МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

ВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОБНАРУЖЕНИЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В ПОЧВЕ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «КОЛОС»
Москва — 1970

gost.e-ecolog.ru

Утверждены Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 7 августа 1969 г.

Отбор проб почвы

1. Исследованию подлежат участки почвы, подозреваемые в обсеменении возбудителем сибирской язвы. Исследуемую площадь разбивают на участки размером не более 16 кв. м. Почвенным буром по углам и в центре участка отбирают пробы весом по 20—30 г.

Пробы с территории, подозреваемой в поверхностном обсеменении сибиреязвенным возбудителем, берут на глубину до 10—15 см *. Перед взятием проб на территории скотомогильников верхний слой почвы на месте взятия пробы снимают на 2—3 см и пробу берут в глубину до 2 м через каждые 20 см.

2. Отобранные пробы нумеруют, упаковывают в непроницаемую тару и нарочным с сопроводительной направляют в ветеринарную лабораторию.

3. Вынутую с глубины и неиспользованную для проб почву с целью обеззараживания смешивают (в соотношении 1 : 3) с сухой хлорной известью, содержащей 25% активного хлора; при этом, если почва сухая, ее слегка увлажняют. Место отбора проб дезинфицируют раствором хлорной извести, содержащей 5% активного хлора. Инструменты дезинфицируют огнем паяльной лампы.

Подготовка и исследование проб почвы

4. Пробы почвы в лаборатории освобождают от корней, камешков и тщательно перемешивают. Навеску каждой пробы в 10 г помещают в колбу, заливают 50 мл дистиллированной воды, плотно закрывают резиновой пробкой и шуттелируют 25 мин., затем оставляют на 5—8 мин. для осаждения грубых частиц.

5. Надосадочную жидкость по 0,2 мл высевают на 2%-ный МПА в 3—4 бактериологические чашки и оставляют их закрытыми на 10—15 мин. для подсушивания, затем из каждой чашки исследуемый материал дробно засевают в новые две-три чашки с

* Также отбирают пробы и при проверке качества обеззараживания почвы.

МПА. Засеянные чашки помещают в термостат на 24 часа при температуре 37°. После этого характерные и подозреваемые колонии отсевают на дифференциально-диагностические среды.

6. Исследуемой надосадочной жидкостью заражают двух белых мышей (доза для каждой 0,5 мл) подкожно в область паха и наблюдают за ними 10 суток. Павших мышей вскрывают, из органов делают посевы на питательные среды.

7. В качестве сигнального метода индикации сибиреязвенного возбудителя используют метод люминесцентной микроскопии. Для этого надосадочную взвесь фильтруют через два мембранных фильтра № 3, затем фильтры накладывают на 0,7%-ный МПА в чашках вверх поверхностью, через которую фильтровался исследуемый материал, и помещают в термостат с температурой 37° на 3 часа. Выросшие на фильтрах микробы смывают физраствором. Из смыва готовят мазки, окрашивают их люминесцирующей сибиреязвенной сывороткой и просматривают в люминесцентный микроскоп.

Результаты всех исследований заносят в лабораторный журнал.

Идентификация возбудителя сибирской язвы

8. На МПА возбудитель сибирской язвы образует плоские шероховатые, неправильной формы колонии с кнутообразными отростками, закручивающимися в одну сторону и напоминающие голову медузы. Встречаются и измененные варианты с менее выраженной шероховатостью и без отростков. Колонии суточной культуры имеют величину от 3 до 5 мм с характерной тускло-серой, как бы покрытой инеем (матовой), поверхностью. При просмотре в лупу с 8-кратным увеличением колонии сибиреязвенных бацилл напоминают по виду граненое стекло. Молодые колонии микробов имеют вязкую консистенцию, тянутся за петлей, хорошо суспензируются в физиологическом растворе. После 24-часового роста морфология колоний становится менее характерной, поверхность их приобретает беловатый оттенок.

