МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

Российская сельскохозяйственная академия

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ ЖИВОТНЫХ И АНАЭРОБНОЙ ДИЗЕНТИРИИ ЯГНЯТ

Москва 1984

gost.e-ecolog.ru

ББК 46.61

636.3
Л94

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ ЖИВОТНЫХ И АНАЭРОБНОЙ ДИЗЕНТИРИИ ЯГНЯТ

Утверждены Главным управлением ветеринарии
Министерства сельского хозяйства СССР 15 февраля 1984 г.

У $\frac{40902-87}{\text{М 123 (09)}-81}$

(С) Россельхозиздат, 1984 г.

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ

Одним из важнейших резервов в овцеводстве, особенно в условиях отгонно-пастбищного содержания поголовья, наряду с укреплением кормовой базы, улучшением кормления и условий содержания овец, является снижение заболеваемости и падежа животных от различных инфекционных, инвазионных и незаразных болезней. Анализ причин падежа овец в ДАССР показал, что от анаэробных заболеваний (энтеротоксемия овец, дизентерия ягнят) гибнет животных больше, чем от всех инфекционных болезней вместе взятых.

Возбудителями анаэробных болезней являются микроорганизмы группы Кл. перфрингенс, включающие в себя 6 типов (А, В, С, Д, Е, Г). Бактерии рода клостридий широко распространены в природе, могут вызывать энтеротоксемию у телят, дизентерию у поросят, злокачественный отек у крупного рогатого скота, овец и свиней, гастроэнтериты у жеребят и цыплят. Нередко эти анаэробы являются виновниками возникновения газовой гангрены, гастроэнтеритов и пищевых отравлений у человека.

Успех лечебно-профилактических мер против указанных клостридиозов во многом зависит от точно и своевременно поставленного диагноза. По существующей инструкции он устанавливается в течение восьми суток путем проведения сложных лабораторных исследований с использованием множества белых мышей.

Поэтому перед ветеринарной наукой стоит задача разработать более ускоренные и чувствительные методы диагностики клостридиозов и внедрить их в лабораторную практику.

Одним из таких методов является люминесцентно-серологический, сущность которого заключается в соединении меченых флуорохромами антител со специфическими антигенами и выявлении образовавшихся светящихся комплексов при люминесцентной микроскопии.

В настоящее время этим методом диагностируются такие инфекционные заболевания животных, как сибирская язва, туберкулез, листериоз, сальмонеллезы, бешенство и др.

На возможность использования реакции иммунофлуоресценции для дифференциации типов Кл. перфрингенс указали Козловский Е. Г. и Ефанова М. И. (1970). Однако исследования Полынкова Д. Г. (1969) не дали положительных результатов.

В ВИЭВ под руководством профессора И. И. Архангельского и зав. лаб. болезней овец Ю. Д. Караваева выполнены исследования по идентификации микробов Кл. перфрингенс с использованием реакции иммунофлуоресценции. При этом было установлено, что эта реакция, хотя и вызывает свечение всей группы микроорганизмов, но типизировать Кл. перфрингенс не позволяет.

Учитывая перспективность реакции иммунофлуоресценции, мы применили ее для экспресс-диагностики инфекционной энтеротоксемии овец и анаэробной дизентерии ягнят.

Для этого мы изготовили антигены из микробов Кл. перфрингенс типов А, В, С, Д, а также из их токсинов. Путем гипериммунизации баранов этими антигенами получили противобактериальные и антитоксические сыворотки, глобулиновые фракции, которых после конъюгирования с изотиоционатом флуоресцеина использовали для идентификации микробов Кл. перфрингенс методом флуоресцирующих антител.

Сцецифичность окрашивания меченых иммуноглобулинов проверяли на препаратах, приготовленных из различных штаммов музейных культур Кл. перфрингенс типа А, В, С и Д, а также Кл. оедематиенс и Кл. септикум.

Результаты многократно проведенных исследований показали, что полученные антибактериальные флуоресцирующие сыворотки типа А, В, С и Д специфически окрашивают соответствующие гомологичные микробы Кл. перфрингенс. Характерным для них было четкое золотисто-зеленого цвета свечение периферийных участков микробной клетки, тогда как центральная часть выглядела более темной. Такое свечение микробов считали специфичным и оценивали на три или четыре креста. За счет образования вокруг клеток светящегося комплекса ободка микробы выглядят несколько длиннее и толще, чем при обычной световой микроскопии. Иногда указанные антибактериальные сыворотки, особенно типа А и С, вызывали слабо заметное межтиповое свечение микробов Кл. перфрингенс, оцениваемое на один и, очень редко, на два креста.

