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.

БРУЦЕЛЛЕЗ

Наставление по диагностике бруцеллеза животных

(Утверждено Главным управлением ветеринарии Минсельхоза 30 декабря 1982 г.)

1. Общие положения.

1.1. Бруцеллез — инфекционная, хронически протекающая болезнь животных.

Возбудитель — бактерии из рода бруцелла, в который входят шесть самостоятельных видов: мелитензис (козье-овечий), абортус

(крупного рогатого скота), суис (свиной), овис (бараний), канис (собачий) и неотома (кустарниковых крыс). Микроорганизмы первых трех видов вызывают бруцеллез, бруцеллы вида овис — заболевание, называемое инфекционным эпидидимитом баранов.

От животных, больных бруцеллезом, могут заражаться люди, для которых наиболее опасен возбудитель бруцеллеза овец и коз.

1.2. Диагноз на бруцеллез у животных ставят на основании результатов бактериологических, серологических и аллергических исследований с учетом эпизоотологических данных и клинических признаков болезни, руководствуясь при этом «Инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных».

1.2.1. При установлении диагноза на бруцеллез необходимо учитывать следующее:

различные виды возбудителя являются патогенными в основном для животных соответствующего вида, однако бруцеллы видов мелитензис и абортус могут мигрировать и на животных других видов;

клинические признаки бруцеллеза у животных не характерны. Наиболее частое клиническое проявление болезни у маточного поголовья — аборт, у свиноматок наблюдается мумификация плодов. При абортах отмечается утолщение плодных оболочек, образование на них фибринозных или гнойных хлопьев. Бруцеллез нередко сопровождается поражением суставов (артриты), синовиальной системы (тендовагиниты, бурситы), половой системы (у самок — эндометрит, вагинит, у самцов — орхит, эпидидимит);

патологоанатомическая картина при бруцеллезе не имеет характерных особенностей, позволяющих использовать их для диагностики этой болезни. Только у свиней на слизистой оболочке матки иногда находят желтовато-гнойные или казеозные узелки величиной с просяное зерно (так называемый «миллиарный бруцеллез матки»).

1.2.2. У баранов, больных инфекционным эпидидимитом, в семенниках и придатках обнаруживают воспалительно-некротические или гнойные очаги различной величины; отмечают заполнение полости мошонки серозно-гнойным транссудатом, разрастание фиброзной ткани, сращение придатка с семенником и общей влагалищной оболочкой, иногда атрофию семенника.

1.3. Диагностика бруцеллеза включает лабораторные (бактериологические и серологические) исследования материала и аллергические исследования животных в хозяйствах.

Плановые серологические и аллергические исследования являются основными методами выявления больных и подозрительных по заболеванию животных.

Бактериологическую диагностику проводят в случае аборта или при появлении у животных других признаков (бурситы, гигромы, орхиты, эпидидимиты и прочее), вызывающих подозрение на данное заболевание. Одновременно проводят серологическое исследование сывороток крови этих животных.

1.4. При отборе проб крови, молока и патологического материала, а также при проведении лабораторных исследований необходимо соблюдать меры, предупреждающие заражение людей и обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями по данному вопросу.

2. Взятие материала от животных и пересылка его для лабораторных исследований.

2.1. Материал для лабораторных исследований отбирают от каждого животного в отдельности.

2.2. На бактериологическое исследование на бруцеллез в лабораторию направляют абортированный плод с плодными оболочками (от свиноматок берут не менее 3 плодов) или желудок плода с содержимым (желудок перевязывают со стороны пищевода и со стороны двенадцатиперстной кишки), а также кусочки печени и селезенки.

При взятии содержимого гигром (бурс) в области поражения выстригают шерсть, кожный покров дезинфицируют 70°-ным спиртом и смазывают настойкой йода. Затем стерильным шприцем с иглой большого диаметра делают пункцию, отсасывают содержимое гигромы (бурсы) и переносят его в стерильную пробирку с резиновой пробкой.

Перед взятием проб молока у коров вымя обмывают теплой водой, соски обрабатывают 70°-ным спиртом. Для исследования из каждой доли вымени берут последние порции молока в количестве 10—15 мл в отдельные стерильные пробирки с резиновыми пробками.

У овец и коз пробы молока берут путем пункции цистерны вымени. Для этого животное фиксируют в боковом положении, вымя у основания соска протирают 70°-ным спиртом и смазывают настойкой йода. Стерильным шприцем с иглой делают пункцию у основания соска и после попадания иглы в цистерну (о чем судят по свободному движению конца иглы) набирают в шприц молоко и переносят его в стерильную пробирку с резиновой пробкой.

Молоко должно быть доставлено в лабораторию и исследовано в день взятия пробы. Если это невозможно, молоко консервируют сухой борной кислотой (0,1 г на 10 мл) или генцианвиолетом (0,4 мл 1%-ного спиртово-водного раствора краски на 10 мл молока). Консервированное молоко пригодно для исследования в течение 10 дн.

2.2.1. Для исследования на инфекционный эпидидимит в лабораторию направляют: от баранов — семенники с придатками; от овцематок — абортированные плоды с плодными оболочками, выделения из половых путей, взятые в первые 5 дн. после аборта.

2.2.2. Отобранные для бактериологического исследования пробы упаковывают в целлофан или пергаментную бумагу, помещают в непроницаемую тару (ящик, банка, полиэтиленовый пакет) и в тот же день направляют в лабораторию. От абортировавшего животного одновременно с патологическим материалом направляют кровь для серологического исследования на бруцеллез.

Если в течение 24—30 ч взятый материал доставить в лабораторию не представляется возможным, его консервируют стерильным 30%-ным водным раствором химически чистого глицерина.

Материал заливают консервирующей жидкостью в количестве, превышающем его объем в 4—5 раз. Крупные плоды направляют в неконсервированном виде.

2.3. На серологическое исследование в лабораторию направляют кровь (или сыворотку крови) и молоко.

2.3.1. Кровь у животных берут из яремной вены (у свиней — из ушной или хвостовой, у лисиц и песцов — из бедренной вены, у норок — путем отсечения подушечки среднего пальца задней лапы или кончика хвоста) в стерильные пробирки по 5—7 мл (от пушных зверей — по 1—2 мл). Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

Сыворотку крови получают методом отстоя. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают 30—60 мин при 20—30°С, сгусток крови от стенок отделяют стальной спицей, а затем пробирки выдерживают при 4—10°С. Через 20—24 ч отстоявшуюся сыворотку сливают в сухие стерильные пробирки (лучше в пробирки

Флоринского) и направляют на исследование в лабораторию в свежем или консервированном виде.

Консервирование сывороток проводят:

добавлением 0,05 мл (1 капля) 5%-ного раствора фенола на каждый миллилитр сыворотки при постоянном перемешивании;

сухой борной кислотой (2—4% к объему сыворотки) до получения насыщенного раствора и образования на дне пробирки небольшого осадка кристаллов;

путем однократного замораживания.

Неконсервированная сыворотка пригодна для исследования в течение 6 дней со дня взятия крови с сохранением ее при 4—8°С.

Сыворотки, консервированные фенолом или борной кислотой, пригодны для исследования в течение 30 дн.; замороженные сыворотки — в течение 3 дн. после однократного оттаивания.

Мутные, проросшие, гемолизированные сыворотки исследованию на бруцеллез не подлежат.

2.3.2. Для исследования на бруцеллез в кольцевой реакции пробу (10—15 мл) цельного свежего молока берут из одного удоя от коровы (буйволицы) в стерильную пробирку. Пробы молока на рынках берут из каждой отдельной посуды (бидон, фляга и прочее) после тщательного его перемешивания. Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

При направлении молока на исследование в лабораторию каждую пробу консервируют добавлением одной капли 10%-ного раствора формалина на 5—10 мл молока. Консервированное молоко пригодно для исследования в течение 2—3 сут. Перед исследованием его необходимо тщательно перемешать для равномерного распределения сливок. При массовом исследовании молока работу по отбору проб и постановке кольцевой реакции следует проводить непосредственно на ферме в специально отведенном помещении.

Не разрешается исследовать в кольцевой реакции молоко от коров (буйволиц), страдающих маститом или болезнями, сопровождающимися повышением температуры тела, а также молоко животных в первые 2 нед после родов.

2.4. На направляемый в лабораторию материал заполняют сопроводительный документ установленной формы.

3. Бактериологическая диагностика бруцеллеза.

3.1. Бактериологическую диагностику бруцеллеза проводят в случае аборта или при появлении у животных других признаков (бурситы, гигромы, орхиты, эпидидимиты и прочее), вызывающих подозрение на данное заболевание.

3.2. Бруцеллы обнаруживают тремя методами: бактериоскопией мазков из патологического материала, выделением культуры бруцелл на питательных средах и при необходимости путем постановки биологической пробы на морских свинках.

