МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

НАСТАВЛЕНИЕ

ПО ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

Москва 2002

gost.e-ecolog.ru

ПРЕДИСЛОВИЕ

Разработаны:

Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации

Всероссийским НИИ экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ)

Всероссийским государственным НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (ВГНКИ)

Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией (ЦНМВЛ)

Институтом экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ИЭВС и ДВ)

Всероссийским НИИ бруцеллеза и туберкулеза животных (ВНИИБТЖ)

Прикаспийским зональным научно-исследовательским ветеринарным институтом

Дальневосточным зональным научно-исследовательским ветеринарным институтом

ФГУП «Курская биофабрика фирма «БИОК»
НПО «Нарвак»

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Департамента
ветеринарии
М.В. Кравчук
«06» февраля 2002 г.

НАСТАВЛЕНИЕ
по диагностике туберкулеза
животных

1. Общие положения

1.1. Туберкулез - инфекционная, хронически протекающая болезнь животных всех видов и человека, характеризующаяся поражением органов и тканей с образованием в них туберкулов.

Возбудитель - бактерии из рода Mycobacterium, в который входят более 38 самостоятельных видов. Болезнь у животных вызывают микобактерии туберкулеза бычьего (M. bovis), человеческого (M. tuberculosis) и птичьего (M. avium) видов. Каждый из них является патогенным для животных соответствующего вида или человека, возможно и перекрестное заражение.

Микобактерии туберкулеза бычьего вида патогенны для крупного рогатого скота. К ним также восприимчивы все млекопитающие животные и человек. К возбудителю туберкулеза человеческого вида восприимчивы, кроме человека, свиньи, козы, кошки, собаки. Этот вид, в основном, сенсибилизирует крупный рогатый скот к туберкулину и лишь иногда вызывает незначительные очаги в отдельных лимфатических узлах.

M. avium - возбудитель туберкулеза домашних и диких птиц. Он может вызывать патологические изменения у свиней. У крупного рогатого скота возбудитель туберкулеза птичьего вида вызывает кратковременную сенсибилизацию организма к туберкулину.

Отдельные виды атипичных микобактерий или их ассоциации могут вызывать сенсибилизацию крупного рогатого скота, свиней и птиц к туберкулинам, и в отдельных случаях патоморфологические изменения в лимфатических узлах у свиней, неотличимые от туберкулезных изменений.

1.2. При диагностике туберкулеза у животных используют эпизоотологический, клинический, патологоанатомический, гистологический, бактериологический, аллергический и молекулярно-генетический (полимеразная цепная реакция - ПЦР) методы исследования.

Основными, обязательными методами исследования на туберкулез являются внутрикожная (у овец, коз и пушных зверей: норок, песцов, лисиц - пальпебральная, у лошадей - глазная) туберкулиновая проба, патологоанатомическое и бактериологическое исследование.

В благополучных по туберкулезу хозяйствах с целью отбора животных для диагностического убоя из числа реагирующих на туберкулин применяют одну из следующих проб: симультанную аллергическую пробу, офтальмопробу, пальпебральную и внутривенную туберкулиновую пробу.

1.3. Диагноз на туберкулез считается установленным в следующих случаях.

1.3.1. У млекопитающих животных (за исключением свиней):

- при обнаружении на вскрытии изменений, характерных для туберкулеза;

- при отсутствии видимых изменений или возникших затруднениях в определении характера изменений - при положительных результатах ПЦР и положительных результатах биологического исследования,

- при выявлении бактериологическим исследованием возбудителя бычьего или человеческого вида;

- при положительных результатах биологического исследования,

1.3.2. У свиней:

- при положительных результатах ПЦР и выявлении бактериологиче-

ским исследованием возбудителя туберкулеза бычьего или человеческого вида.

1.3.3. У птиц:

- при обнаружении на вскрытии характерных изменений, с подтверждением диагноза бактериоскопическим методом исследования;

- при отсутствии видимых изменений или возникших затруднениях в определении характера изменений - при положительных результатах ПЦР;

- при выделении культуры микобактерий птичьего вида (от попугаев - птичьего или человеческого видов).

1.4. Исследование животных на туберкулез проводят в порядке и сроки, предусмотренные Санитарными правилами СП 3.1.093-96 и Ветеринарными правилами ВП 13.3.1325-96, п.10 «Туберкулез», утвержденными Госкомсанэпиднадзором и Минсельхозпродом России в 1996 г.

2. Эпизоотологические данные

2.1. Контроль за эпизоотическим состоянием хозяйств по туберкулезу животных осуществляют по результатам ветеринарно-санитарной экспертизы убойного скота на мясокомбинатах и в хозяйствах, патологоанатомического вскрытия трупов павших животных, регулярного клинического обследования поголовья и аллергических исследований, проводимых по эпизоотологическим и эпидемиологическим показаниям.

2.2. К туберкулезу восприимчивы животные всех видов и возрастов. Основным источником возбудителя туберкулеза являются больные животные, выделениями которых контаминируется среда обитания, являющаяся длительное время резервуаром инфекции.

2.3. Заражение туберкулезом животных происходит, в основном, через дыхательные пути или желудочно-кишечный тракт. Аэрогенное заражение чаще отмечают у взрослого скота в стойловый период. Телята, свиньи и птица заражаются чаще алиментарно при скармливании им необеззараженного мо-

лока, обрата и других кормов, контаминированных возбудителем туберкулеза.

2.4. Возникновению и распространению болезни способствуют высокая концентрация поголовья, неполноценное кормление, сырые, темные, плохо вентилируемые помещения, стойловое безвыгульное содержание, контаминированные микобактериями туберкулеза объекты внешней среды, нарушение правил карантинирования вновь поступивших животных, перегруппировка поголовья без учета эпизоотического состояния, отсутствие ветеринарно-санитарных пунктов на фермах и при летне-лагерном содержании животных.

2.5. При диагностике болезни в первую очередь учитывают эпизоотическое состояние и степень распространения туберкулеза в районе, области (крае), эпизоотическое состояние хозяйства в прошлые годы, метод оздоровления, ввод нового поголовья, контакты благополучных стад с неблагополучными, завоз кормов и другие связи с неблагополучными хозяйствами, использование для выпойки необеззараженного молока и обрата, обнаружение патологоанатомических изменений, характерных для туберкулеза, у убитых или павших животных, выявление больных туберкулезом людей среди животноводов, наличие туберкулезных лечебно-профилактических учреждений на прилегающих территориях.

2.6. При появлении эпизоотологических или эпидемиологических показаний, дающих основание подозревать заражение животных туберкулезом, проводят комплекс исследований в соответствии с разделами настоящего Наставления.

3. Клинический осмотр

При клиническом осмотре у крупного рогатого скота определяют внешний вид и упитанность животного, прощупывают поверхностные лимфатические узлы - подчелюстные, предлопаточные, паховые, у коров - вымя и надвыменные лимфатические узлы. Типичные признаки болезни

проявляются только при длительном течении процесса.

При туберкулезном поражении лимфоузлов может наблюдаться их увеличение и болезненность. Туберкулез легких проявляется кашлем, особенно по утрам. Туберкулез вымени характеризуется образованием горячих болезненных припухлостей и поражением надвыменных лимфоузлов. При туберкулезе кишечника возможна диарея.

У телок, заразившихся в раннем возрасте, признаки болезни могут проявиться лишь после первого-второго отела.

У кошек туберкулез может проявляться в виде язв в области головы, у порок - в виде язвенных поражений кожи головы, шеи, грудной и брюшной области.

У больных туберкулезом животных периодически повышается температура тела, волосяной покров становится тусклым, взъерошенным. Снижается упитанность - до полного истощения, падает аппетит.

Довольно часто больные животные не имеют никаких внешних признаков заболевания.

Аллергическое исследование

4.1. Сущность метода заключается в выявлении животных, инфицированных возбудителем туберкулеза или другими микобактериями, в аллергической пробе с туберкулином.

Основным методом исследования млекопитающих животных (за исключением лошадей, овец, коз и пушных зверей) и птиц является внутрикожная туберкулиновая проба. В качестве дополнительных методов исследования у крупного рогатого скота применяют офтальмопробу, пальпебральное и внутривенное введение туберкулина, симультанную пробу с ППД-туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ) или ППД-туберкулином для птиц.

Применение симультанной пробы основано на видовой специфичности аллергии, проявляющейся более выраженными реакциями на аллерген, родственный по антигенному составу микобактериям, вызвавшим состояние сенсибилизации животных. При оценке реакций на туберкулин у животных необходимо учитывать, что проявление и характер внутрикожных реакций зависит от общего физиологического состояния организма, чувствительности животных к туберкулину и вида микобактерий, обусловившего сенсибилизацию организма.

Крупный рогатый скот, свиньи и другие животные, зараженные возбудителем туберкулеза бычьего вида, реагируют на ППД-туберкулин для млекопитающих. При этом у животных старых, а также с низкой упитанностью или при генерализованном туберкулезном процессе реакции на туберкулин могут быть слабо выражены или даже отсутствовать (анергия).

В благополучных по туберкулезу стадах крупного рогатого скота у животных может наблюдаться повышенная чувствительность к туберкулину для млекопитающих, обусловленная сенсибилизацией организма животных микобактериями туберкулеза птичьего вида, возбудителем паратуберкулеза или атипичными микобактериями (парааллергические реакции). По характеру проявления внутрикожные парааллергические реакции не отличаются от реакций на туберкулин у животных, зараженных возбудителями туберкулеза бычьего или человеческого видов, но более выражены на КАМ или туберкулин для птиц, что выявляется при проведении симультанной пробы. При повторных исследованиях парааллергические реакции часто выпадают.

4.2. Для аллергических исследований у млекопитающих применяют ППД-туберкулин для млекопитающих, у птиц - ППД-туберкулин для птиц .

Каждый флакон с туберкулином и растворителем перед применением просматривают. При обнаружении в них каких-либо примесей, нарушении целостности стекла или укупорки, отсутствии надписей их забраковывают. Препарат используют только в день вскрытия флаконов.

4.3. Для внутрикожного введения туберкулина используют безыгольные инъекторы или шприцы вместимостью 1-2 мл с бегунком и иглами для внутрикожных инъекций. Обезьянам, пушным зверям, кошкам и птицам туберкулин вводят только шприцем с иглой. Для нанесения туберкулина на конъюнктиву применяют глазные пипетки.

Шприцы, иглы и глазные пипетки стерилизуют кипячением без добавления дезинфицирующих веществ. Безыгольные инъекторы стерилизуют в соответствии с наставлением по их применению.

4.4. Туберкулинизации подвергают:

крупный рогатый скот, яков, лошадей и других представителей непарнокопытных, буйволов, свиней, овец, коз, собак, волков и других представителей хищных, кошек, обезьян, сумчатых - с двухмесячного возраста;

верблюдов, дельфинов, слонов, носорогов, бегемотов - с года;

маралов, оленей, антилоп, пушных зверей и птиц - с 6-месячного возраста.

Коров (нетелей), буйволиц, ячих, верблюдиц исследуют независимо от периода беременности; коз, овец, свиней, кобылиц, ослиц, сук, зебувидных и пушных зверей - не ранее 1-го месяца после родов.

Не разрешается исследовать туберкулинами животных в течение трех недель после вакцинации против инфекционных болезней и обработок против гельминтов.

4.5. Очищенный ППД - туберкулин для млекопитающих в стандартном растворе, приготовленном на биопредприятии, применяют для туберкулинизации млекопитающих животных.

Сухой очищенный ППД-туберкулин для птиц непосредственно перед применением растворяют в растворителе микобактериальных аллергенов, рассылаемом биопредприятием вместе с аллергеном.