При использовании непрямого варианта препараты обрабатывали первоначально немечеными антибактериальными сыворотками (А, В, С и Д), затем — во второй стадии — антивидовой флуоресцирующей сывороткой.

В этих случаях микробы Кл. перфрингенс светились так же, как и в прямом методе.

При отрицательном результате бактерии просматривались в поле зрения микроскопа в виде слабо заметных серых палочек.

Следует отметить, что специфическое окрашивание микробов во многом зависит от правильной техники приготовления препаратов. Для этого мы предварительно готовили взвесь микробов, содержащую 0,5—1 млрд. клеток в 1 мл, из которой затем изготавливали тонкие мазки площадью примерно 0,5 $см^2$.

В мазке, приготовленном из неразведенной культуры клеток, микробы располагались очень густо и слабо окрашивались, что не давало возможности судить о специфичности свечения.

Мы испытывали различные способы фиксации мазков перед окрашиванием: ацетоном, этиловым и метиловым спиртами, над пламенем спиртовки, а так же соляной кислотой при температуре 4^0, 18—20^0 продолжительностью от 2 до 40 минут.

Установлены хорошие результаты при фиксации этиловым или метиловым спиртами при комнатной температуре в течение 7—10 минут. Оптимальное время окрашивания мазков в термостате при 37^0 составляло 20 минут, а при комнатной температуре — 40 минут.

При микроскопировании мазков рекомендуется на покровное стекло наносить нефлуоресцирующее иммерсионное масло или же его заменитель — диметилфталат. Исследованиями установлено, что эти дефицитные препараты с успехом можно заменить чистым глицерином или вазелиновым маслом. Положительно окрашенные с использованием глицерина препараты при хранении в холодильнике не теряли специфического свечения в течение восьми месяцев (срок наблюдения). При исследовании таких мазков под микроскопом еще можно увидеть красивую панораму, представляющую собой равномерно расположенные микробы с ярко светящимся золотистого цвета ободком вокруг темного тела клетки.

При постановке люминесцентно-серологической реакции определенное значение имеет и возраст изучаемых культур. Наибольшая интенсивность свечения у Кл. перфрингенс начиналась с 6—7-часового роста и удерживалась на этом уровне в ечение суток, а в последующие сутки снижалась с 4-х крестов до 3-х. Наряду с этим уменьшалось количество специфически окрашенных клеток.

Помимо идентификации музейных штаммов этот метод, параллельно с бактериологическими исследованиями, испытывали в Республиканской и Кочубейской ветлабораториях при установлении диагноза на вышеуказанные анаэробные болезни.

В процессе типизации 67 выделенных токсигенных культур Кл. перфрингенс антибактериальными флуоресцирующими сыворотками в реакции иммунофлуоресценции в 46 случаях установлен тип Д, в четырнадцати — С, в трех — В, в двух — А. В то же время микроорганизмы двух культур не реагировали ни с одним

из меченых глобулинов.

Ценным диагностическим тестом является люминесцентно-микроскопическое исследование мазков-отпечатков из пораженных участков кишечника, брыжеечных лимфоузлов и паренхиматозных органов.

В положительных случаях на препаратах, приготовленных из различных участков кишечника и мезентериальных лимфоузлов, наблюдали большое количество микробов Кл. перфрингенс, ярко окрашенных мечеными глобулинами.

При энтеротоксемии, вызванной типом С, аналогичных микробов обнаруживали также в мазках-отпечатках из печени, селезенки, почек, сердца и надпочечников

В результате исследования препаратов, изготовленных из кишечника и мезентериальных лимфатических узлов овец, павших от других причин, очень редко обнаруживались специфически светящиеся микробы Кл. перфрингенс при просмотре даже в 20—30 и более полях зрения.

Этот тест позволяет не только обнаружить в течение одного-двух часов обсемененность органов микроорганизмами Кл. перфрингенс, но и одновременно установить типы возбудителя энтеротоксемии.

Наряду с испытанием изготовленных в нашей лаборатории антибактериальных и антитоксических сывороток Кл. перфрингенс мы проводили исследования, направленные на выяснение возможности использования фабричных типоспецифических антитоксических сывороток для люминесцентно-серологической диагностики инфекционной энтеротоксемии овец и анаэробной дизентерии ягнят.