3.3. *Бактериоскопическое исследование.*

Из доставленного на исследование патологического материала делают по 2 мазка из каждого объекта. При исследовании абортированных плодов мазки готовят из содержимого желудка, жидкости брюшной и грудной полостей, печени, селезенки, а также котиледонов плодных оболочек. Из паренхиматозных органов, котиледонов и другого плотного материала делают мазки-отпечатки, жидкий материал наносят на предметные стекла пипеткой.

Мазки, фиксированные на пламени, окрашивают по Граму и одному из следующих специальных методов: по Стампу (модифицированный

метод Циля — Нильсена), Козловскому или Шуляку — Шин (см. приложение 1, п. 1). При микроскопии мазков учитывают, что бруцеллы — мелкие грамотрицательные, расположенные отдельно, попарно или кучно кокко-бактерии, окрашивающиеся по Стампу, Козловскому или Шуляку — Шин в красный цвет.

3.4. *Бактериологическое исследование.*

3.4.1. Для культивирования бруцелл используют мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ), печеночно-глюкозно-глицериновый бульон (ПГГБ), мясо-пептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГГА), печеночно-глюкозно-глицериновый агар (ПГГА), картофельный агар, эритрит-агар или сывороточно-декстрозный агар (см. приложение 1, п. 2).

Культивирование возбудителя инфекционного эпидидимита баранов (бруцелла овис) проводят на плотных или полужидких печеночно-сывороточном или печеночно-аминопептидном агарах, а также на сывороточно-декстрозном агаре (см. приложение 1, п. 2).

3.4.2. Перед посевом материала кожу абортированного плода с поверхности по белой линии протирают тампонами, смоченными 5%-ным раствором фенола. Стерильными ножницами вскрывают брюшную стенку и грудную клетку плода, содержимое грудной и брюшной полостей набирают пастеровскими пипетками и высевают в одну пробирку с бульоном и в две пробирки с агаром, а содержимое желудка — в две пробирки с бульоном и не менее чем в пять пробирок с агаром.

Из печени и селезенки вырезают кусочки размером не менее 2,0× ×1,5×2,5 см, овлажняют их спиртом, обжигают с поверхности и растирают в стерильной ступке с песком. Затем в ступку добавляют равное количество стерильного физиологического раствора и вновь растирают. Полученную взвесь пастеровской пипеткой по 0,1—0,2 мл высевают на поверхность предварительно подсушенных плотных сред (в пробирках или чашках). Допускается высев материала пастеровской пипеткой непосредственно из органов (место прокола органа предварительно прижигают раскаленным шпателем). Из каждого органа делают посев в одну пробирку с бульоном и в две пробирки с агаром.

Если в лабораторию доставлен только желудок плода, высев проводят не менее чем в 10 пробирок с агаром.

При поступлении нескольких плодов от одного животного посевы делают из органов и тканей каждого плода отдельно.

Из плодной оболочки, плаценты вырезают кусочки тканей с утолщенными ворсинками и стенками, наличием на поверхности фибрина или гнойного экссудата (выбирают менее загрязненные участки без некротических изменений). Для уничтожения посторонней микрофлоры кусочки плаценты помещают в чашку Петри и заливают 3%-ным раствором гидроокиси калия на 30 мин. Затем их обмывают стерильным физиологическим раствором, готовят из этого материала суспензию в ступке со стерильным песком и делают посев пастеровской пипеткой на чашки со средой, содержащей бактериостатические препараты: генцианвиолет 1 : 200 000 (0,1 мл 0,5%-ного спиртового раствора на 100 мл среды) или кристаллвиолет 1 : 100 000, генцианвиолет и малахитовую зелень в концентрации каждой краски 1 : 200 000, уксуснокислый натрий из расчета 0,125 мг на 1 мл среды.

Содержимое бурс (гигром) высевают в 3—4 чашки с плотной питательной средой, содержащей бактериостатические препараты.

Пробы молока центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин. Верхний слой (сливки) и осадок набирают в пастеровскую пипетку и по 0,1—0,2 мл вносят в 3—4 чашки с агаром, содержащим бактериостатические

препараты. Молоко, консервированное генцианвиолетом, высевают на среды без бактериостатических веществ.

3.4.3. Для выращивания культур посевы помещают в термостат при 37—38°С.

При исследовании материала от крупного рогатого скота половину пробирок и чашек с посевом инкубируют в атмосфере с повышенным содержанием углекислого газа (10—15%), другую — в обычных атмосферных условиях.

Для выделения возбудителя инфекционного эпидидимита баранов (бруцелла овис) все посевы инкубируют в атмосфере, содержащей 10—15% углекислого газа. Для создания атмосферы с повышенным содержанием углекислого газа пробирки с посевом заливают парафином или помещают в эксикатор (микроанаэростат). Перед парафинированием пробирки закрывают горящими ватными пробками, пронося последние над пламенем горелки. Затем верхнюю часть пробирки обрезают, а оставшуюся часть углубляют на 0,5—1 см внутрь пробирки и заливают расплавленным парафином.

Необходимое содержание углекислого газа в эксикаторе можно получить путем:

заполнения части объема углекислым газом из баллона или аппарата Киппа;

внесения бикарбоната натрия и серной или соляной кислоты (0,48 г бикарбоната натрия и 5 мл 25%-ного раствора серной кислоты или 0,4 г бикарбоната натрия и 0,35 мл концентрированной соляной кислоты на 1 л объема);

сжигания ваты, смоченной спиртом. При этом пробирки и чашки с посевами должны занимать не более половины объема эксикатора.

Для определения концентрации углекислого газа в эксикаторе можно использовать химический метод (см. приложение 1, п. 3).

3.4.4. Посевы выдерживают в термостате при 37—38°С в течение 30 дн. Первый просмотр посевов проводят через 18—24 ч. Пробирки с агаром и бульоном, заросшие посторонней микрофлорой, отбраковывают.

В дальнейшем для обнаружения роста бруцелл посевы просматривают каждые 3—4 дня визуально, при необходимости — через лупу или при малом увеличении микроскопа. При отсутствии роста часть поверхности агара орошают конденсационной жидкостью.

При значительном росте посторонней микрофлоры (80% и более пробирок с посевом) бактериологическое исследование прекращают.

Во время просмотра посевов обращают внимание на характер роста микробов. На поверхности агара бруцеллы образуют мелкие, блестящие, выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью просвечивающиеся колонии, имеющие в отраженном свете голубоватый оттенок, в падающем — сероватый. С возрастом колонии мутнеют и приобретают более темную окраску, что связано с появлением пигмента.

В бульоне бруцеллы образуют равномерное помутнение и пристеночное кольцо, возвышающееся над уровнем бульона, а в дальнейшем — небольшой осадок на дне пробирки. В отраженном свете пристеночное кольцо имеет голубоватый оттенок.

При обнаружении роста на жидких средах и отсутствии характерного роста на агаре из каждой пробирки готовят мазки, которые окрашивают одним из специальных методов и делают пересев на чашку с плотной средой для выделения чистой культуры. Пересевы на чашках культивируют так же, как и высевы из патологического материала.

Выделенные культуры идентифицируют по типкториальным (окраска мазков по Граму и одним из специальных методов), морфологи-

ческим, культуральным свойствам и в реакции агглютинации на стекле с позитивной бруцеллезной сывороткой.

При постановке реакции агглютинации на обезжиренное предметное стекло наносят каплю бруцеллезной сыворотки в разведении 1 : 50 и каплю той же сыворотки в разведении 1 : 2 (для выявления слабоагглютинабельных культур). В каждую каплю сыворотки бактериологической петлей вносят агаровую культуру и тщательно растирают ее. Одновременно ставят контроль с негативной сывороткой в тех же разведениях.

При положительной реакции через 1—3 мин в капле позитивной сыворотки образуются хлопья или комочки, а сама жидкость просветляется, что особенно заметно при покачивании стекла. В контроле наблюдается равномерное помутнение без образования хлопьев.

При отрицательной реакции агглютинации с культурой из одной колонии дополнительно исследуют не менее трех-четырех подозрительных колоний.

Культуры, обладающие типичными для бруцелл морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами и дающие положительную реакцию агглютинации с позитивной сывороткой, относят к бруцеллам.

Первичные культуры возбудителя инфекционного эпидидимита баранов подвергают серологической индентификации. Для этого проводят гипериммунизацию двух кроликов массой 2—3 кг путем двукратного с интервалом 7—8 дн. внутривенного введения им по 2 мл взвеси 2-суточной исследуемой культуры, содержащей 3—4 млрд. микробных клеток в 1 мл физиологического раствора. Через 10—12 дн. после второго введения от кроликов получают сыворотку крови и исследуют ее в реакции длительного связывания комплемента (РДСК) с овисным антигеном.

Культура возбудителя инфекционного эпидидимита баранов вызывает образование антител в крови кроликов (положительная РДСК). Отрицательный результат РДСК с овисным антигеном означает, что изучаемая культура не относится к возбудителю инфекционного эпидидимита баранов.

