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.

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

СИБИРСКАЯ ЯЗВА

Методические указания по лабораторной диагностике сибирской язвы

(Утверждены Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 7 мая 1979 г.)

1. Общие положения.

1.1. Диагноз на сибирскую язву ставят на основании результатов лабораторного исследования.

1.2. Для исследования в лабораторию направляют ухо, перевязанное у основания, кровь из надреза уха, от трупов свиней — заглоточные лимфоузлы и участки отечной соединительной ткани.

Если подозрение на сибирскую язву возникло при вскрытии трупа животного того вида, у которого заболевание протекает септически, вскрытие прекращают и на исследование направляют часть селезенки.

1.3. Бактериологическая диагностика патологического материала включает:

микроскопическое исследование исходного материала;

посевы на питательные среды;

идентификацию выделенных культур по культурально-биохимическим свойствам;

заражение лабораторных животных.

Если ухо доставлено обескровленным, то дополнительно исследуют материал и по реакции преципитации.

В случае доставки загнившего материала исследование проводят только по реакции преципитации.

2. Микроскопическое исследование.

2.1. Микроскопическому исследованию подвергают мазки из крови уха или другого доставленного материала. Подсушенные мазки фиксируют и окрашивают по Граму и на капсулы — по Ребигеру, Михину, Ольту, Гимзе или синькой Леффлера.

2.2. В мазках, окрашенных по Граму, возбудитель сибирской язвы Bac. anthracis — прямая грамположительная палочка. Палочки располагаются короткими цепочками или попарно, концы их, обращенные друг к другу, резко обрублены, свободные концы обычно закруглены. В отдельных случаях в мазках (чаще от свиней) форма микробов сибирской язвы может быть нехарактерна: они имеют вид коротких, толстых, изогнутых или зернистых палочек со вздутием посредине или на концах.

2.3. В мазках из свежего патологического материала, окрашенных специальными методами, сибиреязвенные палочки окружены капсулой. При окраске мазков из несвежего материала микробы могут быть несколько увеличены, концы закруглены, морфологическая стройность

бацилл нарушена, они как бы изъедены, а от капсул иногда остаются одни обрывки, которые окрашиваются очень слабо.

2.4. По результатам микроскопического исследования немедленно дают предварительный ответ.

3. Бактериологическое исследование.

3.1. Посевы из крови уха или другого патологического материала делают на МПБ и МПА в пробирках или чашках и инкубируют в термостате при температуре 36—37°С. Посевы просматривают через 18—24 ч и при отсутствии роста выдерживают в термостате еще 2 сут.

На МПА микроб образует плоские матово-серые шероховатые R-формы колонии, центр колоний затемнен, периферия бахромчатая с локонообразными отростками. Встречаются и атипичные колонии с менее выраженной шероховатостью и без отростков.

Под малым увеличением микроскопа колонии имеют вид локонов, состоящих из сплетений длинных нитей микробов, получивших название «головы медузы», «львиной гривы». Молодые колонии имеют вязкую консистенцию.

МПБ после суточного роста сибиреязвенных микробов остается прозрачным, на дне образуется рыхлый осадок в виде комка ваты. При встряхивании пробирок бульон не мутнеет, осадок разбивается на мелкие хлопья. В отдельных случаях в МПБ может появиться диффузный рост культуры (легкое помутнение), при встряхивании образуются муаровые волны.

3.2. Из бульонной культуры делают мазки, окрашивают по Граму и исследуют под микроскопом. В мазках из типичной бульонной культуры обнаруживают длинные цепочки, состоящие из сибиреязвенных палочек, из бульонной культуры с диффузным ростом — отдельные или парно расположенные палочки и редко — короткие цепочки.

3.3. При получении смешанной культуры выделение чистой культуры возбудителя сибирской язвы проводят общепринятыми методами (дробный рассев на плотные среды в чашках, отсев отдельных характерных колоний, а также путем заражения белых мышей).

4. Идентификация возбудителя сибирской язвы.