Результаты этих исследований показали, что антитоксические сыворотки типа А, В, С, Д также окрашивали гомологичные музейные штаммы и выделенные культуры Кл. перфрингенс на три и четыре креста. Однако при их использовании нередко отмечалось межтиповое свечение микробных тел, оцениваемое на один или два креста. Это затрудняло точную типизацию культур Кл. перфрингенс. В то же время этот метод позволяет дифференцировать микробы группы Кл. перфрингенс от других видов клостридий.

Таким образом, исследованиями установлено, что предлагаемый метод иммунофлуоресцентной дифференциации микроорганизмов группы Кл. перфрингенс с использованием антибактериальных меченых глобулинов очень удобен прост и весьма эффективен, а главное — требует минимального времени для постановки диагноза на инфекционную энтеротоксемию овец и анаэробную дизентерию ягнят.

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ ОВЕЦ И АНАЭРОБНОЙ ДИЗЕНТЕРИИ ЯГНЯТ

Рекомендуется ветеринарным лабораториям Дагестанской АССР.

Метод основан на выявлении различных типов Кл. перфрингенс в мазках из кишечника и других паренхиматозных органов, а также из культур, выделенных из патматериала, путем использования реакции иммунофлуоресценции.

Для проведения исследования необходимо следующее:

1. Люминесцентный микроскоп любой марки (МЛ-2, МЛ-4, МЛД, ЛЮМАМ или обычный биологический микроскоп МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4) в сочетании с люминесцентным осветителем ОИ-17.

2 Меченная люминесцирующая энтеротоксемийная сыворотка (для прямого метода) или антитоксические типоспецифические сыворотки, флуоресцирующий антибараний глобулин (для непрямого метода) Набор люминесцирующих антибактериальных сывороток готовится в Дагестанском НИВИ по заказу лаборатории

3. Этиловый или метиловый спирт.

4. Предметные и покровные стекла.

5. Смесь глицерина с физиологическим раствором в соотношении 9:1 или нефлуоресцирующее иммерсионное масло.

6. 0,15 или 0,88 %-ный раствор хлористого натрия.

7. Кюветы или чашки Петри.

Обнаружение возбудителей инфекционной энтеротоксемии овец и анаэробной дизентерии ягнят в патологическом материале

Препараты готовят из исследуемых органов (кишечник, мезентериальный лимфатический узел, печень, селезенка, сердце, почки и надпочечники) в виде отпечатков или мазков. В последнем случае органы разрезают на мелке кусочки, которые тщательно растирают в ступке с физиологическим раствором в соотношении 1 : 5.

После осаждения крупных частиц из разных участков поверхности суспензии готовят по 3—4 мазка на тщательно обезвреженных предметных стеклах. Для изготовления отпечатков из органов вырезают кусочки размером 1 Х 1 см и слегка

фламбируют их над пламенем. Затем стерильными ножницами отсекают часть кусочка и срезом делают на предметных стеклах отпечатки.

Часть мазков и отпечатков окрашивают по Граму и микроскопируют для определения микробов Кл. перфрингенс.

Вторую часть отпечатков после высушивания в течение 7—10 минут фиксируют метиловым или этиловым спиртом.

Определение возбудителей инфекционной энтеротоксемии и анаэробной дизентерии в культуре

Для выделения культур возбудителя, не дожидаясь результатов первичной световой и люминесцентной микроскопии, из патматериала делают посевы на общепринятые для этих возбудителей среды.

Исследуют только чистые или смешанные культуры сразу же после появления макроскопически видимого роста. Обычно такой рост у Кл. перфрингенс типа В наблюдается через 3 часа, у типа С и Д — через 6 часов. Мазки готовят очень тонкими, чтобы в поле зрения микроскопа было несколько десятков микробных клеток. Густые мазки для исследований непригодны. На одном предметном стекле готовят 3—4 мазка площадью не более 1 $см^2$. Место нанесения микробов очерчивают восковым карандашом, подсушивают, маркируют и фиксируют спиртами. После фиксации и испарения спирта мазки ополаскивают физраствором. На слегка подсушенный мазок наносят соответствующую сыворотку, предварительно разведенную физраствором (pH 7,4), как указано на этикетке ампулы.

Окрашивание мазков производят прямым или непрямым методами.

Непрямой метод

При непрямом методе на мазок наносят по 1—2 капли фабричной типоспецифической сыворотки Кл. перфрингенс типа А, В, С и Д (каждой в отдельности). Предварительно устанавливают их красящий титр и рабочее разведение. Красящий титр этих сывороток определяют путем их титрования в разведениях 1 : 1 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 и т. д. с люминесцирующей сывороткой. Затем микроскопией устанавливают максимальное разведение, которое дает характерное свечение гомологичных микробов Кл. перфрингенс, оцениваемое в три и четыре креста. Это раз-

ведение является титром сыворотки. Концентрация рабочего разведения сыворотки должна быть в два раза больше концентрации красящего титра. В дальнейших исследованиях их используют без предварительной проверки.