3.5. *Биологическое исследование.*

3.5.1. Биологическое исследование проводят на морских свинках (не менее двух) массой 350—400 г, предварительно проверенных на бруцеллез исследованием сыворотки их крови в РА с отрицательным результатом в разведении 1 : 5.

3.5.2. Для постановки биологической пробы используют тот же материал, что и для бактериологического исследования.

Из органов и содержимого желудка абортированного плода готовят суспензию на стерильном физиологическом растворе в соотношении 1 : 10 и вводят подкожно с внутренней стороны бедра морской свинке в дозе 1 мл.

Из плаценты и плодных оболочек (предварительно обработанных тампонами, смоченными дезинфицирующим раствором, и подсушенных сухими стерильными тампонами) вырезают кусочки размером 0,5× ×0,5 см, фламбируют их на пламени горелки, растирают в ступке со стерильным песком и заливают физиологическим раствором в соотношении 1 : 10. Полученную суспензию вводят морской свинке в дозе 1 мл.

Содержимое гигром (бурс) вводят морской свинке подкожно в дозе 0,2—0,3 мл. При этом необходимо учитывать возможность гибели животного от сопутствующей микрофлоры, особенно стрептококков.

Пробы молока центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин. Морской

свинке вводят подкожно 2—3 мл материала из верхнего слоя (сливки) и осадка молока после центрифугирования.

3.5.3. На 15-, 25- и 40-й дн. после заражения у морских свинок берут 1—2 мл крови из ушной вены путем надреза или из сердца путем пункции и сыворотку крови исследуют в пробирочной РА в разведениях от 1 : 10 до 1 : 80.

При положительной реакции агглютинации (в разведении 1 : 10 и выше) морских свинок убивают, в случае необходимости получения культуры возбудителя материал от них исследуют бактериологически. Высевы делают пастеровскими пипетками в одну пробирку с бульоном и в две пробирки с агаром из паховых, парааортальных лимфатических узлов (правых и левых), селезенки (2 высева), печени и костного мозга. Посевы культивируют, как описано в подпунктах 3.4.3 и 3.4.4.

При отрицательной РА у морских свинок в указанные выше сроки биопробу считают отрицательной, подопытных животных убивают.

3.5.4. При выделении культуры бруцелл на питательных средах из исходного материала биологическое исследование по данной экспертизе прекращают, а ранее зараженных морских свинок убивают.

3.6. Результат исследования на бруцеллез считают положительным при выделении культуры возбудителя или при получении у морской свинки положительной РА в разведении сыворотки крови 1 : 10 и выше, если из исходного материала культура не выделена.

При положительных результатах бактериоскопии и отрицательных результатах бактериологического исследования и биопробы материал считают подозрительным на бруцеллез.

3.7. Сроки исследования: бактериологического — до 1 мес, биологического — до 2 мес.

3.8. В районных и межрайонных ветеринарных лабораториях все выделенные культуры бруцелл после их идентификации подлежат уничтожению путем автоклавирования при 1,5 атм в течение 1 ч.

3.9. При необходимости определения вида бруцелл, а также в целях дифференциации полевых штаммов от вакцинных выделенные от животных культуры направляют в республиканские, областные, зональные ветеринарные лаборатории или ветеринарные научно-исследовательские учреждения, в которых имеются лаборатории или отделы, занимающиеся изучением бруцеллеза животных и имеющие разрешение органов здравоохранения на работу с микроорганизмами второй группы.

4. Методы серологической диагностики бруцеллеза.

4.1. Серологическая диагностика бруцеллеза заключается в обнаружении специфических антител в сыворотке крови животных при помощи реакции агглютинации в пробирках (РА), реакции связывания комплемента (РСК), реакции длительного связывания комплемента на холоде (РДСК), пластинчатой реакции агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба, РБП) и в молоке коров при помощи кольцевой реакции (КР).

4.2. Постановка и учет результатов реакции агглютинации в пробирках (РА).

4.2.1. Реакцию агглютинации в пробирках с бруцеллезным антигеном применяют при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, буйволов, верблюдов, оленей, собак, пушных зверей и животных других видов.

4.2.2. Компоненты реакции агглютинации:

испытуемые сыворотки крови (см. подпункт 2.3.1);

позитивная бруцеллезная сыворотка, изготовленная биопредприя-

тием или полученная от больного бруцеллезом животного. На этикетке флакона с такими сыворотками указывают титры в РА и РСК и дату изготовления:

негативная сыворотка (сыворотка крови здоровых животных), изготовленная биопредприятием или полученная в лаборатории;

антиген бруцеллезный, единый для РА, РСК и РДСК (см. приложение 2, п. 6);

раствор хлорида натрия. При исследовании сывороток крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, собак, пушных зверей и морских свинок для разведения испытуемых сывороток и антигена используют фенолизированный (0,5%-ный) физиологический раствор хлорида натрия (0,85%-ный), при исследовании сывороток крови овец, коз, буйволов — 5%-ный и оленей — 10%-ный фенолизированный раствор хлорида натрия (см. приложение 2, п. 1).

4.2.3. Постановка реакции агглютинации.

Реакцию агглютинации проводят в объеме 1 мл в четырех разведениях:

при исследовании сывороток крови овец, коз, буйволов, оленей и собак — 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100 и 1 : 200;

крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов — 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 и 1 : 400;

пушных зверей и морских свинок — 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 и 1 : 80.

При массовых исследованиях допускается постановка реакции в первых двух разведениях.

Разлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками или групповыми дозаторами Флоринского.

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок. В пробирках первого ряда делают основное разведение. Для этого сыворотку крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов берут в дозе 0,1 мл, вносят в пробирки и добавляют к ней 2,4 мл соответствующего раствора хлорида натрия (получают разведение сыворотки 1 : 25). Сыворотку крови овец, коз, буйволов, оленей и собак берут в дозе 0,2 мл и добавляют 2,3 мл соответствующего раствора хлорида натрия (разведение 1 : 12,5), а сыворотку крови пушных зверей и морских свинок берут в дозе 0,3 мл и добавляют 1,2 мл соответствующего раствора хлорида натрия (разведение 1 : 5). Таким образом делают основное разведение испытуемых сывороток в пробирках первого ряда штатива (по 10 проб в ряду).

После приготовления основного разведения сывороток в первом ряду в пробирки третьего, четвертого и пятого рядов вливают по 0,5 мл соответствующего раствора хлорида натрия. Затем из пробирок первого ряда при помощи группового дозатора Флоринского переносят в пробирки второго и третьего рядов по 0,5 мл основного разведения сывороток (1 : 25, 1 : 12,5 или 1 : 5). В пробирках третьего ряда сыворотки смешивают с раствором хлорида натрия, по 0,5 мл этого разбавления переносят в пробирки четвертого ряда и так же из пробирок четвертого ряда — в пятый. Из пробирок пятого ряда по 0,5 мл жидкости удаляют. Таким образом делают последовательные двукратные разведения одновременно 10 сывороток.

После этого в каждую пробирку второго, третьего, четвертого и пятого рядов с разведенными сыворотками вносят при помощи группового дозатора Флоринского или другого дозирующего устройства по 0,5 мл антигена, предварительно разбавленного в соотношении 1 : 10 соответствующим раствором хлорида натрия. После добавления антигена разведение сывороток в каждой пробирке удваивается и в зависимости

от вида исследуемых животных будет составлять соотношения: 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200 и 1 : 400; 1 : 25; 1 : 50; 1 : 100 и 1 : 200 или 1 : 10; 1 : 20; 1 : 40 и 1 : 80.

В пробирки первого ряда бруцеллезный антиген не вносят, и они служат контролем качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрина, эритроцитов и посторонних примесей результаты реакции агглютинации не учитывают.

При массовых исследованиях сыворотки разливают индивидуальной микропипеткой (с грушей) или групповыми дозаторами Флоринского в две пробирки в дозах 0,02 и 0,01 мл (сыворотки крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов) или 0,04 и 0,02 мл (при исследовании сывороток овец, коз, буйволов, оленей и собак). Затем в каждую пробирку по 1,0 мл антигена, разведенного соответствующим раствором хлорида натрия в соотношении 1 : 20. При этом разведения сывороток будут соответствовать соотношениям 1 : 50 и 1 : 100 или 1 : 25 и 1 : 50.

При постановке реакции агглютинации одновременно с испытуемыми сыворотками ставят контроли:

с негативной сывороткой в тех же разведениях, как с испытуемыми;

с позитивной бруцеллезной сывороткой в разведениях до ее предельного титра.

После добавления к испытуемым и контрольным сывороткам антигена штативы с пробирками осторожно встряхивают и помещают в термостат при 37—38°С на 16—20 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего проводят учет реакции.