4.6. Туберкулины применяют при исследовании на туберкулез млекопитающим (кроме обезьян, кошек и пушных зверей: норок, песцов, лисиц) в

объеме 0,2 мл, обезьянам, кошкам, пушным зверям и птицам - 0,1 мл.

4.6.1. Для исследования обезьян стандартный раствор ППД-туберкулина для млекопитающих разводят в 10 раз (1 объем туберкулина в 9 объемах растворителя) стерильным физиологическим раствором pH 7,0±0,5 или растворителем микобактериальных аллергенов.

4.6.2. При исследовании птиц содержимое одного флакона с ППД-туберкулином для птиц растворяют в одном флаконе растворителя объемом 20 мл.

4.7. Туберкулинизацию животных разрешается проводить ветеринарным врачам или ветеринарным фельдшерам под контролем ветврача. Исследование проводят под контролем специалистов государственной ветеринарной службы.

4.8. Внутрикожный метод туберкулинизации

4.8.1. Туберкулин вводят:

крупному рогатому скоту (кроме быков), буйволам, зебувидным, якам, оленям, маралам, антилопам - в середине шеи (в этой области не разрешается вводить другие биологические препараты и лекарственные вещества);

быкам, слонам, носорогам, бегемотам - в подхвостовую складку;

верблюдам - в кожу брюшной стенки или области паха на уровне горизонтальной линии седалищного бугра;

свиньям - с наружной поверхности уха в 2-3 см от его основания; поросятам в возрасте 2-3 месяцев туберкулин допускается вводить в кожу поясничной области, отступая от позвоночника на 5-8 см, используя для этого только безыгольный инъектор;

овцам и козам - в нижнее веко под кожу, отступив от его края на 1,5-2 см;

собакам, волкам и другим представителям хищных - в области внутренней поверхности бедра или локтевой складки;

обезьянам, сумчатым, пушным зверям (норкам, песцам, лисицам) -

интрадермонально в верхнее веко;

дельфинам - в кожу спины в области переднего ласта;

кошкам - в области внутренней поверхности уха;

курам - в кожу бородки;

индейкам - в подчелюстную сережку;

гусям, уткам - в межчелюстную складку или в складку кожи клоаки;

страусам, кузуарам - в складку кожи клоаки;

фазанам (самкам), павлинам, попугаям, голубям, журавлям, цаплям, аистам, фламинго - в области наружной стороны голени на 1-2 см выше голеностопного сустава;

фазанам-самцам - в пещеристое тело на голове птиц позади наружного угла глаза.

4.8.2. Перед введением туберкулина шерсть (волос) в месте инъекции выстригают, кожу обрабатывают 70%-ным этиловым спиртом. Вводить туберкулин в кожу, имеющую травматические повреждения, уплотнения и абсцессы, пораженную грибками, клещами или гельминтами, запрещается.

4.8.3. Учет и оценку реакции у крупного рогатого скота, буйволов, зебувидных, яков, верблюдов, слонов, носорогов, бегемотов, оленей, маралов, антилоп, обезьян, сумчатых, дельфинов проводят через 72 часа после введения препарата; у коз, овец, свиней, собак, волков и других представителей хищных, кошек, пушных зверей - через 48 часов; у птиц - через 30-36 часов.

В неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота пунктах допускается применение двойной туберкулиновой пробы. С этой целью животным, не реагировавшим на первое введение туберкулина, препарат вводят повторно в день учета реакции в той же дозе и в то же место. Учет реакции на второе введение туберкулина проводят через 24 часа.

4.8.4. При учете реакции у каждого исследуемого животного пальпируют место введения туберкулина, у коз, овец, обезьян, сумчатых и пушных зверей сравнивают веки правого и левого глаза, у быков, слонов, носорогов,

бегемотов - левую и правую подхвостовые складки.

При обнаружении изменений в месте введения туберкулина у крупного рогатого скота (кроме быков), буйволов, зебувидных, яков, верблюдов, оленей, маралов, антилоп измеряют кутиметром толщину складки в миллиметрах и определяют величину ее утолщения в сравнении с толщиной складки неизмененной кожи рядом с местом введения препарата.

4.8.5. Животных считают реагирующими на туберкулин:

крупный рогатый скот (кроме быков), буйволов, зебувидных, верблюдов, оленей, маралов, антилоп - при утолщении кожной складки - на 3 мм и более независимо от характера припухлости (отечности, болезненности, повышения местной температуры); быков, слонов, носорогов, бегемотов, свиней, собак, волков и других представителей хищных, дельфинов, кошек, и птиц - при образовании припухлости в месте введения туберкулина; обезьян, сумчатых, овец, коз и пушных зверей - при видимом различии правого и левого века.

4.9. Симультанная аллергическая проба с применением туберкулина и комплексного аллергена из атипичных микобактерий (КАМ).

4.9.1. Симультанную аллергическую пробу применяют для диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота при первичной постановке диагноза, а также для контроля за благополучием животных по туберкулезу в хозяйствах, где реакции на туберкулин обусловлены сенсибилизацией атипичными микобактериями.

Проба является групповой и дает возможность ориентироваться в ситуации по туберкулезу лишь в целом по стаду или группе (не менее 6 голов) исследуемых животных.

4.9.2. Симультанная проба заключается в одновременном (симультанном) введении животным двух аллергенов - ППД-туберкулина для млекопитающих в стандартном растворе и комплексного аллергена из атипичных микобактерий (КАМ) и определении достоверности различия в интенсивности

(степени проявления) реакций на эти аллергены.

4.9.3. Под достоверностью различия понимают такое различие в величине показателей интенсивности реакций на туберкулин и КАМ, которое дает возможность с уверенностью не менее чем на 95% сделать заключение о состоянии по туберкулезу исследуемой группы животных.

4.9.4. Проведение симультанной пробы допускается не ранее, чем через 30 дней после последней туберкулинизации животных.

4.9.5. Туберкулин и КАМ вводят, соответственно, с левой и правой стороны тела животных строго симметрично в дозе по 0,2 мл: крупному рогатому скоту (кроме быков) - внутрикожно в середине шеи, быкам - также внутрикожно в левую и правую подхвостовую складки.

4.9.6. Учет и оценку реакций на туберкулин и КАМ проводят у крупного рогатого скота через 72 часа после инъекции аллергенов.

Реакцией считают припухлость в месте введения препарата, ощутимую при пальпации, независимо от ее характера (консистенции, температуры, болезненности и т.п.). При учете реакции у каждого исследуемого животного пальпируют место введения туберкулина. В случае обнаружения припухлости в месте его инъекции, у этого животного прощупывают место введения КАМа и проводят измерение утолщения кожной складки.

Более выраженную реакцию на туберкулин при менее выраженной или отсутствующей на КАМ обозначают знаком «+» (плюс), менее выраженную реакцию на туберкулин - знаком «-» (минус), при одинаковых реакциях - знаком «=» (равенство).

Животных, не реагирующих на туберкулин, не учитывают независимо от наличия или отсутствия у них реакций на КАМ.

4.9.7. Результаты оценки реакции на туберкулин в сравнении с реакцией на КАМ в знаках («+», «-», «=») записывают в ведомость учета симультанной пробы (табл.1) и с помощью табл. 2 определяют достоверность различия в интенсивности реакций у животных на туберкулин и КАМ в целом по группе.

По ведомости подсчитывают общее количество животных, реагирующих на туберкулин с оценкой реакций «+» и «-» (животных, реагирующих на аллергены в равной степени, в расчет не берут), и таким образом определяют показатель А табл. 2 (например 14). Затем подсчитывают отдельно количество знаков «+» и знаков «-» и по табл. 2 сравнивают поочередно результаты с показателем Б, соответствующим установленному показателю А (в примере: соответствующий показатель Б равен 12).

4.9.8. Если количество знаков «+» равно или больше показателя Б, а также если при проведении пробы вообще не выявлено животных, реагирующих на КАМ, то это означает, что реакции на туберкулин выражены достоверно интенсивнее, чем на КАМ, и указывает на заражение животных возбудителем туберкулеза.

4.9.9. Если количество знаков «-» равно или больше показателя Б, значит у животных реакции достоверно более выражены на КАМ. Если при этом у всех реагирующих на туберкулин животных реакции интенсивнее выражены на КАМ и получены отрицательные результаты бактериологических исследований, группу скота считают благополучной по туберкулезу. Также благополучным по туберкулезу считают поголовье животных, среди которых при проведении симультанной пробы не выявлено реагирующих на туберкулин.

4.9.10. Могут быть случаи, когда при достоверно более интенсивной реакции на КАМ в целом по стаду (группе) у отдельных животных наблюдаются реакции на туберкулин при менее выраженной или совсем отсутствующей реакции на КАМ. Это может быть обусловлено парадоксальным проявлением реакций на аллергены или наличием туберкулезной инфекции на фоне сенсибилизации животных к туберкулину атипичными микобактериями. Для уточнения диагноза всех таких животных, а также реагирующих в равной степени на туберкулин и КАМ (при утолщении кожной складки на 3 мм и более), обязательно подвергают убою с патологоанатомическим исследованием на туберкулез. При отсутствии характерных изменений проводят бактериологическое исследование и в случае получения отрицательного результата стадо (группу) животных считают благополучным по туберкулезу.

Таблица 1

Ведомость учета симультанной пробы (пример)

Номер (кличка) животных, реагировавших на туберкулин	Оценка реакции на туберкулин в сравнении с реакцией на КАМ: большая (+), меньшая (-), равная (=).
1	2
17	+
114	
316	-
289	+
32	-
174	+
285	+
232	+
484	-
179	-
201	+
343	-
211	-
178	+
6	+
18	-
131	+
14	+
104	+
86	-
903	-
40	-
139	+
28	-
77	+
Всего животных 25	Всего знаков «+» и «-» - 23 (показатель А табл. 2), в т.ч.: знаков «+» - 13 «- » - 10

В данном примере различие в интенсивности реакций на туберкулин и КАМ недостоверно, поэтому результаты симультанной пробы считают неопределенными.

Таблица 2

Определение достоверности различия реакций на туберкулин и КАМ

Показатель А	Показатель Б	Показатель А	Показатель Б
Общее количество животных, реагирующих на туберкулин с оценкой реакции «+» и «-»	Минимум животных с большей «+» или меньшей «-» интенсивностью реакции на туберкулин, при котором различие в реакциях достоверно	Общее количество животных, реагирующих на туберкулин с оценкой реакции «+» и «-»	Минимум животных с большей «+» или меньшей «-» интенсивностью реакции на туберкулин, при котором различие в реакциях достоверно
1	2	3	4
6	6	31	22
7	7	32	23
8	8	33	23
9	9	34	24
10	9	35	24
11	10	36	25
12	10	37	25
13	11	38	26
14	12	39	27
15	12	40	27
16	13	41	28
17	13	42	28
18	14	43	29
19	15	44	29
20	15	45	30
21	16	46	31
22	17	47	31
23	17	48	32
24	18	49	32
25	18	50	33
26	19	51	33
27	20	52	34
28	20	53	35
29	21	54	35
30	21	55	36
56	36	78	49
57	37	79	49
58	37	80	50
59	38	81	50

Продолжение табл.2

1	2	3	4
60	39	82	51
61	39	83	51
62	40	84	52
63	40	85	53
64	41	86	53
65	41	87	54
66	42	88	54
67	42	89	55
68	43	90	55
69	44	91	56
70	44	92	56
71	45	93	57
72	45	94	57
73	46	95	58
74	46	96	59
75	47	97	59
76	48	98	59
77	48	99	60
		100	61

4.9.11. Если количество «плюсов» и «минусов», взятых в отдельности, меньше показателя Б, то различие в интенсивности реакций на туберкулин и КАМ считают статистически недостоверным и результаты симультанной пробы неопределенными. В этом случае для установления диагноза животных, реагирующих в большей степени на туберкулин (с оценкой реакции «+») и в равной степени на туберкулин и КАМ (с оценкой реакции «=»), подвергают убою с осмотром внутренних органов и тканей и направляют материал для бактериологического исследования на туберкулез. Заключение о состоянии стада или группы животных по туберкулезу делают по результатам всех проведенных исследований.