4.1. Идентификацию возбудителя сибирской язвы проводят по характеру роста, морфологии микроба и наличию капсул (в мазках из исходного материала или павших зараженных животных). В сомнительных случаях определяют подвижность, гемолитические свойства, проводят люминесцентную микроскопию, фаготипирование, тест «жемчужного ожерелья», а также заражают лабораторных животных.

4.2. Люминесцентную микроскопию проводят с использованием флуоресцирующих сибиреязвенных сывороток «ОКВС» в соответствии с наставлением по их применению.

4.3. Фаготипирование проводят одним из следующих методов: стекающей капли, пробирочным или микрометодом с использованием сибиреязвенных бактериофагов «Гамма-МВА» или «К» ВИЭВ. Исследование проводят в соответствии с наставлением по применению указанных фагов.

4.4. Тест «жемчужного ожерелья».

4.4.1. Перед постановкой пробы готовят 3 пробирки по 10 мл (или 3 колбы по 100 мл) МПА, в две из которых стерильно вносят пенициллин из расчета 0,5 ЕД и 0,05 ЕД на 1 мл среды, третья — контрольная. Агар разливают в чашки Петри и после застывания пробиркой с ровными краями делают насечки агара или вырезают пластинки (1,5×

×1,5 см), которые переносят на предметные стекла и помещают в чашки Петри. На каждую пластинку делают высев 3-часовой бульонной культуры. Чашки закрывают крышками и помещают в термостат при 37°С на 3 ч. Через 3 ч просматривают под микроскопом с сухой (объектив × 40) и иммерсионной системами. Перед просмотром зону роста накрывают покровным стеклом. Сибиреязвенные микробы на МПА с пенициллином принимают шаровидную форму, а их цепочки имеют вид «жемчужного ожерелья». Спорообразующие сапрофитные аэробные микробы в аналогичных условиях вырастают в виде обычных форм. На контрольном агаре сибиреязвенные микробы образуют длинные цепочки, состоящие из типичных палочек.

Примечание

Схема разведения пенициллина

№ разведения	Кол-во разводимого пенициллина	Кол-во добавляемого МПБ, мл	Полученная концентрация пенициллина, ЕД/мл	Количество среды, мл			
				100		10	
				вносят раствора пенициллина, мл	концентрация пенициллина, ЕД/мл	вносят раствора пенициллина, мл	концентрация пенициллина, ЕД/мл
1	100 000 ЕД	10	10 000				
2	1 мл разв. № 1	9	1 000				
3	1 мл разв. № 2	9	100	0,5	0,5		
4	1 мл разв. № 3	9	10	0,5	0,05	0,5	0,5
5	1 мл разв. № 4	9	1			0,5	0,05

Пенициллин добавляют к расплавленному и охлажденному до 45—50°С агару.

4.4.2. Модификация теста «жемчужного ожерелья». К бульону на переваре Хоттингера (pH 7,2—7,4) добавляют стерильно 20% инактивированной лошадиной сыворотки и 0,5 ЕД пенициллина на 1 мл бульона. Среду разливают с соблюдением стерильности в пробирки по 2—3 мл.

В пробирку со средой засевают две капли испытуемой бульонной или одну петлю агаровой культуры. После 3-часового культивирования при 37°С делают мазки, фиксируют жидкостью Корнуа (6 частей этилового спирта, 3 части хлороформа и 1 часть ледяной уксусной кислоты) до испарения, окрашивают метиленовой синькой 20—30 с и микроскопируют. В мазках сибиреязвенные палочки имеют вид цепочек, шарообразных форм, напоминающих «ожерелье из жемчуга» или «бусы».

4.4.3. При отрицательном результате микроскопии через 3 ч инкубацию посевов (на плотной или жидкой среде) продолжают до 6 ч, после чего исследуют повторно и делают заключительный учет теста.