4.2.4. Учет реакции агглютинации. Результаты реакции учитывают визуально и определяют в крестах по следующей схеме:

(++++) — полное просветление жидкости, микробные тела антигена осели на дно пробирки в виде «зонтика», при легком встряхивании «зонтик» разбивается на хлопья и комочки, а жидкость остается прозрачной (100% агглютинации);

(+++) — неполное просветление жидкости и хорошо выраженный «зонтик» (75% агглютинации);

(++) — просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен (50% агглютинации);

(+) — едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество хлопьев или комочков (25% агглютинации);

(—) — просветления жидкости и образования «зонтика» не наступило, на дне пробирки виден «пунктик» осевших микробов антигена, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь.

За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на 2 креста (++), что соответствует количеству международных единиц (МЕ) антител в 1 мл сыворотки (например, сыворотка с конечным титром РА 1 : 100 содержит 100 МЕ, 1 : 200—200 МЕ и т. п.).

Для более объективной оценки результатов РА в крестах готовят стандарты мутности, соответствующие 0, 25, 50 и 75% просветления жидкости.

В четыре пробирки последовательно наливают 1, 2, 3 и 4 мл антигена, разведенного 1 : 10. Затем в том же порядке в три первых пробирки добавляют 3, 2 и 1 мл фенолизированного физиологического раствора. В четвертую пробирку раствор не добавляют. После встряхива-

ния пробирок жидкость из каждой из них переносят по 0,5 мл в серологические пробирки и добавляют по 0,5 мл фенолизированного физиологического раствора. Полученные стандарты соответствуют 75, 50 и 25% просветления жидкости. В последней, четвертой, пробирке просветление отсутствует. Стандарты мутности готовят каждый раз при поставке РА и выдерживают в термостате одновременно с основной реакцией.

Степень просветления в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют визуально путем сравнения со стандартами и результаты реакции выражают в крестах.

При массовых исследованиях сывороток в двух разведениях все сыворотки, давшие агглютинацию с оценкой не менее чем на 2 креста (++) в каком-либо из указанных разведений, исследуют повторно в четырех разведениях.

4.2.5. Диагностическая оценка реакции агглютинации.

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сыворотками крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов *начиная с разведения 1 : 100 (100 МЕ антител); коз, овец, буйволов,* оленей и собак — с разведения 1 : 50 (50 МЕ); пушных зверей и морских свинок — с разведения 1 : 10 (10 МЕ) с оценкой не менее чем на 2 креста.

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении 1 : 50 (50 МЕ) с сыворотками крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов и в разведении 1 : 25 (25 МЕ) с сыворотками овец, коз, буйволов, оленей и собак с оценкой не менее чем на 2 креста.

При получении сомнительного результата реакции сыворотку крови данного животного исследуют повторно через 3—4 нед.

На неблагополучных по бруцеллезу фермах животных, при исследовании которых будет получена дважды сомнительная РА, относят к положительно реагирующим.

В заключении лаборатории о результатах исследования должна быть сообщена диагностическая оценка каждой пробы (положительная, сомнительная, отрицательная) и конечное разведение (титр) сыворотки, в котором получен соответствующий результат, выраженное в международных единицах (например: конечный титр сыворотки крови крупного рогатого скота 1 : 100 с оценкой 2 креста или более — «положительная 100 МЕ»; конечный титр сыворотки 1 : 50 с оценкой 2 креста или более — «сомнительная 50 МЕ»).

Суммарные результаты исследования испытуемых сывороток, серию антигена, срок его годности, а также предельный титр позитивной сыворотки записывают в журнал серологических исследований.

4.3. Постановка и учет реакции связывания комплемента (РСК) и реакции длительного связывания комплемента на холоде (РДСК).

4.3.1. Реакцию связывания комплемента применяют при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, лошадей, оленей, собак, пушных зверей и животных других видов.

Реакцию длительного связывания комплемента, как более чувствительную, применяют вместо РСК при исследовании на бруцеллез сывороток животных указанных видов, а также при диагностике инфекционного эпидидимита баранов.

4.3.2. Компоненты реакций и их подготовка к работе:

испытуемые сыворотки крови (см. подпункт 2.3.1);

позитивная бруцеллезная или овисная сыворотка, изготовленная на биофабрике или полученная от больного животного. На этикетках

флаконов с сыворотками указывают титр в РСК (РДСК) и дату изготовления;

негативная сыворотка (сыворотка крови здоровых животных), изготовленная на биофабрике или полученная в лаборатории.

Испытуемые и контрольные (позитивную и негативную) сыворотки инактивируют в водяной бане в день постановки реакции:

для РСК — при 60—62°С в течение 30 мин (сыворотки крови ослов и мулов — при 64—65°С; буйволов — при 62—64°С в течение 30; свиней — при 60—62°С в течение 50 мин); для РДСК сыворотки крови животных всех видов — при 63—64°С в течение 30 мин;

антиген бруцеллезный, единый для РА, РСК и РДСК или овисный для РДСК в рабочем титре, указанном предприятием, его изготовившим (см. приложение 2, п. 6);

комплемент — сыворотка крови морской свинки (свежая, консервированная добавлением 4% борной кислоты или лиофильно высушенная). При использовании в качестве комплемента свежей или консервированной сыворотки и при получении каждой новой серии сухого комплемента проводят титрование его в гемолитической системе для определения активности (см. приложение 2, п. 4).

Сухой биофабричный комплемент растворяют в физиологическом растворе, как указано на этикетке. Берут такое количество ампул (флаконов), в которых содержится необходимое для проведения всего опыта количество комплемента. Содержимое ампул (флаконов) сливают в одну пробирку, осторожно смешивают, берут 0,5 мл и разводят физиологическим раствором 1 : 20 для титрования. Остальное количество комплемента хранят в холодильнике при 2—4°С;

гемолитическая сыворотка (гемолизин) — для РСК в удвоенном титре, для РДСК— в утроенном. Титрование гемолизина проводят периодически один раз в 3 мес и при использовании каждой новой серии (см. приложение 2, п. 5);

эритроциты барана — 2,5%-ная от осадка взвесь эритроцитов в физиологическом растворе для РСК и 3%-ная для РДСК (см. приложение 2, п. 3).

Для приготовления гемолитической системы соответствующую взвесь эритроцитов и гемолитическую сыворотку в рабочем разведении смешивают в равных объемах и выдерживают в термостате при 37°С в течение 15—20 мин. При смешивании гемолизин вливают во взвесь эритроцитов;

физиологический раствор — 0,85%-ный раствор химически чистого хлорида натрия в дистиллированной воде pH 7,3—7,4 или физиологический раствор, содержащий ионы магния и кальция (см. приложение 2, п. 2).

Рабочие разведения всех компонентов для РСК и РДСК готовят перед постановкой реакции и проверяют их на антикомплементарность и гемотоксичность по следующей схеме.

В реакции используют компоненты, не обладающие антикомплементарными и гемотоксическими свойствами.

4.3.3. Постановка реакции связывания комплемента.

Реакцию проводят в водяной бане при 37—38°С в объеме 1 мл (по 0,2 мл каждого компонента — сыворотки, антигена, комплемента, гемолизина и эритроцитов).

Перед постановкой главного опыта проводят титрование комплемента в бактериологической системе на позитивной (бруцеллезной) сыворотке, негативной сыворотке крови того вида животных, которых исследуют, и одной сыворотке, взятой из исследуемой партии.

Компоненты	Проверка на				
	антикомплементарность	гемотоксичность			
		комплемента	гемолизина	антигена	физиологического раствора
Комплемент в разведении 1:20	0,2	0,2	—	—	—
Гемолизин в рабочем титре	0,2	—	0,2	—	—
Антиген в рабочем титре	0,4	—	—	0,4	—
Эритроциты (2,5 или 3%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	—	0,6	0,6	0,4	0,8

Водяная баня 10 мин при 37—38°С

Результат: Гемолиз Полная задержка гемолиза

Каждую сыворотку разводят 1 : 5 физиологическим раствором (1 мл сыворотки + 4 мл физиологического раствора), инактивируют, как указано в подпункте 4.3.2, и разливают по 0,2 мл в два ряда по 10 пробирок. Затем в пробирки каждого ряда вносят комплемент (разведенный 1 : 20) в возрастающих дозах от 0,02 мл до 0,2 мл с интервалом 0,02 мл и недостающее до 0,2 мл (в каждой пробирке) количество физиологического раствора.

После разлива комплемента в первый ряд пробирок с каждой сыворотки вносят по 0,2 мл антигена в рабочем разведении, а во второй ряд — по 0,2 мл физиологического раствора. Пробирки ставят в водяную баню при 37—38°С на 20 мин. Затем во все пробирки добавляют по 0,4 мл гемолитической системы, встряхивают их, вновь ставят в водяную баню на 20 мин, после чего учитывают результат.

Схема титрования комплемента в бактериологической системе (на примере негативной сыворотки) представлена в таблице 1.

