием через мембранные фильтры № 3 либо инактивируют прогреванием на водяной бане при 56—58°С в течение 30 мин. Затем в них определяют концентрацию частиц бактериофага, пользуясь методом агаровых слоев, как указано в п. 20. Чтобы обеспечить более точное определение количества частиц бактериофага, опытную пробу (пробирка № 1) и контроль индикаторного бактериофага (пробирка № 3) рекомендуется исследовать каждую в двух чашках с 1,5%-ным агаром, пробу же на свободный бактериофаг (пробирка № 2) — в одной чашке. Таким образом, на один анализ требуется 3—5 бактериологических чашек.

Результаты исследования учитывают путем подсчета негативных колоний бактериофага в опытных и контрольных чашках. Оценку проводят по титру бактериофага согласно схеме.

Увеличение количества частиц индикаторного бактериофага в опытной пробе по отношению к его контролю	Оценка результатов
до 3-х раз	—
в 3—4 раза	+
в 5—6 раз	++
в 7—10 раз	+++
более 10 раз	++++

Примечание. При наличии в исследуемом материале свободного бактериофага (пробирка № 2) число подсчитанных негативных колоний его в чашке (посев из пробирки № 2) вычитают из числа негативных колоний, подсчитанных в опытной чашке (посев из пробирки № 1), разницу сравнивают с числом колоний индикаторного бактериофага, установленным в контроле (пробирка № 3). При высоком титре свободного бактериофага (сплошном лизисе культуры эталонного штамма № 643/11) результат РНФ не может быть учтен.

26. Заключение на сибирскую язву при исследовании по РНФ может быть положительным или отрицательным:

положительное — при увеличении титра бактериофага в опытной пробе более чем в 3 раза по сравнению с контролем (+; ++; +++; ++++);

отрицательное — в тех случаях, когда титр бактериофага в опытной пробе одинаковый с титром в контроле или превышает его менее чем в 3 раза (—).

27. Исследование воды по РНФ без концентрирования материала проводят по вышеописанной схеме в объеме 100 мл. При этом воду в количестве 80 мл наливают в две стерильных колбочки (флакона), прогревают на водяной бане при 80°С в течение 10—15 мин и быстро охлаждают до 37°С, погружая в холодную воду. В те же колбочки (№ 1 и № 2) добавляют по 10 мл концентрированной питательной среды pH 7,4—7,6 (дрожжевой экстракт или мясной перевар Хоттингера 100 мл, 10 г пептона и 5 г поваренной соли), а в колбочку № 3 вносят 90 мл дрожжевого бульона. Все три колбочки помещают в термостат на 2—4 ч для подращивания. Затем добавляют в колбочки № 1 и 3 по 10 мл индикаторного бактериофага в рабочем титре, а в колбочку № 2—10 мл дрожжевого бульона. После встряхивания все три колбочки снова помещают в термостат при 37°С на 2—6 ч, затем проводят исследование по методу агаровых слоев, учитывают и оценивают результаты, как описано в пп. 25 и 26.

Концентрирование возбудителя сибирской язвы в пробах воды перед постановкой РНФ проводят путем фильтрования или центрифугирования. В этих целях берут 1000 мл воды и пропускают через мембранный фильтр № 3 в две колбочки или центрифугируют при 4 тыс. об/мин в течение 30 мин. Осадок с мембранных фильтров или центрифужных пробирок смывают 10—20 мл дрожжевого бульона или бульона на мясном переваре Хоттингера pH 7,4—7,6 и исследуют по схеме в объеме 5 или 10 мл. Для этого полученную взвесь прогревают при 80°С 10—15 мин, быстро охлаждают до 37°С погружением в холодную воду и разливают в две стерильных пробирки соответственно по 4,5 или 9 мл. В пробирку № 3 наливают такое же количество дрожжевого бульона или бульона на мясном переваре Хоттингера. Все три пробирки помещают в термостат при 37°С на 2—4 ч для подращивания культуры. Затем в пробирки № 1 и 3 вносят соответственно 0,5 или 1 мл индикаторного бактериофага в рабочем титре, а в пробирку № 2 добавляют 0,5—1 мл дрожжевого бульона. Пробирки со смесью встряхивают и вновь инкубируют 2—6 ч при 37°С, а затем исследуют по методу агаровых слоев, учитывают и оценивают, как описано в пп. 25, 26.