4.5. Исследование на подвижность проводят микроскопически

методом раздавленной капли или макроскопически путем посева исследуемой культуры уколом в столбик полужидкого агара (0,2—0,3%-ного). Посев ставят на 24 ч в термостат. Возбудитель сибирской язвы неподвижен (рост по уколу).

4.6. Гемолитическую активность проверяют при посеве исследуемой культуры на кровяной агар или бульон. Результаты учитывают через 16—20 ч инкубации посевов в термостате. Возбудитель сибирской язвы гемолитической активностью не обладает.

5. Биологическое исследование.

5.1. Заражение лабораторных животных исходным материалом является обязательным и проводится в день поступления материала. Исследуемый патологический материал, суспендированный в небольшом объеме физиологического раствора, вводят двум белым мышам в дозе 0,1—0,2 мл подкожно в заднюю часть спины или двум морским свинкам в дозе 0,5—1 мл подкожно в область живота. Гибель зараженных животных наступает через 1—3 сут, иногда позже. Наблюдение за подопытными животными ведут 10 дн.

Павших животных вскрывают, делают мазки и посевы из крови сердца, селезенки, печени, инфильтрата на месте инъекции исследуемого материала.

6. Реакция преципитации.

6.1. Перед постановкой реакции свежий материал предварительно выдерживают в термостате в течение 18—20 ч. Несвежий материал экстрагируют без выдерживания в термостате.

6.2. Экстрагирование проводят двумя способами: горячим и холодным. При этом следует учитывать, что экстракты, полученные горячим способом, беднее преципитиногенами, чем при холодном.

Горячий способ: кусочки исследуемого материала (1—2 г) помещают в пробирку или колбу, заливают физиологическим раствором в соотношении 1 : 10 и кипятят в течение 30—40 мин в водяной бане.

Холодный способ: кусочки материала (1—2 г) растирают в ступке с песком, переносят в колбу или баночку, заливают карболинизированным (0,3%-ным) физиологическим раствором в соотношении 1 : 10 и оставляют на 16—18 ч при комнатной температуре.

Полученные экстракты фильтруют через асбестовую вату до прозрачного состояния, причем первые капли фильтрата удаляют.

6.3. Реакцию ставят путем наслаивания или подслаивания.

При наслаивании в уленгутовскую пробирку наливают 0,2—0,3 мл прозрачной преципитирующей сибиреязвенной сыворотки, затем осторожно наслаивают равное количество экстракта так, чтобы между компонентами была ясно выраженная граница (тонкая прямая линия).

При подслаивании в уленгутовскую пробирку сначала вносят 0,2—0,3 мл экстракта, затем под него осторожно пастеровской пипеткой подслаивают равное количество преципитирующей сыворотки.

Одновременно ставят контроли, предусмотренные «Наставлением по исследованию кожмехсырья на сибирскую язву реакцией преципитации».

6.4. Реакцию считают положительной, если через 1—2 мин и не позже чем через 15 мин после постановки реакции на границе между компонентами появится тонкое беловатое кольцо.

7. Учет результатов исследования.

7.1. Диагноз на сибирскую язву считается установленным при получении одного из следующих показателей.

7.1.1. Выделение из патологического материала культуры со свой-

ствами, характерными для возбудителя сибирской язвы, и гибели хотя бы одного лабораторного животного из двух зараженных исходным материалом или полученной культурой с последующим выделением ее из органов павшего животного.

7.1.2. Отсутствие в посевах из исходного материала роста культуры, но гибели хотя бы одного лабораторного животного из двух зараженных и выделение из его органов культуры со свойствами, характерными для возбудителя сибирской язвы.

7.1.3. Получение положительных результатов методом иммунофлуоресценции с адсорбированной сибиреязвенной сывороткой и обнаружение капсульных бацилл в мазках из исходного патологического материала.

7.1.4. Положительная реакция преципитации при исследовании загнившего патологического материала.

8. Сроки исследования:

микроскопического — в день поступления материала;

бактериологического — до 3 сут;

биологического — до 10 сут.

gost.e-ecolog.ru