Примечание. Для удобства в работе и более точной дозировки вначале рекомендуется приготовить необходимые разведения комплемента в 10-кратных объемах в отдельных пробирках. Для этого в дополнительный ряд пробирок вносят комплемент, разведенный 1 : 20, в дозах 0,2; 0,4; 0,6 мл и т. д. до 2 мл, добавляют в каждую пробирку недостающее до 2 мл количество физиологического раствора, т. е. соответственно 1,8; 1,6; 1,4 мл и т. д. Из первой пробирки этого ряда переносят по 0,2 мл жидкости в первые пробирки с сыворотками, взятыми для титрования, из второй пробирки соответственно во вторые пробирки с сыворотками и т. д. Работу можно выполнять аппаратом Флоринского.

Титром комплемента в бактериолитической системе считают минимальное его количество, вызывающее полный гомолиз взвеси эритроцитов в пробирках с негативной и испытуемой сыворотками с антигеном

Таблица 1

Схема титрования комплемента в бактериолитической системе

Компоненты реакции	Ряд пробирок в штативе	Номера пробирок									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Негативная сыворотка 1:5	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген в рабочем титре	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Физиологический раствор	Первый	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент в разведении 1:20	Первый	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
	Второй	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Недостающее количество физиологического раствора	Первый	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	—
	Второй	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	—
Водяная баня 20 мин при 37—38°С											
Гемолитическая система	Первый	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	Второй	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 20 мин при 37—38°С											
Примерный результат	Первый	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
	Второй	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Обозначения. ПГ — полный гемолиз; ЧГ — частичный гемолиз; НГ — нет гемолиза.

и без антигена, а также в пробирках с позитивной сывороткой без антигена в течение 20 мин в водяной бане при 37—38°С, при задержке гемолиза в пробирках с бруцеллезной сывороткой и антигеном.

Примечание. Если в пробирках с испытуемой сывороткой и антигеном отмечают задержку гемолиза более чем на один интервал по сравнению с этой же сывороткой без антигена, это означает, что для титрования была взята положительная сыворотка. В таких случаях определение титра комплемента проводят по ряду пробирок без антигена.

Таблица 2

Схема определения титра комплемента

Сыворотки	Ряды пробирок	Номера пробирок и дозы комплемента, мл				
		1	2	3	4	5
		0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
Позитивная	Первый	++++	++++	++++	++++	++++
	Второй	++++	++	+	+	—
Негативная	Первый	++++	++	+	+	—
	Второй	+++	++	+	—	—
Из опыта	Первый	++++	++++	+++	+++	++
	Второй	++++	+++	++	+	—

Продолжение

Сыворотки	Ряды пробирок	Номера пробирок и дозы комплемента, мл				
		6	7	8	9	10
		0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Позитивная	Первый	++++	++++	++++	++++	++++
	Второй	—	—	—	—	—
Негативная	Первый	—	—	—	—	—
	Второй	—	—	—	—	—
Из опыта	Первый	+	+	—	—	—
	Второй	—	—	—	—	—

В примере, приведенном в таблице 2, титр комплемента в бактериолитической системе равен 0,1. Рабочий титр комплемента для главного опыта на 0,02 больше, в данном случае 0,12.

Расчет количества неразведенного комплемента, необходимого для главного опыта, делают по формуле $x = AB : 20$, где x — количество неразведенного комплемента; A — рабочий титр комплемента; B — количество пробирок в опыте; 20 — основное разведение комплемента (1 : 20).

Пример. $x = (0{,}12 \times 100) : 20 = 0{,}6$. Так как количество комплемента в рабочем разведении, требующееся для всей реакции (в данном

примере 100 пробирок), равно 20 мл (0,2×100), то к 0,6 мл неразведенного комплемента следует добавить 19,4 мл физиологического раствора.

4.3.4. Проведение главного опыта.

Испытуемые сыворотки исследуют в разведениях 1 : 5 и 1 : 10 с антигеном и 1 : 5 без антигена (контроль на антикомплементарность сывороток), при массовом исследовании реакцию проводят в одной пробирке в разведении сыворотки 1 : 5 с антигеном (табл. 3).

Необходимые разведения сывороток рекомендуется готовить следующим образом:

при исследовании в одной пробирке берут 0,04 мл испытуемой сыворотки и добавляют 0,16 мл физиологического раствора (разведение 1 : 5). Допускается при работе с аппаратом Флоринского к 0,05 мл испытуемой сыворотки добавлять 0,2 мл физраствора;

при постановке реакции в трех пробирках в первую наливают 0,1 мл испытуемой сыворотки и добавляют 0,4 мл физиологического раствора (разведение 1 : 5). Из первой пробирки 0,2 мл переносят во вторую и 0,1 мл — в третью, в которую затем добавляют 0,1 мл физиологического раствора (разведение 1 : 10);

инактивирование разведенных сывороток проводят в порядке, указанном в подпунктах 4.3.2;

разлив сывороток, физиологического раствора и других компонентов реакции проводят при помощи пипеток или аппарата Флоринского.

Реакцию проводят по схеме главного опыта (см. табл. 3).

Таблица 3

Схема главного опыта РСК

Компоненты реакции	При массовом исследовании		Для повторного исследования			
	пробирки с испытуемыми сыворотками	контроль гемолитической системы	пробирки для каждой испытуемой сыворотки			контроль гемолитической системы
			1	2	3	
Испытуемая сыворотка	0,04	—	0,04	0,04	0,02	—
Физиологический раствор	0,16	0,6	0,36	0,16	0,18	0,6
Инактивирование сывороток						
Антиген в рабочем титре	0,2	—	—	0,2	0,2	—
Комплемент в рабочем разведении	0,2	—	0,2	0,2	0,2	—
Водяная баня 20 мин при 37—38°С						
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 20 мин при 37—38°С						

Примечание. Допускается смешивание перед разливом равных объемов антигена и комплемента.

Главный опыт сопровождается следующими контролями:

негативная и бруцеллезная сыворотки в разведениях 1 : 5 и 1 : 10 с антигеном и 1 : 5 без антигена (по схеме главного опыта);

гемолитическая система (0,6 мл физиологического раствора и 0,4 мл гемолитической системы).

4.3.5. Постановка реакции длительного связывания комплемента. РДСК на холоде проводят в пробирках в объеме сыворотки, антигена и комплемента по 0,2 мл, гемолитической системы — в оттитрованной рабочей дозе.

Последовательность постановки РДСК:

первый день — разлив испытуемых и контрольных сывороток для главного опыта и для титрования гемолитической системы;

инактивирование сывороток;

контроль компонентов реакции на антикомплементарность и гемотоксичность;

разлив антигена и комплемента;

приготовление гемолитической системы;

помещение пробирок в холодильник;

второй день — выдерживание пробирок главного опыта и гемолитической системы при комнатной температуре 20 мин;

титрование гемолитической системы;

определение рабочей дозы гемолитической системы;

главный опыт,

разлив гемолитической системы в пробирки с исследуемыми сыворотками;

учет и оценка результатов реакции.

Испытуемые сыворотки исследуют в разведениях 1 : 5 и 1 : 10 с антигеном и 1 : 5 без антигена (контроль на антикомплементарность сыворотки), при массовом исследовании реакцию проводят в одной пробирке в разведении сыворотки 1 : 5 с антигеном (см. табл. 6). Одновременно разливают сыворотки для титрования гемолитической системы. Необходимые разведения сывороток готовят в порядке, как указано в подпункте 4.3.3. Инактивирование разведенных сывороток крови проводят, как указано в подпункте 4.3.2.

Комплемент применяют в рабочем разведении 1 : 25 или 1 : 30 (при титре в гемсистеме, указанном биопредприятием,— 0,19—0,22).

Примечание. Если титр комплемента в гемсистеме не известен, перед постановкой реакции определяют его рабочее разведение по схеме согласно таблице 4.

Разлив компонентов и последовательность постановки реакции осуществляют по схеме, указанной в таблице 6.

Перед разливом гемолитической системы в пробирки с исследуемыми сыворотками проводят титрование гемолитической системы на трех сыворотках — негативной (свежей или консервированной), позитивной (бруцеллезной или овисной) и сыворотке исследуемой партии по схеме согласно таблице 5.

Титром гемолитической системы считают наибольшее ее количество, в котором произошел полный гемолиз в обоих рядах пробирок с негативной и испытуемой сыворотками и в безантигенном ряду с позитивной сывороткой. Рабочий титр — на один интервал ниже (например, при титре гемолитической системы 0,6 мл, рабочий титр — 0,5 мл).

Таблица 4

Схема определения рабочего разведения комплемента для РДСК

Компоненты	Номера пробирок и разведения комплемента									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80	1:90	1:100
Приготовление разведений комплемента										
Комплемент в разведении 1:10	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физиологический раствор	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Титрование комплемента										
Комплемент в разведениях	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 10 мин при 37—38°С										
Примерный результат	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ

В данном примере полный гемолиз получен при разведении комплемента 1:50, рабочее разведение его в 2 раза меньше т. е. 1:25.