9. Для выращивания возбудителя сибирской язвы в жидкой среде применяют мясопептонный бульон или бульон на перевare Хоттингера с pH=7,2—7,4. После суточного роста бульон остается прозрачным, а на дне его образуется обильный рыхлый осадок в виде комочка ваты; иногда может быть нежное пристеночное кольцо, легко опускающееся вниз. Опускание «сталактитов» (нитей, состоящих из микробов) на всю высоту прозрачного бульона является наиболее характерным признаком роста типичных сибиреязвенных бацилл. При легком встряхивании пробирки бульон не мутнеет, осадок разбивается на

мелкие хлопья, которые поднимаются в виде снежинок на прозрачном фоне бульона.

10. В приготовленных из суточной культуры мазках, окрашенных по Граму, сибиреязвенные микробы представляют грамположительные палочки с прямыми обрубленными концами, образующие более или менее длинные нити, разделенные светлыми промежутками. Вегетативная форма клеток хорошо воспринимает все анилиновые краски и может быть окрашена любым из установленных способов.

11. Спорообразование у типичных штаммов возбудителя сибирской язвы на питательных средах хорошо выражено. Полное спорообразование наблюдают при культивировании на пшеничном, казеиновом или гороховом агаре в течение 2—4 суток. Споры занимают в клетке центральное положение и никогда не превышают диаметра клетки. Прорастание спор полярное.

12. Возбудитель сибирской язвы неподвижен. Наличие или отсутствие подвижности микроба определяют в висячей капле, для чего используют 18-часовую бульонную культуру или при помощи посева культуры уколом в пробирки с 0,3%-ным полужидким агаром. Засеянные пробирки выдерживают в течение 18—24 часов при 37°. Подвижность микроба определяется распространением роста за линию укола.

13. Гемолитическую активность микроорганизмов определяют путем посева изучаемых штаммов на кровяной питательный агар, содержащий 5% свежей крови. После суточного роста в термостате с температурой 37° сибиреязвенные штаммы не образуют зон гемолиза.

14. После посева Bac. anthracis в столбик 12%-ной желатины через 2—5 суток (при температуре 18°) по уколу наблюдается характерный для сибиреязвенного микроба рост в виде белого стержня, от которого радиально под прямым углом в желатину могут отходить нежные тонкие боковые отростки, более длинные к поверхности среды и постепенно укорачивающиеся книзу. Создается впечатление роста в виде «елочки», перевернутой верхушкой вниз. Желатина разжижается только по ходу роста.

15. После посева Bac. anthracis в жидкую желточную среду (готовится из желтка и физиологического раствора в соотношении 1 : 9; разливается по пробиркам) через 2—3 суток роста при 37° засеянная среда не изменяется, пептонизация белка не происходит.

16. Реакцию «жемчужного ожерелья» наблюдают у молодых сибиреязвенных культур, засеваемых на чашки с мясопептонным агаром, содержащим 0,5 и 0,05 ед. пенициллина в 1 мл среды. На поверхности застывшего агара делают насечки, на которые наносят каплю 3-часовой бульонной культуры. Засеянную среду ставят в термостат при 37° на 3 часа. Перед просмотром зону роста накрывают покровным стеклом, а затем исследуют при

помощи иммерсионной системы микроскопа. На среде, содержащей пенициллин, наблюдается превращение сибиреязвенных клеток в отдельные шары, расположенные в виде цепочек, напоминающих «жемчужное ожерелье».

Другие спорообразующие аэробы активно размножаются на этой среде и имеют обычную форму клеток.

17. Чувствительность культур Bac. anthracis к сибиреязвенному бактериофагу исследуют на пластинках мясопептонного агара. Для этого 3—6-часовые бульонные культуры штаммов наносят на пластинки агара в заранее отмеченные зоны. После 30-минутного подсыхания на засеянные зоны опытной чашки наносят по капле сибиреязвенного бактериофага без разведения. Затем чашки помещают в термостат при температуре 37°. Учет действия фага начинают проводить через 6 и 18 часов по характеру лизиса колоний. Контролем служат посевы без нанесения фага.