Так же поступают, когда на туберкулин реагируют менее 6 животных или у всех реагирующих на туберкулин реакции в равной степени выражены

и на КАМ (отбирают для убоя животных с утолщением кожной складки на 3 мм и более). В этих случаях отбирают животных, реагировавших на туберкулин с оценкой «+» и «=» проводят их убой с последующим патологоанатомическим исследованием (лабораторные исследования не проводят).

4.10. Симультанная аллергическая проба с применением туберкулинов для млекопитающих и для птиц.

4.10.1 Симультанную пробу с применением туберкулинов для млекопитающих и для птиц применяют у крупного рогатого скота и свиней для дифференциации специфических и параспецифических реакций при первичной постановке диагноза и для контроля за благополучием животных по туберкулезу в стадах, где реакции на туберкулин обусловлены сенсибилизацией микобактериями комплекса авиум-интрацеллюляре или атипичными микобактериями.

4.10.2. Туберкулины вводят в дозе 0,2 мл внутрикожно:

крупному рогатому скоту (кроме быков) в симметричные участки с правой и левой стороны шеи;

быкам - в правую и левую подхвостовые складки;

свиньям - с наружной поверхности уха - в 2-3 см от его основания, поросятам в возрасте 2-3 месяцев туберкулин допускается вводить в кожу поясничной области, отступая от позвоночника на 5-8 см, используя для этого только безыгольный инъектор.

Реакции учитывают у крупного рогатого скота через 72 часа и считают реагирующими животных при утолщении кожной складки на 3 мм и более, у свиней - через 48 часов при образовании припухлости в месте введения туберкулинов. Результаты исследований оценивают индивидуально или в целом по стаду.

4.10.3. Индивидуальную оценку интенсивности реакций проводят у животных, реагирующих на оба препарата. Реакция на один из туберкулинов у крупного рогатого скота считается более интенсивной, если при измерении

кожной складки устанавливается разница не менее чем на 2 мм.

У свиней большую выраженность реакции на туберкулин для млекопитающих по величине припухлости при менее выраженной или полностью отсутствующей реакции на туберкулин для птиц обозначают знаком «+» (плюс), менее выраженную реакцию на туберкулин для млекопитающих - знаком «-» (минус), одинаковые по величине припухлости - знаком «=» (равенство).

4.10.4. Результаты оценки реакций на туберкулин записывают в ведомость учета симультанной пробы. Если реакция интенсивнее выражена на туберкулин для млекопитающих, то животное признают зараженным возбудителем туберкулеза бычьего или человеческого вида. При более интенсивной реакции на туберкулин для птиц животное считают зараженным микобактериями комплекса авиум-интрацеллюляре или атипичными микобактериями.

4.11. Глазной метод туберкулинизации (офтальмопроба)

4.11.1. Глазной метод туберкулинизации применяют для диагностики туберкулеза лошадей и других представителей непарнокопытных.

У крупного рогатого скота этот метод можно применять только одновременно с внутрикожной туберкулиновой пробой в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах для дополнительного выявления зараженных животных.

Офтальмопробу можно использовать также одновременно с внутрикожной пробой при отборе животных для диагностического убоя. Наиболее часто диагноз на вскрытии подтверждается у животных, реагирующих одновременно на внутрикожную пробу и офтальмопробу.

4.11.2. При каких-либо поражениях глаз исследование животных офтальмопробой запрещается.

4.11.3. Глазную туберкулинизацию проводят двукратно с интервалом 5-6 дней между введениями. Туберкулин в количестве 3-5 капель наносят пипеткой или шприцем с бегунком без иглы на конъюнктиву нижнего века или на поверхность роговицы при оттянутом нижнем веке. Массировать глаз по-

сле нанесения препарата запрещается.

Животным, реагировавшим на первое введение туберкулина, препарат повторно не вводят.

4.11.4. Учет результатов офтальмопробы проводят через 6, 9, 12 и 24 часа после первого и через 3, 6, 9 и 12 часов после повторного введения туберкулина. Положительная реакция характеризуется образованием слизисто-гнойного или гнойного секрета, накапливающегося в конъюнктивальном мешке или вытекающего в виде шнура из внутреннего угла глаза, гиперемией и отеком конъюнктивы. При учете реакции необходимо оттягивать нижнее веко и осматривать конъюнктивальный мешок, так как реакция может ограничиться кратковременным образованием гнойного секрета в виде зернышек.

При проявлении положительной реакции в ранние сроки (через 6-12 часов) позже учет реакции не проводят.

Кратковременная гиперемия и слезотечение с образованием небольшого количества слизистого секрета, а также отсутствие каких-либо изменений оценивается как отрицательная реакция.

4.12. Внутривенный метод туберкулинизации

4.12.1. Внутривенную туберкулиновую пробу применяют с целью отбора животных для диагностического убоя из числа реагирующих на туберкулин в благополучных по туберкулезу стадах.

4.12.2. Внутривенную пробу разрешается проводить только у взрослого крупного рогатого скота (не моложе 18 месяцев), за исключением коров (нетелей) в течение месяца до и после отела.

4.12.3. Внутривенную пробу проводят 50%-ным раствором ППД-туберкулина для млекопитающих (флакон туберкулина разводят равным количеством физиологического раствора или растворителя микобактериальных аллергенов). Каждому исследуемому животному внутривенно вводят по 1 мл препарата на 100 кг живой массы (примерно 4 мл 50% раствора).

4.12.4. Перед введением туберкулина у животного измеряют температуру тела. Животных с повышенной температурой (выше 39,5°С) не исследуют.

4.12.5. Реакцию учитывают через 3, 6 и 9 часов после введения туберкулина путем измерения температуры тела животного.

У больных туберкулезом животных реакция на внутривенное введение туберкулина характеризуется в большинстве случаев повышением температуры тела. Возможна общая реакция организма в виде судорожных явлений, сильного беспокойства, редко - потеря сознания и гибель от анафилактического шока.

Реагирующими на эту пробу признают животных с повышением температуры тела на один и более градусов выше максимальной нормальной, т.е. 40,5°С и выше.

4.13. Пальпебральный метод туберкулинизации крупного рогатого скота

4.13.1. Этот метод применяют одновременно с внутрикожной туберкулиновой пробой для дифференциации специфических и параспецифических реакций при первичной постановке диагноза. Крупному рогатому скоту туберкулин вводят пальпебрально (в толщу века) в дозе 0,2 мл в нижнее веко, отступив от его края на 1,5-2 см.

4.13.2. Учет и оценку реакции проводят через 72 часа после введения препарата. Оценку реакции проводят визуально, сравнивают веки в месте введения туберкулина и без введения туберкулина.

4.13.3. Животных считают реагирующими на туберкулин при образовании ощутимой припухлости в месте введения препарата.

4.13.4. На пальпебральную пробу реагирует только крупный рогатый скот, зараженный возбудителем бычьего или человеческого видов. Животные, инфицированные атипичными микобактериями, на пальпебральную пробу не реагируют.

4.14. Оформление результатов аллергических исследований

По окончании аллергических исследований составляют акт, с приложением описи исследованных животных.

В акте указывают наименование хозяйства, фермы, вид животных, количество исследованного поголовья, наименование, номер и срок годности серий использованных препаратов, метод исследования. В опись записывают инвентарные номера или клички животных, отмечают величину утолщения кожной складки.

В акте на исследование скота частного сектора и фермерских хозяйств указывают наименование населенного пункта, фамилию владельца, пол, масть и возраст исследованных животных, регистрируют результаты исследования.

5. Патологоанатомическое исследование

5.1. Патологоанатомические изменения при туберкулезе характеризуются образованием в органах и тканях гранулем (туберкулов). Туберкулы плотные, светло-серого или серовато-желтого цвета с творожистой массой в центре (казеозный некроз), частично или полностью обызвествленные, окруженные соединительнотканной капсулой.

5.2. При диагностике туберкулеза обязательному осмотру подвергают:

у млекопитающих - заглоточные, подчелюстные, предлопаточные, бронхиальные, средостенные, брыжеечные, портальные, надвыменные лимфатические узлы, легкие, печень, селезенку, молочную железу, плевру, брюшину, кишечник;

у птиц - печень, селезенку, кишечник в области илеоцекального соединения.

5.3. Туберкулезом могут поражаться любые органы и ткани (кроме роговых тканей) животных. Патологоанатомические изменения весьма разнообразны и зависят от возраста и резистентности организма, условий кормления,

содержания и эксплуатации животного, вирулентности и количества возбудителя, путей заражения и стадии процесса к моменту убоя животного.

В начальных стадиях процесса туберкулы представляют собой серые полупрозрачные узелки размером от булавочной головки до чечевичного зерна. Затем они мутнеют и становятся бело-желтого цвета, заполняющая их некротизированная сухая крошковатая масса напоминает творог.

5.4. У взрослого крупного рогатого скота чаще всего поражаются легкие, лимфатические узлы головы и легких, а у молодняка - брыжеечные лимфатические узлы.

В легких очаги поражения обычно выделяются над легочной плеврой, чаще по тупому краю. Очаги бывают различной величины, плотные с творожистым некрозом и перифокальным воспалением.

Печень, почки, селезенка и молочная железа поражаются обычно при генерализации туберкулезного процесса.

Туберкулезные поражения серозных покровов (жемчужница) встречаются с одновременным поражением паренхиматозных органов и региональных лимфатических узлов.

При милиарном туберкулезе (наблюдается, в основном, у молодых и истощенных животных) в различных органах и лимфатических узлах обнаруживают многочисленные плотные узелки величиной с просяное зерно.

Мелкие туберкулезные узелки следует отличать от гранулем паразитарного, микотического и иного происхождения. Микотические гранулемы макроскопически трудно отличить от туберкулезных, узелки паразитарного происхождения содержат некротическую массу, легко выдавливающуюся, внутренняя поверхность капсулы таких узелков блестящая, гладкая.

5.5. При заражении крупного рогатого скота микобактериями туберкулеза человеческого и птичьего видов патологоанатомические изменения обнаруживают редко.

5.6. Изменения при туберкулезе у животных других видов имеют некоторые особенности. У свиней чаще находят обызвествленные инкапсулированные единичные или конгломерирующие некрозы в лимфатических узлах головы и брыжейки, редко в легких и печени. У маралов и пушных зверей регистрируют генерализованный процесс с образованием множественных туберкулов. У птиц чаще всего обнаруживают поражение печени, селезенки и кишечника.

5.7. В случае отсутствия у крупного рогатого скота видимых изменений или возникших затруднениях в определении характера патологических изменений послеубойный материал направляют для лабораторного исследования. От свиней и птиц материал отбирают независимо от характера патологических изменений, обнаруженных в органах и тканях.

5.8. Материал для лабораторных исследований отбирают от каждого животного в отдельности. Для бактериологического исследования направляют от млекопитающих - лимфатические узлы: заглоточные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные, брыжеечные; лимфатические узлы, взятые в области илеоцекального соединения и подвздошной кишки, упаковывают отдельно от остальных лимфатических узлов. Портальные, предлопаточные, надвыменные, поверхностные паховые лимфатические узлы и внутренние органы (легкие, печень, почки) направляют только при наличии туберкулезных изменений.

Парные лимфатические узлы отбирают оба, указав их название на этикетке, которую помещают вместе с пробой.

Трупы (тушки) птиц в лабораторию направляют целиком.