Препараты с антигеном и немеченой иммунной сывороткой в рабочем разведении помещают во влажную камеру (чашки Петри или кюветы, содержащие увлажненную фильтровальную бумагу или кусочки смоченной водой ваты) и выдерживают в термостате при 37°С в течение 20 мин. или же при комнатной температуре — в течение 40 минут. Предметные стекла в течение 10 мин. промывают 3 раза физраствором, ополаскивают в дистиллированной воде, промокают фильтровальной бумагой и наносят на них по 1—2 капли люминесцирующей сыворотки кролика против глобулинов барана, изготовляемой Всесоюзным институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея, в рабочем разведении, указанном на этикетке ампулы. Затем препараты, помещенные во влажную камеру, выдерживают в термостате в течение 20 мин. при 37°С. Далее их промывают и высушивают, как описано выше.

Окрашивание мазков прямым методом

На мазки наносят 1—2 капли флуоресцирующей антибактериальной сыворотки типа В, С и Д каждую в отдельности в рабочем титре, указанном на ампуле, помещают во влажную камеру (закрытые чашки Петри или кюветы) и 20 мин. выдерживают в термостате при температуре 37°, а в условиях комнаты —40 мин. Затем предметные стекла в течение 10 мин. тщательно промывают в физиологическом растворе или дистиллированной воде, препараты подсушивают на воздухе и просматривают под люминесцентным микроскопом.

Микроскопия мазков

На поверхность препаратов, окрашенных прямым или непрямым методом, наносят буферную смесь из 9 частей глицерина и 1 части физраствора, накрывают покровным стеклом. На покровное стекло наносят ту же буферную смесь или нефлуоресцирующее иммерсионное масло и исследуют под люминесцентным микроскопом с использованием светофильтров СЗС-14-4, БС-8-2, ФС-1-2 при силе тока 4А, объективе 90, апертуре 1,25, окуляре 5. Люминесцентный микроскоп устанавливают в затемненной части комнаты.

Оценка результатов

Результаты люминесцентной микроскопии оценивают по четырехкрестовой системе:

++++—очень яркая золотисто-зеленого цвета люминесценция по периферии морфологически типичных микробов, четко контрастируемая с телом клетки;

+++ — яркая люминесценция периферии микробной клетки;

++ — недостаточно яркое, зеленовато-желтое свечение микробов;

\+ — еле заметный светящийся ободок вокруг микробной клетки;

— — отсутствие свечения микробных клеток.

При положительных случаях в мазках-отпечатках из кишечника, мезентериальных лимфоузлов, а также в мазках из выделенных культур обнаруживается огромное количество Кл. перфрингенс, светящихся на +++ и ++++ при окрашивании типоспецифическими сыворотками В, С и Д. При свечении микробных тел на ++ и + результат следует считать сомнительным.

Реакцию иммунофлуоресценции необходимо ставить со следующим контролем:

1. Окрашивание мазков одной антибараньей меченой сывороткой (отрицательная реакция).

2. Окрашивание мазков после присоединения типоспецифической сыворотки гетерологичной меченой сывороткой (отсутствие свечения).

3. Окрашивание известных микробов Кл. перфрингенс непрямым методом (положительный контроль).

Таким образом, диагноз на инфекционную энтеротоксемию ец и анаэробную дизентерию ягнят следует считать установленным при наличии клинико-эпизоотологических и патологоанатомических данных и обнаружении специфически светящихся микробов Кл. перфрингенс в мазках-отпечатках из пораженных органов и свежевыделенных культур, окрашенных сыворотками типа В, С и Д. При сомнительном или отрицательном результате реакции иммунофлуоресценции проводят полное бактериологическое исследование.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Иммунофлуоресцентный метод диагностики . . . 3

Методика постановки реакции иммунофлуоресценции при диагностике инфекционной энтеротоксемии овец и анаэробной дизентерии ягнят 7

Обнаружение возбудителей инфекционной энтеротоксемии овец и анаэробной дизентерии ягнят в патологическом материале 7

Определение возбудителей инфекционной энтеротоксемии и анаэробной дизентерии в культуре 8

Непрямой метод 8

Окрашивание мазков прямым методом 9

Микроскопия мазков 9

Оценка результатов 10

gost.e-ecolog.ru