28. Материал из воздуха, сконцентрированный на фильтрах (растворимых, мембранных и пр.) или в водной среде, исследуют по РНФ так же, как и воду по п. 27.

29. Пробы фуража массой 100 г помещают в стерильные колбочки (мензурки), заливают двойным или тройным количеством питательной среды (дрожжевым бульоном или бульоном Хоттингера, pH 7,4—7,6) — при исследовании без концентрирования или 5-кратным количеством физиологического раствора — при концентрировании материала. В последнем случае навески проб можно увеличить до 500 г.

Содержимое колбочек встряхивают 10—15 мин, отстаивают 5 мин, надосадочную жидкость сливают во флаконы или колбочки, прогревают при 80°С 10—15 мин и быстро охлаждают до 37°С. Затем смывы, произведенные питательной средой, исследуют по схеме в объеме 100 мл, а смывы, сделанные физиологическим раствором, предварительно концентри-

руют и осадок исследуют, как описано при исследовании проб воды (см. п. 27).

30. Пробы почвы в отдельности или среднюю пробу массой 10—100 г помещают в колбочки, заливают двойным-тройным количеством питательной среды или 5-кратным количеством физиологического раствора, обрабатывают и исследуют, как и пробы фуража.

31. При индикации возбудителя сибирской язвы на различных предметах с поверхности их делают смывы стерильными тампонами, смоченными физиологическим раствором или стерильной водопроводной водой. Тампон помещают в широкую пробирку с 10—15 мл дрожжевого бульона или бульона Хоттингера. Пробирку тщательно встряхивают, после чего тампон отжимают и удаляют, а смыв с тампона разливают в две пробирки (№ 1 и 2) по 4,5 мл, прогревают при 80°С 10—15 мин, быстро охлаждают и исследуют по схеме в объеме 5 мл.

При невозможности исследования каждого смыва отдельно проводят исследование их смеси. В этом случае каждый тампон смывают небольшим количеством (3—5 мл) питательной среды. Смывы собирают в колбочку или флакон, прогревают при 80°С 10—15 мин и охлаждают, а затем в зависимости от объема проводят концентрирование материала или исследуют без концентрирования по схеме на 10 мл.

32. Пробы фуража, воды, почвы и пр. могут быть исследованы на присутствие возбудителя сибирской язвы люминесцентно-серологическим методом при помощи системы фаг — флуоресцентный антифаг. Материал для исследования готовят так же, как и при постановке РНФ (пп. 27—31), с проведением концентрирования возбудителя путем фильтрования через мембранные фильтры № 3 и последующим подращиванием на твердых или жидких питательных средах (1%-ном агаре — дрожжевом или на мясном переваре Хоттингера; дрожжевом бульоне или бульоне Хоттингера, pH 7,4—7,6) с добавлением глюкозы и сыворотки крови сельскохозяйственных животных. Затем из материала готовят препараты и исследуют, как указано в пп. 17—19.

Способ приготовления дрожжевых питательных сред. Дрожжевой агар и бульон готовят из дрожжевого экстракта. Для приготовления дрожжевого экстракта берут 1 кг пекарских дрожжей, суспендируют в 2,5 л дистиллированной воды. Суспензию прогревают в автоклаве при 120°С 1 ч. Затем дрожжевые клетки осаждают центрифугированием, надосадочную жидкость фильтруют через фильтр Зейтца. Профильтрованный экстракт стерилизуют автоклавированием при 120°С 30 мин и до исследования хранят в темном месте при 4—10°С.

Дрожжевой бульон. 500 мл дрожжевого экстракта разводят в 4,5 л воды, добавляют 50 г пептона и 25 г поваренной соли, устанавливают pH 7,4—7,6, фильтруют, разливают по сосудам и стерилизуют автоклавированием при 120°С 30 мин.

Дрожжевой агар. 500 мл экстракта разводят в 4,5 л воды, добавляют 50 г пептона, 25 г поваренной соли и необходимый процент агара (1,5 или 2,5%), просветляют куриным белком (1 яйцо на 1 л агара), устанавливают pH 7,4—7,6, разливают по пробиркам, флаконам или матровым колбам и стерилизуют автоклавированием при 120°С 30 мин.

gost.e-ecolog.ru