5.9. Пробы патологического материала, отобранные для бактериоскопического, культурального и биологического исследований, доставляют в лабораторию в свежем или замороженном виде. Для гистологического исследования отбирают кусочки патологически измененных органов и фиксируют их в 10 %-ном нейтральном водном растворе формалина. Пробы хранят до окон-

чания лабораторного исследования.

5.10. На отправляемый в лабораторию материал составляют сопроводительный документ установленной формы с указанием результатов аллергических и патологоанатомических исследований.

6. Бактериологическое исследование

6.1. Сущность метода заключается в выявлении и выделении культур микобактерий, определении вида возбудителя туберкулеза.

Бактериологическое исследование биоматериала включает бактериоскопический, культуральный и биологический способы исследования.

Бактериоскопически и культурально исследуют биоматериал от каждого животного в отдельности. Для биологической пробы допускается составлять общую пробу не более чем от двух животных одного стада.

Исследование проводят в следующем порядке:

- микроскопия мазков, изготовленных из биоматериала и окрашенных по методу Циля-Нильсена;

- культуральное исследование (посев биоматериала на питательные среды);

- биологическое исследование (биопроба).

6.2. Бактериоскопическое исследование

6.2.1. Бактериоскопию проводят в целях определения наличия и степени обсемененности материала кислотоустойчивыми микобактериями. Сущность метода заключается в способности микобактерий, окрашенных фуксином, удерживать краситель после длительного обесцвечивания в солянокислом спирте.

Способ световой микроскопии обычно дает положительные результаты при содержании 100 000 и более бактериальных клеток в 1 мл материала. Результаты (положительные или отрицательные) микроскопии не дают основания для постановки диагноза на туберкулез у животных (кроме птиц) и обяза-

тельно должны быть подтверждены культуральным или биологическим методами исследований. При обнаружении микобактерий в мазках из материала от птиц, в органах которых отмечены патологические изменения, диагноз на туберкулез считают установленным и дальнейшие исследования не проводят. В случае отрицательных результатов микроскопии мазков проводят культуральное исследование материала.

6.2.2. Для микроскопии из каждого органа и лимфатического узла готовят по 2 мазка путем тщательного растирания материала между двумя стеклами. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем, окрашивают по Цилю-Нильсену (см. приложение № 1) и просматривают под микроскопом.

Для микобактерий туберкулеза характерны тонкие, прямые или изогнутые красные палочки различной длины, часто зернистые. Они располагаются небольшими скоплениями или одиночно.

Атипичные микобактерии морфологически трудноотличимы от возбудителя туберкулеза, однако чаще это грубые, толстые, как правило, незернистые палочки, различные по длине.

6.3. Культуральное исследование

6.3.1 Культуральное исследование дает положительные результаты при наличии 20-100 микобактерий в 1 мл исследуемого материала.

6.3.2. Для получения чистых культур микобактерий материал подвергают предварительной обработке.

Из каждого доставленного в лабораторию лимфатического узла и участка ткани вырезают кусочки размером 0,5 см на границе здоровой и измененной ткани. Общая масса отобранного материала для исследования составляет около 6-10 г.

Брыжеечные лимфатические узлы, лимфоузлы, взятые в области илеоцекального соединения и подвздошной кишки, обрабатывают и высевают отдельно от другого материала (нельзя смешивать с легкими, печенью и средостенными лимфоузлами). Отобранный материал обрабатывают по одному из

следующих методов.

Метод Гона-Левенштейна-Сумиоши. Кусочки материала измельчают ножницами в ступке, тщательно растирают пестиком со стерильным песком или стеклом и заливают в зависимости от свежести материала 3-6 %-ным раствором серной кислоты или 5-10 % -ным раствором щавелевой кислоты в соотношении: на 1 объем материала - 4 объема кислоты. Затем центрифугируют в течение 10-15 мин при 3000 об/мин. Общая экспозиция воздействия кислотой не должна превышать 30 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок отмывают 2-3 раза физиологическим раствором центрифугированием при том же режиме и используют для посевов, нанося и растирая его шпателем на поверхности яичной среды.

Метод А.П. Аликаевой. Кусочки материала помещают в ступку и заливают 3-6 %-ным раствором серной кислоты на 10-20 мин, ступку накрывают листом стерильной пергаментной бумаги. Затем кислоту сливают, материал промывают 3 раза в течение 5-10 мин физиологическим раствором, после чего раствор удаляют, и кусочки ткани тщательно растирают со стерильным песком или стеклом и незначительным объемом физиологического раствора (1-1,5 мл). Из полученной взвеси делают посевы и мазки, а к оставшейся доливают физиологический раствор в количестве, необходимом для заражения животных (1-2 мл на одно животное).

Метод флотации. Применяют для концентрации микобактерий в исследуемом материале. Кусочки материала растирают в ступке с физиологическим раствором до консистенции сметаны, 10 мл суспензии помещают в узкогорлую колбу вместимостью 250 мл и добавляют 10 мл 1%-ного раствора едкого натра. Смесь в течение 10 мин (не более) тщательно встряхивают в шуттель-аппарате до получения однородной взвеси. Затем гомогенизированный материал разбавляют в соотношении 1:9 физиологическим раствором и прибавляют 1-2 мл ксилола или авиационного бензина. Смесь снова встряхивают 5-10 мин, добавляют физиологический раствор до горлышка колбы и

оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Микобактерии туберкулеза концентрируются во флотационном кольце у горлышка колбы.

Для приготовления мазков содержимое образовавшегося кольца осторожно отсасывают пипеткой и наносят по мере подсыхания несколько раз на предметное стекло. Для посевов на питательные среды пенистую часть флотационного кольца переносят пастеровской пипеткой в стерильные пробирки, добавляя приблизительно равное количество 3- 6 %-ного раствора серной кислоты. Пробирки тщательно встряхивают в течение 3-5 мин и оставляют на 10 мин. Содержимое вновь образовавшегося компактного кольца засевают петлей-ракеткой в пробирки с питательной средой.

6.3.3. Для выращивания микобактерий используют плотные яичные среды Левенштейна-Йенсена, ФАСТ-ЗЛ, Финн-2, Гельберга, Петраньяни (см. приложение № 2).

6.3.4. Подготовленный для исследования материал высевают в 5-10 пробирок с питательной средой Левенштейна-Йенсена и одну из следующих сред: Гельберга, Петраньяни, Финн-2, ФАСТ-ЗЛ. Посев проводят пастеровской пипеткой или платиновой петлей, осторожно растирая материал по всей поверхности питательной среды. Засеянные пробирки укладывают в наклонном положении и помещают в термостат с температурой 37-38°С. Через 2 суток посевы просматривают и определяют восстановление цвета среды. Если цвет среды не восстановился, обработку и посев повторяют. Пробирки, в которых появился рост посторонней микрофлоры, удаляют. В остальных ватно-марлевые пробки парафинируют.

6.3.5. Посевы инкубируют в течение 3 месяцев. Для выявления начального роста микобактерий пробирки с посевами просматривают не реже одного раза в неделю. Рост микобактерий туберкулеза бычьего вида чаще обнаруживают на 20-60 сутки, человеческого на 20-30, птичьего - на 10-20, атипичных микобактерий - на 3-30 сутки.

6.3.6. У выделенных первичных культур изучают и описывают свойства по следующей схеме:

а) сроки обнаружения первичного роста;

б) характер роста - отдельные колонии, скопления их, сплошной рост;

в) характеристика колоний:

величина - мелкие, крупные;

форма - круглая, звездчатая, с неровными краями;

поверхность - гладкие, влажные, шероховатые, сухие, складчатые;

рельеф - плоские, выпуклые, шаровидные;

консистенция - крошковатые, вязкие, слизистые;

пигментообразование - непигментированные, пигментные (цвет);

эмульсируемость в физиологическом растворе - отсутствует, слабая, хорошая;

г) тинкториальные свойства при окраске по Цилю-Нильсену;

д) морфология микобактерий:

длина - длинные, короткие, коккоподобные;

толщина - тонкие, толстые;

форма - прямые, изогнутые, ветвящиеся, расположенные под углом;

количество - единичные клетки, небольшие скопления, кучки.

6.3.7. Микобактерии туберкулеза бычьего вида в первых генерациях растут скудно, через 20-60 суток, в виде мелких, гладких, шаровидных, цвета слоновой кости колоний. Реже встречаются культуры, образующие шероховатые колонии.

Для микобактерий туберкулеза человеческого вида характерен интенсивный узелковоподобный, шероховатый, сухой рост (через 20-30 суток) культуры цвета слоновой кости. Это R-формы (шероховатые) колоний. Иногда встречаются S -формы (гладкие) колоний.

Культуры микобактерий туберкулеза птичьего вида растут быстрее (10-15 суток), чем микобактерии туберкулеза бычьего и человеческого видов.

Колонии мягкие, слизистые, серовато-белые, реже слегка желтоватые, иногда с пуговицеобразным возвышением и кратеровидным углублением (форма «тюрбана»).

6.3.8. Для дальнейшего изучения культуральных свойств микобактерий накапливают бактериальную массу выросших колоний на яичной среде. Для пересева отбирают колонии, наиболее характерные по внешнему виду для микобактерий туберкулеза.

Для дифференциации культур возбудителей туберкулеза бычьего, человеческого, птичьего видов и атипичных микобактерий, накопленную бакмассу пересевают на различные питательные среды (яичные, мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА) и яичную среду с салицилатом натрия) и культивируют их при разных температурных режимах: 20-22°, 37-38° и 45 °С.

Для пересева платиновой петлей (диаметр 2-3 мм) снимают 1-2 петли культуры и переносят в стерильную пробирку или пенициллиновый флакон. Бактериальную массу тщательно растирают в 1-1,5 мл физиологического раствора, который добавляют небольшими порциями в пробирку (флакон).

Приготовленную взвесь вносят пастеровской пипеткой по 2-3 капли в девять пробирок со средой Левенштейна - Йенсена (по 3 пробирки на каждый температурный режим), в три пробирки яичной среды с салицилатом натрия, в три пробирки с МПА и МПБ. На пробирках делают надписи с указанием номера экспертизы, даты пересева и температурного режима культивирования. Пробки парафинируют и пробирки устанавливают в термостат при заданных температурах. Пробирки с посевами на мясопептонный бульон, мясопептонный агар и на яичную среду с салицилатом натрия инкубируют в термостате при 37°С.

При пересевах учет появления роста в первые 10 суток культивирования проводят каждые двое - трое суток и каждые пять дней в последующие три недели.

Характер роста на яичных средах и МПА определяют и описывают по той же схеме, что и первичные культуры, а на МПБ - в следующем порядке:

пленка - наличие, отсутствие;

интенсивность развития пленки - тонкая, умеренно развитая, толстая;

поверхность пленки - гладкая, зернистая, морщинистая;

цвет пленки;

нити (наличие и характер): тонкие, толстые, короткие, длинные;

осадок - плотный, рыхлый, хлопьевидный, цвет;

изменение среды культивирования - помутнение, цвет.

Помутнение среды указывает на загрязнение культуры. Микобактерии туберкулеза всех трех видов не образуют пигмент и растут на яичных средах без салицилата натрия, M.tuberculosis и M.bovis растут при температуре - 37-38°С, M.avium при температурах - 22 ^{0}С, 37-38°С и 45 ^{0}С, микобактерии туберкулеза птичьего вида также растут на яичной среде с салицилатом натрия. M.tuberculosis и M.bovis не растут на МПБ и МПА, на этих средах допускается слабый рост микобактерий птичьего вида.

Атипичные микобактерии растут в первые 3-7 дней после посева при разных температурах на яичных средах, а некоторые - на яичной среде с салицилатом натрия, МПБ и МПА.

На основании характера роста культур на питательных средах можно ориентировочно дифференцировать возбудителей туберкулеза бычьего и человеческого видов от других микобактерий (возбудитель туберкулеза птичьего вида и атипичные микобактерии). Основные культуральные свойства микобактерий приведены в приложении № 3.