Таблица 5

Схема титрования гемолитической системы

Компоненты реакции	Ряд пробирок в штативе	Номера пробирок									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Позитивная, негативная или испытуемая сыворотка в разведении 1:5	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	Первый	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген в рабочем титре	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Комплемент в рабочем разведении	Первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Холодильник 16—18 ч при плюс 2—6°С											
Гемолитическая система	Первый	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
	Второй	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Водяная баня 20 мин при 37—38°С											
Примерный результат	Первый	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ
	Второй	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ

Примечание. Если в пробирках с испытуемой сывороткой и антигеном гемолиз будет отсутствовать, это означает, что для титрования гемсистемы была взята положительная сыворотка. В таких случаях при определении титра гемсистемы следует учитывать показания реакции в пробирках без антигена.

Таблица 6

Схема постановки РДСК

Компоненты реакции	При массовом исследовании		Для повторного исследования			
	пробирки с испытуемыми сыворотками	контроль гемолитической системы	пробирки для каждой испытуемой сыворотки			контроль гемолитической системы
			1	2	3	
Испытуемая сыворотка	0,04	—	0,04	0,04	0,02	—
Физиологический раствор	0,16	0,6	0,36	0,16	0,18	0,6
Водяная баня 30 мин при 63—64°С						
Антиген бруцеллезный или овисный в рабочем титре	0,2	—	—	0,2	0,2	—
Комплемент в рабочем разведении	0,2	—	0,2	0,2	0,2	—
Холодильник 16—18 ч при плюс 2—6°С и 20 мин при комнатной температуре						
Гемолитическая система в рабочем титре	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Водяная баня 20 мин при 37—38°С						

Контроли реакции:

негативная и позитивная (бруцеллезная или овисная) сыворотки в разведениях 1 : 5 и 1 : 10 с антигеном и 1 : 5 без антигена;

гемолитическая система без сыворотки, антигена и комплемента.

4.3.6. Учет результатов РСК и РДСК проводят визуально. При постановке реакций в одной пробирке (при массовом исследовании) учет проводят один раз — сразу после извлечения штативов из водяной бани; при исследовании в трех пробирках — через 3—4 ч, когда в контрольных пробах с позитивной (бруцеллезной или овисной) сывороткой эритроциты осядут на дно пробирки, или на следующий день (в этом случае штативы с пробирками главного опыта оставляют в холодильнике).

Результаты реакций оценивают в крестах по следующей схеме:

(++++) — отсутствие гемолиза, надосадочная жидкость прозрачная и бесцветная;

(+++) — гемолиз 25% эритроцитов;

(++) — гемолиз 50% эритроцитов;

(+) — гемолиз 75% эритроцитов;

(—) — полный гемолиз эритроцитов, осадок отсутствует, жидкость интенсивно окрашена гемоглобином.

Степень задержки гемолиза эритроцитов определяют по шкале, которую готовят перед учетом реакции. Для этого из реакции выбирают 5 пробирок с полным гемолизом и жидкость из них сливают в одну. Из этой жидкости готовят разведения с меньшим процентом гемолиза по следующей схеме.

Номера пробирок	1	2	3	4	5
Гемолизированная жидкость . . .	1,0	0,75	0,5	0,25	—
Физиологический раствор	—	0,25	0,5	0,75	1,0
Процент гемолиза	100	75	50	25	0

Степень гемолиза в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют путем сравнения со степенью гемолиза в пробирках шкалы и процент гемолиза выражают в крестах.

4.3.7. Диагностическая оценка РСК и РДСК. При исследовании сывороток в одной пробирке (в разведении 1 : 5 с антигеном) все сыворотки, давшие задержку гемолиза на один крест и выше, исследуют повторно в тот же или на другой день в трех пробирках в разведениях 1 : 5 и 1 : 10 с антигеном и 1 : 5 без антигена.

Реакцию считают положительной при задержке гемолиза на 2—4 креста в одном или в двух разведениях сыворотки (1 : 5 или 1 : 10) и полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена); сомнительной — при задержке гемолиза с оценкой в один крест. При получении сомнительного результата сыворотки крови от животных через 15—30 дн. исследуют повторно. При этом животных, с сывороткой крови которых получена дважды сомнительная РСК (РДСК), считают реагирующими положительно.

Суммарные результаты исследования испытуемых сывороток по каждой экспертизе, номера серий, сроки годности антигена, комплемента, гемолизина и их рабочие титры записывают в журнал серологических исследований.

В заключении лаборатории о результатах исследования сывороток крови животных указывают диагностическую оценку каждой пробы (положительная, сомнительная, отрицательная) и показания реакции в крестах.

4.4. Постановка и учет результатов пластинчатой реакции агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба, или РБП).

4.4.1. Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз бенгал антигеном (РБП) применяют для исследования сывороток крови при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, свиней, буйволов, верблюдов и северных оленей.

4.4.2. Компоненты РБП:

испытуемые сыворотки крови (см. подпункт 2.3.1);

бруцеллезный антиген, окрашенный бенгальским розовым (роз бенгал антиген) (см. приложение 2, п. 6);

позитивная бруцеллезная и негативная сыворотки;

0,5%-ный фенолизированный физиологический раствор (см. приложение 2, п. 1).

4.4.3 Постановка РБП. Реакцию проводят на чистых сухих эмалированных пластинках с лунками при температуре 18—30°С. На борти-

ках пластинки против каждой лунки записывают номер исследуемой сыворотки.

Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки при помощи шприца-полуавтомата (ШПРБ-1) или микропипетки. После внесения каждой сыворотки шприц-полуавтомат (микропипетку) трижды промывают фенолизированным физиологическим раствором и кончик подсушивают фильтровальной бумагой.

При исследовании сывороток крови крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов и свиней в каждую лунку рядом с сывороткой при помощи пипетки-капельницы вносят 0,03 мл антигена, а при исследовании сывороток крови овец, коз, буйволов и северных оленей — 0,015 мл антигена. Затем антиген тщательно в каждой лунке смешивают с сывороткой активными движениями ручного полисмесителя до получения однородной смеси, распределяя ее при этом по всей поверхности лунки. После смешивания сывороток каждого ряда лунок (смесителем на 5 проб) или во всех лунках пластинки (смесителем на 25 проб) смеситель ополаскивают фенолизированным физиологическим раствором и просушивают марлевой салфеткой или фильтровальной бумагой.

Пластинку с сыворотками и антигеном покачивают в течение 4 мин осторожными вращательными движениями вручную или при помощи автоматического прибора, предназначенного для этой цели. При положительной реакции в течение 4 мин появляются мелкие или крупные хлопья агглютината розового цвета.

В начале работы ставят контроль антигена с негативной и позитивной бруцеллезной (с активностью 100—200 МЕ) сыворотками в тех же дозах, а также контроль антигена на спонтанную агглютинацию (к 0,03 мл антигена добавляют 0,03 мл физиологического раствора).

4.4.4. Учет результатов реакции проводят невооруженным глазом в течение 4 мин после смешивания сывороток с антигеном при слегка наклонном положении пластинки.

Реакцию считают п о л о ж и т е л ь н о й при наличии выраженной агглютинации окрашенных бруцелл антигена в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета, выделяющихся на белом фоне лунки. Реакцию считают о т р и ц а т е л ь н о й при отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена).

После учета реакции пластинки дезинфицируют погружением их на 5 мин в 3%-ный раствор фенола, затем тщательно моют водопроводной водой, высушивают на воздухе и используют повторно. Для проведения дезинфекции и сушки пластинок используют кассеты и штативы-сушилки.

При нечетко выраженной агглютинации проводят повторное исследование данной сыворотки и по результатам его дают окончательную оценку реакции (положительная или отрицательная).

4.4.5. Диагностическая оценка РБП. При получении положительного результата РБП при исследовании сывороток крови животных в благополучных по бруцеллезу хозяйствах все сыворотки, с которыми получена положительная РБП, в тот же или на другой день исследуют в РА и РСК (см. подпункты 4.2 и 4.3) для установления титра агглютининов и наличия комплементсвязывающих антител. Сыворотки, с которыми получена отрицательная РБП, дополнительно в РА и РСК не исследуют.

Диагностическую оценку результатов исследования сывороток крови в РБП проводят по следующей схеме.

В случае получения положительного результата РБП при исследовании сывороток крови животных в неблагополучных по бруцеллезу

Результаты реакций			Диагностическая оценка
РБП	РА	РСК (РДСК)	
Положительная	Положительная	Положительная	Положительная
»	»	Сомнительная	»
»	»	Отрицательная	»
»	Сомнительная	Положительная	»
»	»	Сомнительная	»
»	»	Отрицательная	»
»	Отрицательная	Положительная	»
»	»	Сомнительная	»
»	»	Отрицательная	Сомнительная
Отрицательная	Не исследуется	Не исследуется	Отрицательная

стадах (на фермах, в хозяйствах, населенных пунктах) овец, коз, свиней и северных оленей признают больными бруцеллезом, а сыворотки крови крупного рогатого скота, буйволов, лошадей и верблюдов дополнительно исследуют в РА и РСК. Диагностическую оценку результатов исследования сывороток в РБП в этом случае проводят по схеме, приведенной выше.