18. Для исследования на капсулообразование in vivo бульонную культуру в объеме 0,1—0,2 мл вводят внутрибрюшинно четырем белым мышам. Через 30, 60 и 120 мин. после введения материала убивают по одной мыши и вскрывают. Из перитонеального экссудата и из органов делают мазки-отпечатки для исследования на наличие капсульных бацилл. Одна мышь остается как контроль, за которой наблюдают 10 дней, и в случае ее гибели из органов готовят мазки.

Для исследования на капсулообразование in vitro делают посев полученной культуры в среду ГКИ (60 мл раствора Хенкса и 40 мл бычьей инактивированной сыворотки) и ставят в термостат с температурой 37°. Через 30—120 мин. у отдельных сибиреязвенных клеток начинается капсулообразование, а через 16—18 часов все или большинство сибиреязвенных клеток образуют капсулу. Для наблюдения образования капсульных клеток готовят мазки со среды.

Мазки из органов и со среды фиксируют 15 мин. в метаноле и окрашивают синькой Леффлера 5—10 мин. При микроскопии видны синие палочки и нити, окруженные розовой капсулой.

19. Люминесцентная микроскопия. При просмотре в люминесцентный микроскоп мазка, обработанного люминесцирующей сибиреязвенной сывороткой, наблюдается яркое свечение клеток возбудителя сибирской язвы. Для приготовления мазков используют 5—6-часовую бульонную или агаровую культуру микробов. Мазки подсушивают и фиксируют путем погружения их в 96° метанол на 15—20 мин. На фиксированные мазки наносят каплю люминесцирующей сибиреязвенной сыворотки в рабочем разведении и оставляют на 10—15 минут во влажной камере. Затем мазки тщательно промывают дважды по 10 минут в физрастворе или проточной воде. Перед просмотром на препарат

под покровное стекло наносят каплю глицерина (1 часть физраствора и 9 частей глицерина). Мазки просматривают в любой из люминесцентных микроскопов. Наблюдение ведут при увеличении микроскопа 5×90. Оценка степени свечения микробных клеток субъективная.

Для возбудителя сибирской язвы характерно свечение периферии клетки, четко контрастируемое с темным телом клетки.

20. Вирулентные свойства сибиреязвенных культур определяют путем заражения белых мышей. Для заражения мышей готовят споровую культуру штамма. Для этого засевают бульонную суточную культуру на какую-либо из питательных сред, указанных в пункте 4. Посевы выдерживают 3—4 дня при 37°. Процесс спорообразования контролируют путем подсчета спор при микроскопии раздавленной капли или окрашенных мазков. После полного спорообразования культуру смывают физиологическим раствором и определяют концентрацию спор по стандарту мутности или путем посева серийных разведений на МПА. Из суспензии спор с известной концентрацией готовят 3 рабочих разведения с содержанием 100, 1 млн. и 10—100 млн. спор в 0,5 мл физраствора. Каждым разведением в дозе 0,5 мл заражают по 3 белых мыши подкожно в области паха и наблюдают за ними 10 дней.

Определение вирулентности

21. Степень вирулентности Bac. anthracis определяют дозой возбудителя:

вирулентные штаммы вызывают гибель всех зараженных белых мышей ($ЛД_{100}$) при введении им 100 спор;

слабовирулентные — вызывают гибель всех зараженных белых мышей ($ЛД_{100}$) при введении им 1 млн. спор;

штаммы с остаточной вирулентностью — при введении более 10 млн. спор вызывают гибель не всех зараженных белых мышей;

авирулентные штаммы не вызывают заболевания и гибели мышей.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «КОЛОС»

Редактор Г. А. Коносов. Технический редактор А. А. Алферьева.

Подписано к печати 23/II 1970 г. Т-04906. Формат 60×90¹/₁₆.
Уч.-изд. л. 0,31. Тираж 10 000 экз. Заказ № 2522.

gost.e-ecolog.ru

Типография № 32 Главполиграфпрома. Москва, Цветной бульвар, 26.