Видовую принадлежность выделенных микобактерий туберкулеза можно определять на основании результатов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

6.4. Биологическое исследование.

6.4.1. Метод биологической пробы применяют для обнаружения мико-

бактерий туберкулеза в исследуемом материале и определения видовой принадлежности культур возбудителя по патогенным свойствам для лабораторных животных.

6.4.2. Выявление возбудителя туберкулеза в биологическом материале проводят параллельно с культуральным исследованием путем введения посевной суспензии трем морским свинкам. Определение видовой принадлежности микобактерий проводят путем введения первичных культур трем морским свинкам, трем кроликам и при необходимости - трем курам.

6.4.3. Лабораторных животных (морских свинок, кроликов, кур), используемых для исследования проверяют аллергически туберкулином. Морских свинок и кроликов исследуют ППД- туберкулином для млекопитающих, кур - ППД-туберкулином для птиц.

Накануне исследования у свинок на боку выщипывают или выбривают шерсть. ППД - туберкулин для млекопитающих вводят внутрикожно в дозе 25 МЕ (международных единиц) в объеме 0,1 мл растворителя или стерильного физиологического раствора. Реакцию на туберкулин учитывают через 24 часа. Положительная реакция проявляется гиперемией кожи в месте введения туберкулина и образованием уплотненной припухлости диаметром 5 мм и более, иногда с некрозом в центре. Кроликам туберкулин в дозе 50 МЕ/0,1 мл вводят в кожу наружной поверхности уха. Реакцию учитывают через 24 и 48 часов. Положительная реакция проявляется гиперемией кожи диаметром от 5 мм и более и образованием припухлости в месте введения туберкулина.

Курам вводят 0,1 мл ППД - туберкулина для птиц внутрикожно в бородку, реакцию учитывают через 30-36 ч. Положительная реакция характеризуется опуханием бородки.

Биопробу проводят на животных, не реагирующих на введение туберкулина.

6.4.4. Постановка биопробы для обнаружения возбудителя туберкулеза в исследуемом биоматериале

6.4.4.1. Биопробу ставят с материалом от каждого животного в отдельности, иногда допускается составлять общую пробу не более, чем от двух животных одного стада. Этот метод дает положительные результаты при наличии в инъецируемом материале единичных клеток микобактерий туберкулеза.

6.4.4.2. Для постановки биопробы берут трех морских свинок массой 300-500 г (желательно светлой масти). Взвесь материала, использованного для посевов на питательные среды и нейтрализованного 10%-ным раствором аммиака или 10%-ным стерильным водным раствором двууглекислой соды до получения pH 7,0-7,2, отстаивают до осседания крупных частиц и образовавшуюся надосадочную суспензию в дозе 1-2 мл вводят морским свинкам подкожно в области паха.

6.4.4.3. При развитии туберкулезного процесса у морских свинок через 14-28 сут в месте инъекции материала наблюдают увеличение и уплотнение регионального лимфатического узла и уплотнение кожи, затем образование язвы. Свинки прогрессивно худеют. Туберкулез у морских свинок может протекать без проявления клинических симптомов.

6.4.4.4. За животными ведут наблюдение в течение трех месяцев. При гибели морских свинок в течение срока наблюдения проводят вскрытие трупов и патологоанатомическое исследование. При отсутствии падежа свинок убивают через 3 месяца после заражения, также проводят патологоанатомическое исследование.

Из участков органов и лимфатических узлов готовят мазки и окрашивают по Цилю-Нильсену. При положительном результате бактериоскопии материала дают положительное заключение на туберкулез.

6.4.5. Постановка биопробы для определения видовой принадлежности культур возбудителя туберкулеза.

6.4.5.1. Для определения вида возбудителя туберкулеза, выделенного при культуральном исследовании, заражают трех морских свинок, трех кро-

ликов и при необходимости трех кур. Биопробу ставят отдельно с каждой культурой.

Для постановки биопробы берут кроликов массой не менее 2 кг, морских свинок массой 300-500 г и кур не моложе 5 месяцев.

6.4.5.2. Заражение животных проводят 3-4- недельной культурой: морских свинок - подкожно, кроликов - внутривенно в краевую вену уха, кур - внутривенно в подкрыльцовую вену или внутримышечно в область грудины в дозах по I мг микобактерий, суспендированных в I мл физиологического раствора.

Для приготовления суспензии бактериальную массу в количестве 8 -10 мг снимают шпателем с поверхности плотной питательной среды и, соблюдая меры предосторожности, переносят в стерильный, предварительно взвешенный пенициллиновый флакон. Флакон с бакмассой взвешивают на аналитических весах. Разница между вторым и первым взвешиванием показывает вес взятой культуры. Для приготовления суспензии физиологический раствор берут из расчета I мл на I мг бактериальной массы. Если бактериальная масса трудно гомогенизируется (суспензия должна быть однородной), её сначала тщательно растирают с несколькими каплями физиологического раствора пестиком в ступке или стеклянной палочкой в пробирке, а затем к суспензии частями добавляют необходимый объем физиологического раствора.

6.4.5.3. За животными ведут наблюдение в течение трех месяцев. При гибели животных в течение срока наблюдения проводят вскрытие трупов. При отсутствии падежа животных убивают через 3 месяца после заражения.

6.4.5.4. Определение вида микобактерий туберкулеза проводят на основании результатов патологоанатомических исследований зараженных животных.

Возбудитель туберкулеза бычьего вида вызывает у морских свинок и кроликов генерализованный процесс в период от 20 до 90 суток после введения культуры. У морских свинок в регионарных к месту введения паховых

лимфатических узлах на разрезе обнаруживают казеозные очаги. Аналогично поражены и другие лимфатические узлы. Селезенка и печень увеличены, плотные, с серо-белыми или серо-желтыми мелкими сливающимися узелками, в легких множество серо-белых очажков.

У кроликов резко увеличены легкие, в них множество очажков, часто с наличием некрозов. В печени и селезенке поражения наблюдаются чаще в виде отдельных небольших узелков. В почках могут развиваться очаговые поражения.

Микобактерии человеческого вида вызывают у морских свинок генерализованный туберкулез, а у кроликов не вызывают прогрессирующего процесса. Единичные очажки можно обнаружить в легких и редко в почках, чаще поражения отсутствуют.

Микобактерии туберкулеза птичьего вида у морских свинок, как правило, вызывают только абсцесс в месте введения культуры и увеличение регионарного пахового лимфатического узла, а у кроликов - сепсис, характеризующийся резким увеличением селезенки и гибелью животных в течение 10-30 суток.

Микобактерии туберкулеза птичьего вида вызывают гибель кур в течение 30 суток. Иногда куры выживают до 2-3 месяцев. У кур, павших в ранние сроки, на вскрытии находят резкое увеличение селезенки и печени, при микроскопии обнаруживают обилие кислотоустойчивых микобактерий. У кур, убитых через 3 месяца после заражения, на вскрытии находят множественные серо-желтые бугорки в печени и селезенке, а в окрашенных по Цилю-Нильсену мазках из органов, - микобактерии туберкулеза.

Микобактерии туберкулеза человеческого и бычьего видов при внутривенном заражении кур не вызывают у них заболевания и каких-либо изменений в органах.

Принадлежность микобактерий туберкулеза к тому или иному виду определяют по следующим данным:

при генерализованном процессе у морских свинок и кроликов - **бычий вид;**

при отсутствии поражений или наличии единичных типичных очажков в легких у кроликов и генерализованном процессе у морских свинок - *человеческий вид;*

при наличии поражений у кур и септического процесса у кроликов - *птичий вид.*

6.4.5.5. Дифференциацию культур атипичных микобактерий и определение их сенсибилизирующей роли можно проводить в порядке, изложенном в приложении 4.

7. Молекулярно-генетический метод исследования (ПЦР)

7.1 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является молекулярно-генетическим экспресс-методом исследования, основанным на обнаружении в исследуемом материале специфического фрагмента ДНК, характерного только для определенного вида возбудителя. Принцип ПЦР заключается в выделении и многократном повторении циклов амплификации (копирования) специфического фрагмента ДНК возбудителя в исследуемой пробе и выявлении его с помощью электрофореза в агарозном геле или другим способом.

7.2. ПЦР применяют при постановке диагноза на туберкулез:

у крупного рогатого скота - при отсутствии видимых изменений или возникших затруднениях в определении характера патологоанатомических изменений;

у других видов млекопитающих животных - независимо от характера патологоанатомических изменений;

у птиц - при отсутствии видимых изменений или возникших затруднениях при определении характера изменений.

ПЦР применяют также для определения видовой принадлежности выделенных микобактерий.

7.3. Отбор и доставка материала в ветеринарную лабораторию

7.3.1. Материал отбирают от каждого животного в отдельности. Для исследования направляют в обязательном порядке лимфатические узлы: подче-

люстные, заглоточные, бронхиальные, средостенные, портальные, брыжеечные и лимфоузлы илеоцекального соединения и подвздошной кишки; кусочки паренхиматозных органов: легких и печени.

Парные лимфоузлы берут с обеих сторон туши (трупа) животного.

Лимфатические узлы, не имеющие при прощупывании очагов уплотнения, направляют в лабораторию целиком, без надрезов.

7.3.2. Отобранный от каждого животного материал группируют и упаковывают по пробам:

1 - лимфоузлы подчелюстные, заглоточные, бронхиальные, средостенные и кусочки легких;

2 - лимфоузлы портальные, области илеоцекального соединения и подвздошной кишки, брыжеечные и кусочки печени.

7.3.3. Пробы материала направляют в ветеринарную лабораторию в свежем, замороженном виде или законсервированными 30%-ным раствором глицерина.

7.4. Подготовка материала в ветеринарной лаборатории

7.4.1. При подготовке материала для исследования в ПЦР необходимо соблюдение условий, исключающих возможность механической контаминации его возбудителем туберкулеза и его фрагментами и получения по этой причине ложноположительных результатов реакции.

Инструментарий, лабораторная посуда, вода, растворы, соприкасающиеся с обследуемым материалом, должны быть свободны от клеток возбудителя туберкулеза - живых и убитых, и фрагментов его ДНК. При этом следуст учитывать, что обычно применяемые методы стерилизации (кипячение, автоклавирование и т.п.) недостаточны для разрушения ДНК.

Лабораторную посуду выдерживают в течение 2-х часов в сухожаровом шкафу при температуре не ниже 180^0 С или обрабатывают 1 М раствором соляной кислоты, 10%-ным раствором гипохлорита натрия, 10%-ным раствором хлорной извести или смесью концентрированной серной кислоты с двухро-

мовокислым калием (хромпик) и затем промывают дистиллированной водой.

Инструментарий (ножницы, пинцеты и т.п.) фламбируют над пламенем горелки. Ступки, пестики после стерилизации кипячением или автоклавированием фламбируют с помощью подожженного ватного тампона, смоченного 96^0-ным спиртом.

7.4.2. Размороженные или отмытые от консервирующей жидкости лимфатические узлы и кусочки паренхиматозных органов освобождают от жировой ткани и просушивают фильтровальной бумагой. Затем с помощью пинцета погружают по одному в 96^0-ный спирт и сразу поджигают. После угасания пламени фламбирование повторяют.

Фламбирование каждого лимфоузла или кусочка паренхиматозного органа проводят не менее 4-х раз. При фламбировании биоматериала соблюдают меры противопожарной безопасности.