В заключении лаборатории о результатах исследований сообщают диагностическую оценку (положительная, сомнительная, отрицательная) и указывают показания всех реакций. Например, «положительная (РБП положительная, РА 200 МЕ, РСК ++)»; «сомнительная (РБП положительная, РА —, РСК —)».

При диагностической оценке «сомнительная» сыворотку крови данного животного повторно исследуют через 15—30 дн. в РБП, РА и РСК (РДСК). При получении положительных или вновь сомнительных показаний реакций результат исследования оценивают положительно.

4.5. Постановка и учет кольцевой реакции с молоком (КР).

4.5.1. Кольцевую реакцию применяют с целью проверки благополучия стад (ферм) по бруцеллезу крупного рогатого скота и для проверки молока при продаже его на рынках.

Исследование молока на бруцеллез в КР проводят непосредственно в хозяйствах, в ветеринарных лабораториях, на мясо-молочных и пищевых контрольных станциях.

Исследование молока в КР разрешается проводить только ветеринарным врачам лабораторий, мясо-молочных и пищевых контрольных станций и ветеринарным врачам хозяйств, прошедшим при лабораториях специальную подготовку по постановке и учету реакции.

4.5.2. Компоненты реакции:

исследуемое молоко (см. подпункт 2.3.2);

антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком (см. приложение 2, п. 6);

сыворотка позитивная бруцеллезная.

4.5.3. Постановка кольцевой реакции. Уленгутовские пробирки устанавливают в резиновые штативы и нумеруют в соответствии с описью проб молока. В пробирки разливают по 0,05 мл антигена, затем шприцем с иглой длиной 50—60 мм, нажимая на поршень слабыми толчками, вливают в них по 1 мл молока и тщательно смешивают его с антигеном. После каждой пробы молока шприц двукратно промывают теплой водой,

При постановке КР в пробирках Флоринского или серологических берут по 2 мл молока и добавляют по 0,1 мл антигена, затем пробирки тщательно встряхивают для перемешивания молока с антигеном.

При каждой постановке реакции одновременно с испытуемыми пробами молока ставят контроли: с молоком от заведомо здоровой коровы (буйволицы); со смесью молока здоровой коровы и позитивной бруцеллезной сыворотки (0,05 мл сыворотки на 1 мл молока).

Штативы с испытуемыми и контрольными пробами молока помещают в водяную баню или термостат при 37—38°С на 1 ч.

4.5.4. Учет и оценка результатов кольцевой реакции. Результаты реакции учитывают визуально сразу после извлечения штативов из водяной бани (термостата) по следующей схеме (в крестах):

(+++) — четко выраженное синее кольцо в верхней части столбика молока в слое сливок (остальная часть молока остается белой);

(++) — достаточно выраженное синее кольцо в слое сливок (остальная часть молока имеет синеватый цвет);

(+) — синее кольцо в слое сливок выражено слабо, и весь столбик молока имеет синий цвет;

(—) — столбик молока остается равномерно окрашенным в первоначальный синий цвет, который был получен сразу после добавления к нему антигена, а слой сливок — белого или слегка желтоватого цвета.

Все пробы молока, давшие кольцевую реакцию с оценкой 3 и 2 креста, считают положительными, а с оценкой 1 крест — сомнительными.

При получении положительного или сомнительного результата КР от всех животных берут кровь для исследования на бруцеллез в РБП или РА и РСК (РДСК), проводят эпизоотологическое обследование хозяйства, клинический осмотр и исследование животных на заболевание маститами.

При получении отрицательных результатов исследования сывороток крови в РБП или в РА и РСК (РДСК) у всех животных данное стадо считают благополучным по бруцеллезу, а животных, с молоком которых получена положительная КР, оставляют в стаде.

В случае получения положительных результатов исследования на бруцеллез крови с животными стада поступают в соответствии с инструкцией о мероприятиях по профилактике и ликвидации бруцеллеза животных. При этом изолируют также и животных, выделенных при исследовании молока в КР, если эта реакция не была связана с другим заболеванием животных.

Приложение 1

1. Методы окраски бруцелл

Окраска мазков по Стампу. Фиксированный на пламени мазок окрашивают 10 мин раствором карболового фуксина Циля в разведении 1 : 10, слегка промывают водой и дифференцируют 0,5%-ным раствором уксусной кислоты 30 с. Вновь тщательно промывают водой и докрашивают 1%-ным раствором метиленового синего 20—30 с. Краску сливают, мазок промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: бруцеллы — красные, другая микрофлора и фон препарата — синие.

Окраска мазков по Козловскому. Фиксированный на пламени мазок окрашивают 2%-ным раствором сафранина, подогревая до появления пузырьков. Затем мазок быстро промывают водой и дополнительно окрашивают 0,75—1%-ным водным раствором малахитового зеленого

0,5—1 мин. Краску сливают, мазок промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: бруцеллы — ярко-красные, другая микрофлора и фон препарата окрашены в зеленый цвет.

Раствор малахитового зеленого может быть заменен 1%-ным раствором метиленового синего или бриллиантовой зелени.

Окраска мазков по Шуляку — Шин. Фиксированный на пламени мазок окрашивают 2 мин карболовым фуксином Циля, разведенным 1 : 5, промывают водой и докрашивают 5 мин 2%-ным водным раствором метиленового синего. Краску сливают, мазок промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: бруцеллы — ярко-красные, другая микрофлора и фон препарата окрашены в сине-голубой цвет.

2. Приготовление питательных сред

Мясная вода. Свежее мясо крупного рогатого скота освобождают от костей, жира и сухожилий и пропускают через мясорубку. 500 г фарша заливают 1 л водопроводной воды и выдерживают 15—18 ч в прохладном месте. Затем настой кипятят 30—40 мин, доливают дистиллированной водой до первоначального объема и фильтруют через ватно-марлевый фильтр или через полотно. Полученную мясную воду стерилизуют при 120°С 20 мин.

Печеночная вода. Свежую печень крупного рогатого скота освобождают от жира, канальцев, пленок и пропускают через мясорубку. 500 г фарша заливают 1 л водопроводной воды, настаивают в течение 1 ч и кипятят при помешивании 30 мин. После отстаивания фарш удаляют, а жидкость доливают дистиллированной водой до первоначального объема и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Разливают по колбам, стерилизуют при 112°С (0,5 атм) 30—40 мин.

Мясо-пептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГГА). К 610 мл мясной воды добавляют 305 мл печеночной воды, 10 г пептона, 5 г х. ч. хлорида натрия и 20—30 г агар-агара, предварительно промытого и хорошо отжатого. Смесь варят в течение 1 ч в автоклаве, фильтруют через нейлоновый или ватно-марлевый фильтр, устанавливают pH 7,2, добавляют 10 г глюкозы и 20 мл глицерина. Среду разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют при 110°С (0,4 атм) 30 мин; pH среды до стерилизации 7,3—7,4, после стерилизации 6,3—7,0.

Мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) готовят аналогично МППГГА, но без добавления агар-агара, глюкозы и глицерина.

Печеночно-глюкозно-глицериновый агар (ПГГА). К печеночной воде добавляют 1% пептона, 0,5% х. ч. хлорида натрия и 2—3% агар-агара, предварительно промытого и хорошо отжатого. Смесь варят в течение 1 ч в автоклаве, фильтруют через нейлоновый или ватный фильтр, устанавливают pH 7,0—7,2, добавляют 1% глюкозы и 2—3% глицерина. Среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 110°С (0,4 атм) 30 мин.

Печеночно-глюкозно-глицериновый бульон готовят аналогично ПГГА, но без добавления агар-агара.

Картофельный агар. 500 г очищенного картофеля (берут белые или желтые клубни средней величины), нарезанного ломтиками, варят в 1 л водопроводной воды до готовности (избегать сильного разваривания картофеля). Затем отвар фильтруют через ватный фильтр и дистиллированной водой доводят объем до первоначального (1 л). К фильтрату добавляют 1% пептона, 0,5% х. ч. хлорида натрия и 2—3% агар-агара. Смесь варят до полного расплавления агара, устанавливают pH 7,2

и отстаивают в теплом месте. В застывшем агаре срезают нижний слой с осадком, а прозрачную часть агара расплавляют и фильтруют через ватный фильтр. Вновь устанавливают pH 7,2, добавляют 1% глюкозы и 3% глицерина, разливают по пробиркам или колбам и стерилизуют при 115°С (0,7 атм) 20—30 мин. После стерилизации pH среды 6,8.

Сывороточно-декстрозный агар. К 835 мл дистиллированной воды добавляют 20 г агар-агара, 10 г пептона, 5 г х. ч. хлорида натрия и 165 мл мясной воды. Смешивают, кипятят до расплавления агара, устанавливают pH 7,8. Затем стерилизуют текучим паром в течение 1 ч, после чего пар закрывают, давление доводят до 2 атм и нагреватель выключают. После автоклавирования среду отстаивают в течение 1 ч, затем фильтруют через ватный или бумажный фильтр, доводят pH до 7,4, разливают в колбы, учитывая объем среды, и стерилизуют при 115°С (0,7 атм) 15 мин.