7.4.3. Материал, освобожденный таким способом с поверхности от возможной контаминации возбудителем туберкулеза и фрагментами его ДНК, помещают по отобранным пробам в профламбированные ступки и измельчают ножницами. Затем материал в ступках растирают с прокаленным битым стеклом, добавляют 10-15 мл дистиллированной воды и перемешивают. Образовавшуюся смесь по 0,4-0,5 мл переносят пастеровской пипеткой в пробирки с крышками для ПЦР вместимостью 1,5 мл и направляют в лабораторию ПЦР-диагностики.

Оставшийся в ветеринарной лаборатории исходный материал в виде суспензии ткани хранят в замороженном виде до окончания исследования.

7.5. Для определения видовой принадлежности микобактерий бактериальную массу, полученную при культуральном исследовании, направляют в лабораторию ПЦР-диагностики. При подготовке и отправке культуры в лабораторию ПЦР-диагностики необходимо исключить возможность механической контаминации ее возбудителем туберкулеза и фрагментами его ДНК.

При соблюдении таких условий отсутствуют ложноположительные результаты реакции.

Для этого с поверхности яичной среды шпателем снимают 1-3 колонии микобактерий и переносят их в 2-3 одноразовые пробирки для ПЦР вместимостью 0,5-1,5 мл (не менее 2-х поверхностей).

Оставшиеся в ветеринарной лаборатории первичные культуры хранят до окончания исследования.

7.6. Пробы материала или культуры в пробирках для ПЦР, с указанием на них номера животного (экспертизы), направляют с сопроводительным документом в лабораторию ПЦР-диагностики в свежем или замороженном виде.

7.7. Работу проводят в аккредитованной в установленном порядке лаборатории ПЦР-диагностики в соответствии с «Правилами проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции», утвержденными Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997 г., № 13-7-2/840.

В лаборатории ПЦР - диагностики анализ проводят в соответствии с действующими наставлениями по применению тест-систем для обнаружения и дифференциации M. bovis и M. tuberculosis, а также тест-системы для обнаружения M. avium, утвержденными Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ.

7.8. Заключение по результатам ПЦР

7.8.1. Положительный результат ПЦР свидетельствует о наличии в организме животного ДНК определенного вида возбудителя туберкулеза (M.bovis, M. tuberculosis или M. avium).

7.8.2. Отрицательный результат анализа указывает на отсутствие ДНК возбудителя туберкулеза (M. bovis, M.tuberculosis или M. avium) в исследуемых образцах материала от животных или выделенной культуры.

8. Гистологическое исследование

8.1. Гистологическое исследование проводят для дифференциации патологоанатомических изменений, типичных для туберкулеза, и сходных изменений, наблюдаемых при других болезнях.

8.2. Присланный для гистологического исследования патологический материал осматривают, подозрительные участки тканей вырезают вместе с прилегающей нормальной тканью и помещают для фиксации в 10%-ный раствор формалина при комнатной температуре на 3-5 суток. Из фиксированного материала вырезают небольшие кусочки, отмывают их в течение 2-3 часов в проточной воде, подвергают целлоидиновой или парафиновой проводке, наклеивают на блоки и готовят срезы толщиной 10-15 микрон. Для ускорения гистологического исследования можно готовить срезы из отмытых от формалина кусочков на замораживающем микротоме. Срезы окрашивают гематоксилин - эозином и при необходимости по Цилю-Нильсену.

В положительных случаях при гистологическом исследовании в тканях находят гранулемы с некротизированным центром, окруженные зоной эпителиоидных, отдельных гигантских и лимфоидных клеток и соединительнотканной капсулой. В специфической капсуле, как правило, формируются дочерние резорбтивные узелки.

8.3. При дифференциальной диагностике следует учитывать гранулемы, образующиеся при актиномикозе, нокардиозе, коринебактериозе, паразитарных поражениях, паратуберкулезе.

В гранулемах микотического происхождения находят в некрозе мицелий гриба, при паразитарных - тело паразита и эозинофильноклеточную пролиферацию в капсуле.

При паратуберкулезе наблюдают в брыжеечных лимфатических узлах и кишечной стенке эпителиоидно-клеточную пролиферацию без образования некрозов.

9. Установление лабораторного диагноза на туберкулез

9.1. Лабораторные исследования на туберкулез проводятся в срок до 6 месяцев.

9.2. Лабораторный диагноз на туберкулез у млекопитающих животных считается установленным в следующих случаях:

- получен положительный результат полимеразной цепной реакции (ПЦР) и из исследуемого материала выделена культура микобактерий туберкулеза бычьего, человеческого или птичьего вида со свойствами, характерными для этих возбудителей болезни;

- получен положительный результат биологического исследования на туберкулез.

9.3. Лабораторный диагноз на туберкулез у птиц считается установленным в следующих случаях:

- при обнаружении микобактерий в мазках из патологического материала при бактериоскопическом исследовании или положительных результатах ПЦР;

- из исследуемого материала выделена культура микобактерий птичьего вида (от попугаев - птичьего или человеческого видов).

9.4. О результатах лабораторного исследования ветеринарные лаборатории обязаны сообщить специалистам хозяйств, руководству предприятий и организаций, приславшим материал, и одновременно главному ветврачу района (города) по местонахождению хозяйства. Ответ дается по утвержденной форме, в нем должны быть подробно и понятно указаны результаты проведенных исследований и конкретное заключение лаборатории о наличии или отсутствии туберкулеза.

С утверждением настоящего Наставления утрачивает силу «Наставление по диагностике туберкулеза животных», утвержденное Главным управлением ветеринарии Государственного агропромышленного комитета СССР 25.02.86 г.

Приложение № 1
к Наставлению по диагностике
туберкулеза животных

I. Изготовление мазков и методы окраски микобактерий

1.1. Методика приготовления мазков из культур микобактерий.

Мазки готовят, используя чистые обезжиренные предметные стекла. В боксе, в строго стерильных условиях, над пламенем спиртовки, открывают пробирку и стерильной платиновой лопаткой осторожно снимают часть исследуемой колонии, наносят на предметное стекло, на которое предварительно была нанесена капля физиологического раствора. Мазок можно делать оттянутой запаянной пастеровской пипеткой. На предметном стекле колонию хорошо растирают до образования хорошей суспензии. Пробирку закрывают над пламенем спиртовки и обеззараживают платиновую лопатку вне пробирки. При этом рекомендуется нагревать лопатку с тыльной стороны, постепенно передвигая до кончика, для избежания разбрызгивания культуры во время прокаливания, пока не появится дым на кончике лопатки от оставшейся культуры, и только после этого накалять кончик лопатки. Пастеровские пипетки обеззараживают в банке с дезинфицирующими растворами или в физиологическом растворе, дистиллированной воде с последующим автоклавированием.

1.2. Окраска мазков по Цилю-Нильсену. На предварительно фиксированный над пламенем мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, наливают на нее карболовый раствор фуксина Циля и нагревают (2-3 раза в течение 5 мин) до момента появления паров и не доводят краситель до кипения. Дают препарату остыть, удаляют бумагу. Мазок обесцвечивают 3%-ным раствором солянокислого спирта в течение 30 секунд до получения слабозаметного розоватого оттенка. После обесцвечивания препарат тщательно промывают водой и окрашивают метиленовой синькой Леффлера в течение 3-5 мин. Краску смывают, мазок промывают водой и высушивают.

1.2.1. *Приготовление карболового раствора фуксина Циля:* 1 г основного кристаллического фуксина растирают в ступке с 5 г кристаллической карболовой кислоты и 0,5 мл глицерина, прибавляя небольшими порциями 10 мл этилового спирта. Затем при постоянном помешивании к смеси добавляют 100 мл дистиллированной воды. Раствор краски выдерживают в термостате 24 ч и в дальнейшем хранят во флаконах из темного стекла с притертой пробкой. Перед употреблением раствор фильтруют через бумажный фильтр.

1.2.2. *Приготовление 3%-ного солянокислого спирта:* к 97 мл 96°-ного этилового спирта добавляют 3 мл концентрированной соляной кислоты.

1.2.3. *Приготовление метиленовой синьки Леффлера:* 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленовой сини (8-9 г кристаллической метиленовой сини в 100 мл этилового спирта) пропускают через бумажный фильтр, прибавляют 1 мл 1%-ного раствора едкого калия (КОН) и разбавляют в 100 мл дистиллированной воды. Раствор устойчив в течение длительного времени.

Приложение № 2
к Наставлению по диагностике
туберкулеза животных

1. Приготовление и контроль качества питательных сред

1.1. Для выращивания первичных культур микобактерий туберкулеза используют яичные среды: Петраньяни, Гельберга, Левенштейна-Йенсена, Финн-2.

Яичные среды готовят только в стерильной посуде; добавление яичной массы, фильтрацию и разлив производят в боксе. Для приготовления яичных питательных сред используют только свежие куриные яйца со сроком хранения не более 5 сут. Яйца предварительно тщательно моют щеткой в теплой воде с мылом, смачивают спиртом и обжигают, затем разбивают стерильным пинцетом, выливают содержимое в стерильную банку (большую колбу) с бусами или битым стеклом и энергично встряхивают после внесения каждого яйца.

1.2. Среда Гельберга (ингредиенты и приготовление). Среда состоит из яичной массы, молока, картофельного отвара и солевого раствора.

Яйца цельные	- 6 шт.
Желтки	- 4 шт.
Молоко	- 100 мл
Картофельный отвар	-100 мл
Солевой раствор	-100 мл

Стерильный 2%-ный водный раствор малахитовой зелени - 7,8 мл

Молоко, картофельный отвар и солевой раствор готовят заранее и хранят в холодильнике.

1.2.1. *Приготовление молока.* Молоко предварительно ставят на сутки в холодильник, снимают сливки, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 110 мл в колбы или флаконы и стерилизуют текучим паром в аппарате Коха два дня подряд: в первый день - 15 мин, во второй - 10 мин

(после стерилизации в колбе (во флаконе) остается 100 мл молока). Стерилизацию можно проводить в автоклаве, при этом температуру доводят до 120°С, после автоклав выключают.

1.2.2. *Приготовление картофельного отвара.* Картофель моют щеткой с мылом, промывают проточной водой, чистят, заливают двойным количеством водопроводной воды (на 1 кг картофеля 2 л воды), кипятят 15 мин, отстаивают и верхний слой фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Отвар разливают во флаконы по 110 мл и стерилизуют так же, как молоко.

Соли и пептон растворяют в небольшом количестве воды, добавляют глицерин и остальную воду. Раствор слегка подогревают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают во флаконы по 110 мл и стерилизуют так же, как и картофельный отвар.

1.2.3. *Приготовление солевого раствора.*

Калий фосфорно-кислый двузамещенный (K_2HPO_4)	1 г
Натрий лимоннокислый	1г
Магний сернокислый ($MgSO_4 \times 7\ H_2O$)	1 г
Пептон	6 г
Глицерин х.ч ($C_3H_8O_3$)	30 мл
Вода дистиллированная	до 1000 мл

1.2.4. *Приготовление водного раствора малахитового зеленого.* 2 г малахитового зеленого растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при 120^{0}С.

1.2.5. *Приготовление среды.* В банку с бусами и взбитыми яйцами добавляют по 100 мл молока, картофельного отвара, солевого раствора и 7,5 мл 2%-ного водного раствора малахитовой зелени. Смесь тщательно размешивают, разливают по пробиркам (4-5 мл в каждую), помещают в наклонном

положении в свертыватель или аппарат Коха и стерилизуют в течение двух суток, первый день при 85°С, во второй - при 90°С в течение 30 мин.

1.3. Среда Петраньяни (ингредиенты и приготовление)

Молоко цельное	- 300 мл
Крахмал картофельный	- 12 г
Пептон	- 2 г
Картофель очищенный, мелко нарезанный	- 2 клубня размером с яйцо

Ингредиенты тщательно смешивают в колбе и варят на слабом огне до образования клейстера. К охлажденной до 50°С смеси добавляют 8 цельных яиц и 2 желтка, 24 мл глицерина и 20 мл 2%-ного стерильного водного раствора малахитовой зелени. Хорошо смешивают, фильтруют через воронку с двойным слоем марли, разливают по пробиркам (4-5 мл в каждую) и стерилизуют, как указано в п.1.2.5.

1.4. Среда Левенштейна-Иенсена (ингредиенты и приготовление)

1.4.1. *Солевой раствор*

Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2P0_4)	- 2,4 г
Магний сернокислый ($MgSO_4$ x 7 H_2O)	- 0,34 г
Магний лимоннокислый ($C_6H_5O_7$) 2 x $Mg_{14}H_2O$)	- 0,6 г
Аспарагин ($C_4H_8O_3$ x H_2O)	- 3,6 г
Глицерин х.ч. ($C_3H_8O_3$)	- 12 мл
Вода дистиллированная	до 600 мл

Соли растворяют в указанной последовательности, раствор стерилизуют 2 часа текучим паром или в автоклаве в течение 15 мин при температуре 120°С.

1.4.2. *Яичная масса*. Приготавливают 1 000 мл однородной суспензии из свежих яиц. Для этого яйца, вымытые в проточной воде с мылом, в коли-

честве 20-25 штук кладут в 70%-ный спирт на срок не менее 1часа, затем разбивают в стерильную круглодонную колбу с бусами (из каждого десятка яиц отбрасывают два белка), хорошо размешивают и фильтруют через стерильную марлю.

1.4.3. *Водный 2%-ный раствор малахитовой зелени.* 2 г малахитового зеленого растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при 120°С.

1.4.4. *Приготовления среды.* В колбу, содержащую 30 г картофельного крахмала, добавляют 600 мл солевого раствора, смесь нагревают, постоянно взбалтывая, на кипящей бане до вязкой консистенции. К охлажденной (до 45-60°С) смеси добавляют I л яичной массы и 20 мл 2%-ного водного раствора малахитовой зелени, тщательно перемешивают, избегая появления пузырьков воздуха, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки по 4-5 мл и стерилизуют как указано в пункте 1.2.5.

1.5. Среда Финна-2 (ингредиенты и приготовление)

1.5.1.*Солевая основа:*

Магний сернокислый ($MgSO_4$ x 7 H_2O)	- 0,5 г
Натрий лимоннокислый	- 1,0 г
Квасцы железоаммиачные	- 0,05 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный (K_2HPO_4)	- 20,0 г
Аммоний лимоннокислый однозамещенный	- 5,0 г
Натрий глутаминовокислый однозамещенный	- 10,0 г
Глицерин х.ч. ($C_3H_8O_3$)	- 20 мл
Вода дистиллированная	- до 1 000 мл

Ингредиенты растворяют в указанной последовательности в теплой дистиллированной воде (pH не корректировать - 6,3 - 6,5). Раствор стерилизуют при 1 атм в течение 20 мин.

1.5.2. *Приготовление яичной массы.* 40 цельных яиц моют щеткой в теплой воде в мылом, обрабатывают спиртом, затем разбивают пинцетом и выливают в стерильную колбу с бусами, которую после добавления каждого яйца встряхивают до образования однородной массы.

1.5.3. *Водный 2%-ный раствор малахитовой зелени.* 2 г малахитового зеленого растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Стерилизуют в автоклаве при 120°С в течение 30 мин.

1.5.4. *Приготовление среды.* К яичной массе добавляет 33 мл 2%-ного раствора малахитовой зелени и 1 л солевого раствора. Смесь фильтруют через марлевый фильтр, разливают в пробирки по 4-5 мл и свертывают при температуре 85°С в течение 30 мин.

1.6. Яичная среда с салицилатом натрия.

Для приготовления питательной среды с салицилатом натрия используют яичные среды, указанные выше (лучше среду Левенштейна-Йенсена). В начале готовят раствор салицилата натрия из расчета содержания 100 000 мкг салицилата в 1 мл раствора. В этих целях 500 мг вещества растворяют в 5 мл стерильной дистиллированной воды. Затем в приготовленную яичную среду (перед разливом ее в пробирки) вносят 1 мл раствора салицилата натрия на каждые 100 мл среды, смесь хорошо смешивают, фильтруют и разливают по пробиркам.

1.7. Среда ФАСТ-ЗЛ. Во флакон с лиофилизированной средой ФАСТ-ЗЛ вливают 58,3 мл стерильной дистиллированной воды с pH 6,0; энергично встряхивают и помещают в термостат с температурой нагрева 37-38°С на 30 мин с периодическим встряхиванием. Лиофилизированная среда должна полностью раствориться и представлять собой однородную жидкость светло-зеленого цвета консистенции молока.

После растворения сухой среды (30 - 40 мин) её разливают при периодическом встряхивании флакона в стерильные бактериологические про-

бирки по 5 мл и укупоривают стерильными ватно-марлевыми пробками.

Пробирки в наклонном положении помещают в аппарат Коха с температурой нагрева 85° С на 30 мин для свертывания среды. Затем пробирки в том же положении выдерживают в термостате при температуре 37-38°С в течение 18-20 часов и повторно прогревают при температуре 85°С в течение 20 мин.

1.8. Все яичные среды, приготовленные по указанным прописям, разливают в пробирки по 4-5 мл с помощью большой стерильной воронки, снабженной резиновой трубкой с зажимом и стеклянным наконечником. Затем пробирки со средами стерилизуют.

После стерилизации в пробирках должно оставаться небольшое количество конденсационной жидкости, если же её нет, то необходимо добавить в каждую пробирку (в боксе при соблюдении правил стерильности) 0,5-1 мл стерильного физиологического раствора или солевого раствора среды Гельберга, или среды Левенштейна-Йенсена.

Для контроля стерильности пробирки со средами помещают в термостат с температурой 37-38°С на 2-3 сут. На средах не должно быть роста никакой микрофлоры.

При посевах и пересевах материала и культур применяют свежие среды (2-3-недельной давности), но при условии хранения питательной среды в холодильнике в туго завязанных целлофановых пакетах ею можно пользоваться в сроки до 3 месяцев.

Для ускорения роста микобактерий на поверхность питательных сред за 1-2 сут до посевов рекомендуется наносить смесь нормальных алканов (из расчета 1 капля на 4 мл среды), т.е. жидких фракций углеводородов с содержанием молекул углерода от C_{10} до C_{22}.

Приложение № 3
к Наставлению по диагностике туберкулеза

Основные свойства видов или комплексов микобактерий

Наименование Тестов	M.tuberculosis	M.bovis	M.kansasii	M. marinum	M.ulcerans	M. scrofulaceum	M.gordonae	M.xenopi	M avium-intracellulare	M.terrae trom.-trivial	M.gastri	M.vaccae	M.fortuitum	M. chelonei	M.flavescens	M.thermoresistibile	M. phlei	M.diernhoferi	M.smegmatis
1.Скорость роста	21-60	42-70	10-30	10-30	10-20	10-20	10-20	10-20	11-30	10-30	10-20	7-8	3-7	7-8	3-7	3-7	3-7	3-7	3-7
2.Рост Т 25°С	-	-	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Т 37°С	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Т 45°С		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
3.Рост МПБ	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.Окраска	-	-	Ф	Ф	Ф	С	С	С	-	-	-	Ф/С	-	-	С	-	С	-	-
5.Гидролиз Твин-80	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.Редукция нитратов	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	±	+	-	+	-	+	±	+
7. Аккумуляция железа	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
8 Рост с сал. Натр	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	+	+	-	+	-	+	-	+
9.Активность каталазы	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+

Ф - фотохромогенная окраска (пигмент); С - скотохромогенная окраска (пигмент)

Основные свойства микобактерий

Виды микобактерий	Скорость роста из материала, сут.	Скорость роста в субкультуре, сут.	Пигментообразование	Рост на яичных средах при температуре, °С			Рост на МПБ	Рост на среде с сал. натрия	Колонии	Патогенность для лабораторных животных		
				20-22	37-38	45				морские свинки	кролики	куры
Бычий	30-60	20-30	нет	-	+	-	-	-	сухие	генерализ туберкул.	генерализ туберкул.	не патогенен
Человеческий	30-60	20-30	нет	-	+	-	-	-	сухие, шероховат.	То же	лохальн. пораж. органов	не патогенен
Птичий	15-30	10-20	нет	СК	+	+	±	+	гладкие, влажные	не патогенен	сепсис	не патогенен
Фотохромогенные (1группа)	15-30	10-20	желтый пигмент на свету	±	+	-	±	+	сплошной рост	то же	не патоген ны	то же
Скотохромогенные (2группа)	15-30	10-25	желиый на свету и в темн.	+	+	-	±	+	сплошной рост	то же	то же	то же
Нефотохромогенные (3группа)	15-20	10-25	нет	±	+	±	±	+	сплошной рост	то же	то же	иногда патогенны
Быстрорастущие (4группа)	3-10	3-5	могут образов. пигмент	±	+	±	+	+	сплошной рост	то же	то же	не патогенны

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ: «+» - рост есть; «-» - рост отсутствует; «СК» - скудный рост; «±» - некоторые культуры растут при этих условиях, другие нет

Приложение № 4
к Наставлению по диагностике
туберкулеза животных

1. Дифференциация атипичных микобактерий

1.1. При лабораторном исследовании материала от реагировавших на туберкулин животных могут быть выделены атипичные микобактерии, отличающиеся от микобактерий туберкулеза по ряду признаков. Для систематизации атипичных микобактерий пользуются группировкой Раньона, основанной, главным образом, на двух признаках: скорости роста на питательных средах и пигментообразовании, по которым их разделяют на 4 группы.

1 группа - фотохромогенные микобактерии. Вырастают в темноте (в термостате) в течение 15-30 дней. Бесцветны, но после освещения дневным или электрическим светом становятся желтыми или желто-оранжевыми. Такой же пигмент культуры приобретают, если во время роста находились на свету. К ним относятся M. kansasii и M. marinum.

2 группа - скотохромогенные микобактерии. Образуют яркооранжевый пигмент независимо от того, выращивались ли они на свету или в темноте, растут медленно - 15-30 дней. К ним относятся M. gordonae, M. scrofulaceum, M. paraffinicum.

3 группа - нефотохромогенные микобактерии. Не образуют пигмента или имеют светло-кремовую или бледно-желтую окраску. К ним относятся M. intracellulare, M. xenopi, M. terrae, M. gastri, M. triviale.

4 группа - быстрорастущие микобактерии. Образуют пигментные или беспигментные колонии, чаще R- формы. Вырастают в течение 3-10 дней. К этой группе относятся M. fortuitum, M. chelonei, M. phlei, M. diernhoferi, M. thamnopheos, M. smegmatis, M. vaccae, M. flavescens, M. peregrinum.

1.2. Дифференциацию культур проводят в 1-ой адаптивной генерации. С целью получения единичных колоний и учета скорости роста при разных температурных режимах, а также характера роста на мясо-пептонном бульо-

не, с поверхности среды берут отдельную колонию (примерно 2-5 мг) испытуемой культуры микобактерий и помещают в стерильную пробирку с 1-2 мл физиологического раствора.

Взятую массу микобактерий растирают стеклянной палочкой по стенке пробирки и добавляют физиологический раствор до концентрации I мг/мл.

Взвесь культуры микобактерий высевают с помощью пипетки диаметром 3-4 мм пять пробирок со средой Левенштейна-Йенсена и в две пробирки с мясо-пептонным бульоном. Обе пробирки с МПБ и одну пробирку со средой Левенштейна-Йенсена инкубируют при 37-38°С. По одной пробирке со средой Левенштейна-Йенсена инкубируют при 25 и 45°С. Две оставшиеся пробирки со средой Левенштейна-Йенсена, одну из которых завертывают в светонепроницаемую бумагу, а другую - подвергают освещению в течение I часа на расстоянии I м от источника света мощностью 100 Вт, ставят в термостат при 37-38°С для изучения пигментообразования.