Перед употреблением среду расплавляют, охлаждают до 50°С и добавляют к ней нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота или лошади и раствор декстрозы, профильтрованные через фильтр Зейтца. Конечная концентрация сыворотки в среде должна быть 10%, декстрозы — 1%.

Плотный печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар. К 1000 мл печеночной воды добавляют 10 г пептона, 5 г х. ч. хлорида натрия, 20 г агар-агара. К полученной смеси добавляют 17 мл 10%-ного раствора двууглекислой соды и автоклавируют при 115°С (0,7 атм) 20—25 мин, фильтруют через ватный фильтр, устанавливают pH 7,0—7,2 и добавляют 10 г глюкозы и 20 мл глицерина. Разливают в колбы и стерилизуют при 110°С (0,4 атм) 20 мин. Хранят в прохладных условиях. Перед употреблением смесь расплавляют, охлаждают до 50°С и добавляют 10—20% стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота (овец) или 10—15% аминопептида, затем разливают в пробирки или бактериологические чашки.

Полужидкий печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар. Берут мясной и печеночной воды по 500 мл, добавляют 10 г пептона, 5 г х. ч. хлорида натрия, 1,5—2 г агар-агара. Устанавливают pH 7,0—7,2. Смесь кипятят, разливают в колбы и стерилизуют в автоклаве при 115°С (0,7 атм) 30 мин. Хранят на холоде. Перед употреблением добавляют стерильную сыворотку крови крупного рогатого скота или овец или аминопептид из расчета 10% к объему среды и разливают в пробирки.

Эритрит-агар. Представляет собой готовую питательную среду для выделения бруцелл. Готовится по прописи завода-изготовителя.

3. Определение концентрации углекислого газа

В пробирку наливают 2—3 мл 0,1%-ного раствора бикарбоната натрия и добавляют 1—2 капли 0,5%-ного раствора бромтимолового синего. В обычной атмосфере смесь имеет отчетливый синий цвет.

Пробирку ставят в эксикатор, в котором необходимо определить содержание углекислого газа. Учет проводят через 1 ч по изменению окраски смеси, пользуясь следующей таблицей.

Окраска смеси	Процентное содержание CO_2 в атмосфере эксикатора
Синяя	До 5
Сине-зеленая	5
Зеленая	10
Зелено-желтая	15
Желтая	20

1. Приготовление фенолизированных растворов хлорида натрия для РА

Для приготовления фенолизированного 0,85; 5 и 10%-ного раствора хлорида натрия в 1000 мл дистиллированной воды растворяют при подогревании соответственно 8,5; 50 или 100 г хлорида натрия и 5 г фенола. Доводят pH раствора до 7,0—7,2 и фильтруют через бумажный фильтр.

2. Приготовление физиологического раствора хлорида натрия с добавлением ионов магния и кальция (для РСК и РДСК)

Основные растворы солей магния и кальция готовят следующим образом: 1 г х. ч. хлорида магния растворяют в 11,8 мл и 1 г х. ч. хлорида кальция — в 54,4 мл дистиллированной воды. Основные растворы этих солей хранят в холодильнике.

Перед постановкой реакции берут на 1 л физиологического раствора хлорида натрия по 1,2 мл основных растворов хлорида магния и хлорида кальция. Смесь кипятят, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и доводят pH до 7,3—7,4 прибавлением едкого натра или соляной кислоты.

3. Получение и подготовка к работе эритроцитов барана для постановки РСК и РДСК

Кровь у барана (овцы) берут из яремной вены с соблюдением правил асептики в сосуд со стеклянными или фарфоровыми бусами (для дефибринирования) или в сосуд с налитым в него раствором Алсивера в количестве, равном объему крови (для дефибринирования и консервирования). Для консервирования дефибринированной крови применяют раствор стрептомицина (1 г стрептомицина, растворенного в 20 мл физиологического раствора, на 100 мл крови).

Дефибринированная кровь пригодна для исследования в течение 3 дн., консервированная стрептомицином или раствором Алсивера — в течение 12 дн.

Приготовление раствора Алсивера: в 1000 мл дистиллированной воды растворяют 18,7 г глюкозы, 4,2 г хлорида натрия, 8,0 г лимоннокислого натрия, 0,5 г лимонной кислоты. Раствор доводят до кипения, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы или флаконы и стерилизуют в автоклаве (при 103—105°С 30 мин) через фильтр Зейтца.

Для приготовления суспензии эритроцитов крови барана берут свежую дефибринированную или консервированную кровь, центрифугируют при 1500—3000 об/мин 15 мин, жидкую часть сливают, а осадок 2—3 раза отмывают в физиологическом растворе путем центрифугирования в указанном порядке до полного обесцвечивания надосадочной жидкости.

4. Титрование комплемента в гемолитической системе в РСК

Комплемент титруют в разведении 1 : 20 в дозах от 0,02 до 0,2 мл с интервалами в дозах по 0,02 мл. После внесения комплемента в каждую пробирку добавляют недостающее до 0,2 мл количество физиологического раствора и остальные компоненты по схеме, как указано в таблице 1.

Титром комплемента в гемолитической системе считают наименьшее количество его, вызывающее полный гемолиз эритроцитов в течение 10 мин в водяной бане при 37—38°С.

Таблица 1

Схема титрования комплемента в гемолитической системе

Компоненты	Номера пробирок									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент в разведении 1:20	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Физиологический раствор	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	—
Гемолизин в удвоенном титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2,5%-ная взвесь эритроцитов барана	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 10 мин при 37—38°С										
Примерный результат	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Таблица 2

Схема титрования гемолизина

Компоненты	Разведение гемолизина							
	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500	1:4000
Гемолизин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент в разведении 1:20	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Эритроциты (2,5%-ная взвесь)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 10 мин при 37—38°С								
Примерный результат	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ

В примере, приведенном в таблице, титр комплемента в гемолитической системе равен 0,08.

5. Титрование гемолизина

Гемолизин титруют периодически один раз в 3 мес и каждую новую серию в разведениях 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 1500, 1 : 2000, 1 : 2500, 1 : 3000, 1 : 3500 и 1 : 4000 по схеме, как указано в таблице 2.

Разведение гемолизина готовят из основного (1 : 100) по следующей схеме.

Основное разведение гемолизина 1:100, мл	Физиологический раствор, мл	Получаемые разведения
0,4	1,6	1:500
0,1	0,9	1:1000
0,1	1,4	1:1500
0,1	1,9	1:2000
0,1	2,4	1:2500
0,1	2,9	1:3000
0,1	3,4	1:3500
0,1	3,9	1:4000

Титром гемолизина считают наименьшее его количество, необходимое для полного гемолиза в течение 10 мин 0,2 мл взвеси эритроцитов в присутствии 0,2 мл комплемента, разведенного 1 : 20. В приведенной таблице 2 титр гемолизина равен 1 : 1500.

Рабочий титр гемолизина для РСК в 2 и для РДСК в 3 раза выше. Так, если титр гемолизина равен 1 : 1500, то рабочий титр в РСК будет 1 : 750, в РДСК — 1 : 500.

6. Бруцеллезные антигены, используемые в серологических реакциях

Антиген бруцеллезный, единый для РА, РСК и РДСК, изготовленный на биофабрике, представляет собой гомогенную взвесь инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл в физиологическом растворе. Специфическая активность антигена стандартизована по референтной агглютинирующей сыворотке, что позволяет выражать результаты реакции агглютинации в международных единицах антител на 1 мл сыворотки (например, сыворотка с конечным титром РА 1 : 100 с оценкой 2 креста и более содержит 100 МЕ, 1 : 200 — 200 МЕ и т. д.).

Перед употреблением антиген тщательно встряхивают.

Антиген бруцеллезный для роз бенгал пробы (РБП), изготовленный на биофабрике, представляет собой стандартизованную суспензию в буферном растворе инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым в розовый цвет.

Перед употреблением антиген выдерживают 30—40 мин при комнатной температуре и затем тщательно встряхивают.

Антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком представляет собой стандартизованную взвесь убитых бруцелл, окрашенных гематоксилином в синий цвет. Перед употреблением антиген тщательно встряхивают.

Антиген овисный для РДСК, изготовленный на биофабрике, представляет собой прозрачную, желтовато-зеленоватого цвета жидкость, полученную из клеток бруцелла овис путем экстрагирования.

Антигены хранят в сухом темном месте при температуре 2—12°С.

Антигены во флаконах без этикеток (без надписи) или с трещинами, содержащие постороннюю примесь, неразбивающиеся хлопья, плесень, с истекшим сроком годности или подвергавшиеся замораживанию для применения непригодны.

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