Учет роста культур в первые 10 суток проводят один раз в 2-3 дня, в последующие три недели каждые пять дней. Учет пигментообразования проводят через 21 сутки после посева культур. При оценке регистрируют, на какой питательной среде и в какой срок появляются колонии бактерий, и какова их пигментированность.

Культуры, выросшие на среде Левенштейна-Йенсена до 7 суток, а также образовавшие в течение этого срока на мясо-пептонном бульоне кольцо или пленку, относят к 4 группе по Раньону (быстрорастущие). Культуры, выросшие в сроки свыше 7 суток, и образующие желтый, желто-оранжевый или красноватый пигмент на свету, при отсутствии его в завернутых пробирках, относят к 1 группе по Раньону (фотохромогенные).

Культуры, образующие пигмент на свету и при полном отсутствии света, относят ко 2 группе по Раньону (скотохромогенные).

Культуры, не образующие пигмента ни на свету ни в темноте, относят к 3 группе по Раньону (нефотохромогенные).

2. Выделение Л-форм микобактерий туберкулеза из патологического материала.

Исследование материала для выделения Л-форм микобактерий туберкулеза проводят при постановке первичного диагноза и в оздоравливаемых хозяйствах в случае выявления реагирующих на туберкулин животных при контрольных исследованиях.

2.1. *Для изоляции Л-форм микобактерий* используют тот же материал, что и для выделения бактериальных форм. Предпосевную обработку и посев материала осуществляют общепринятыми методами. Плотный осадок засевают вначале на яичные питательные среды, оставшуюся часть суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и пастеровской пипеткой засевают на среду Школьниковой - Дорожковой, состоящую из трех компонентов: среды Школьниковой, сахарозы и сыворотки крови.

2.1.1 *Среда Школьниковой*

Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4)	- 1,5 г.
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (Na_2HPO_4)	- 2,5 г
Магний сернокислый ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	- 0,5 г
Натрий лимоннокислый	- 1,5 г
Железо аммиачное лимоннокислое (зеленое)	- 0,05 г
Аспарагин (если Д, то берется двойная доза)	- 1,0 г
Глицерин х.ч.	- 30 мл
Агар - агар	- 3,0 г
Вода дистиллированная	- 1 000 мл

Все ингредиенты в строгой последовательности (кроме агар-агара и глицерина) растворяют в 300 мл дистиллированной воды при легком подогревании на водяной бане. Каждый новый ингредиент вносят в среду только после полного растворения предыдущего. В остальном количестве воды (700 мл) расплавляют агар-агар. Затем солевой раствор смешивают с раствором агар-агара и в него добавляют необходимое количество глицерина. Получен-

ную смесь пропускают через ватно-марлевый фильтр, тщательно промытый в дистиллированной воде, разливают в колбы по 400 мл и стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин.

2.1.2. *Сахароза.* В 100 мл дистиллированной воды растворяют 200 г химически чистой сахарозы. Раствор разливают в колбы по 50 мл и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.

2.1.3. *Нативная сыворотка крови крупного рогатого скота без консерванта.* За два дня до посева 400 мл среды № 1 расплавляют на водяной бане, охлаждают до 45-50°С и в условиях стерильного бокса добавляют по 50 мл компонентов № 2 и № 3. Готовую среду разливают в пробирки по 5 мл и помещают в термостат при 37-38°С на двое суток для контроля на стерильность.

Пробирки с посевами на этой среде устанавливают в вертикальном положении.

2.2. *Характеристика роста Л-форм микобактерий.*

На плотных средах рост появляется через 3-4 недели. Для обнаружения роста поверхность сред просматривают с помощью оптических приборов, дающих увеличение в 6-10 раз. Для Л-форм характерен рост в виде гладких, влажных, мутноватых, очень мелких колоний до 0,1 мм в диаметре, находящихся в зоне нанесения материала. Л-колонии обнаруживаются как в чистом виде, так и в смеси с типичными формами.

На среде Школьниковой-Дорожковой рост колоний обнаруживается в те же сроки в виде нежного облачка от поверхности среды до глубины 2-3 см. Наличие грубого зернистого роста, а также роста на поверхности среды в виде приставочного кольца свидетельствует о наличии бактериальных форм микобактерий. Обильное помутнение среды, часто на всю глубину, свидетельствует о загрязнении посева посторонней микрофлорой.

2.3. *Микроструктура Л-форм микобактерий*

При обнаружении на питательных средах роста, характерного для

Л-культур, готовят препараты для обычной и фазово-контрастной микроскопии. Препараты просматривают в иммерсионной системе.

В мазках окрашенных по Цилю-Нильсену обнаруживают гигантские шаровидные тела, однородные или крупнозернистые, окрашенные в буровато-красный цвет, до 60-100 мкм и более в диаметре. Иногда в мазках обнаруживают единичные, морфологически измененные кислотоустойчивые, как правило, с синими зернами, бактерии.

При фазово-контрастной микроскопии обнаруживают все структуры, характерные для Л-форм бактерий. Наиболее закономерным является наличие гетерогенной зернистой массы с включением в неё сферических тел различной величины и оптической плотности, а также отдельных гигантских шаровидных тел однородной или зернистой структуры с тонкой нежной оболочкой.

2.4. *Установление принадлежности Л-структур к микобактериям*

Доказательством принадлежности выросших Л-структур к микобактериям являются: сохранение жизнеспособности после специальной обработки кислотой; рост на специальных питательных средах; возможность реверсии в исходный микобактериальный вид.

Для реверсии Л-форм в исходный вид, выращенные колонии пересевают на среду Школьниковой - Дорожковой. На этой среде они реверсируют при первом-третьем пассажах, проводимых с интервалом от 10 дней до одного месяца. При отсутствии роста на яичных средах обращают внимание на рост Л-форм на среде Школьниковой - Дорожковой.

Культуры - ревертанты микобактерий изучают по общепринятой методике. Культурами Л-форм, не дающими реверсии, заражают морских свинок подкожно в дозе 0,5 мл. За свинками ведут наблюдение согласно соответствующему разделу настоящего наставления.

2.5. *Ускоренный способ реверсии Л-форм микобактерий (по В.С. Федосееву с соавторами, 1969)*

Для получения ускоренной реверсии используют 7-дневные куриные эмбрионы. Овоскопированием определяют место расположения зародыша. Затем, соблюдая правила асептики, заражают один эмбрион в желточный мешок Л-культурой. С помощью шприца набирают культуру со среды Школьниковой-Дорожковой. Скорлупу яйца над воздушным пространством обрабатывают спиртом, в центре прокалывают отверстие, через которое вводят культуру в дозе 0,1-0,2 мл в желточный мешок, расположенный с противоположной стороны от зародыша. Отверстие в скорлупе заливают парафином. Зараженные эмбрионы помещают в термостат с температурой 35-37°С и влажностью 60-65%.

По истечении одних суток отверстие над воздушной камерой вскрывают, пастеровской пипеткой набирают часть желтка для микроскопического исследования и высева на яичные питательные среды. Этим же материалом заражают свежие 7-дневные куриные эмбрионы в дозе 0,1-0,2 мл. Так продолжают до получения реверсии, которая наступает, начиная с 3-4 пассажа. Обнаруживают ее в окрашенных мазках, где выявляют кислотоустойчивые палочки. Типичные колонии возбудителя на яичных средах появляются на 12-14 сут, в зависимости от вида микобактерий.

Для определения вида микобактерий туберкулеза проводят постановку биопробы согласно разделу 6.5.

Приложение № 5
к Наставлению по
диагностике туберкулеза

Исследование проб объектов внешней среды на наличие микобактерий

Исследования проводят для выявления источника сенсибилизации животных в хозяйствах, где выявлены атипичные микобактерии.

1. *Отбор проб.*

Пробы сена, соломы, концентрированных кормов, торфа, почвы, опилок, воды, смывы с поверхности различных предметов помещают в стерильную посуду. В лабораторию направляют среднюю пробу массой до 200 г, которую составляют из хорошо перемешанных проб данной партии, емкости и т.п.

Пробы почвы (земли, навоза, торфа) берут на глубине до 15 см лопаткой в 3-5 местах по 50-100 г, из них составляют среднюю пробу, которую помещают в широкогорлую банку или полиэтиленовый пакет.

Первичные пробы грубых кормов (сена, соломы) берут из разных мест скирды (стога) при помощи ножниц и пинцета из расчета 1 проба массой не менее 40 г на 4 $м^2$ площади скирды.

Корнеплоды (клубнеплоды) в зависимости от величины отбирают из расчета 1-3 шт на 4 $м^2$ площади бурта, отсека хранилища. С отобранных корнеплодов скальпелем срезают поверхностный слой в местах, где имеются остатки земли.

Пробы силоса, хранящегося в ямах, отбирают как и пробы почвы, а вынутого из траншеи - как пробы зеленой массы.

Пробы зернофуража берут из поверхностных слоев со стороны устья мешка (совочком, шпателем) и из нескольких мест с боков и снизу (металлическим щупом). Отобранную навеску (500-1000 г) помещают в стерильную банку (полиэтиленовый мешочек).

Первичные пробы фуража, хранящегося насыпью в закромах, открытых ларях, ящиках и пр., массой не менее 100 г отбирают из расчета 1 проба на 4 $м^2$ поверхности, но не менее 5 из каждого закрома, партии, как из поверхностных, так и из глубоких слоев корма, равномерно по всему объему.

Из брикетированного комбикорма вынимают отдельные, соприкасающиеся с тарой брикеты, срезают их поверхностный слой и помещают в стерильную банку.

При отборе проб травы её срезают ножницами или скальпелем и пинцетом помещают в стеклянные банки, которые плотно закрывают.

Пробы воды из естественных и искусственных водоемов берут у поверхности (на глубине 10-15 см) и у дна при помощи батометра или специально приспособленной бутыли с грузом. Объем каждой пробы - не менее 0,5 л, общий объем - не менее 1 л. Кроме того, берут пробы придонного осадка у береговой кромки, которые исследуют как пробы почвы.

Из шахтных колодцев пробы воды берут чистым ведром или другой посудой после перемешивания воды в колодце многократным погружением ведра. Из водопроводного крана набирают в стерильную посуду около 0,5 л воды, а затем в течение 5-10 мин спускают застоявшуюся в трубах воду. После этого край обжигают горящим спиртово-ватным тампоном, набирают в другую стерильную посуду еще около 0,5 л воды.

Первичные пробы торфа, опилок, навоза (100 г каждая) отбирают из расчета 1 проба на 4 $м^2$ поверхности, но не менее 5 проб для каждой партии. Первичные пробы берут из поверхностных и глубоких слоев торфа или опилок равномерно по всей площади.

Отбор проб торфа, хранящегося в мешках, проводят так же, как проб зернофуража. С открытых поверхностей различных предметов ухода за животными, стен, пола, кормушек животноводческих помещений делают соскобы, а из автопоилок пробы берут при помощи тампонов.

На всех пробах указывают наименование хозяйства (фермы), место и дату отбора. Пробы доставляют в лабораторию в день отбора, их исследование проводят не позднее чем через 3 сут после получения.

2. *Обработка проб*

Предварительную обработку проб из объектов внешней среды проводят по методу А. П. Аликаевой. Навеску исследуемого материала массой 5-10 г измельчают, помещают в ступку, заливают физиологическим раствором так, чтобы материал был покрыт раствором, перемешивают и оставляют при ком-

натной температуре на 20-30 мин. Затем массу пропускают через 2-слойный марлевый фильтр, фильтрат переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 5-10 мл 4%-ного раствора едкого натрия, перемешивают и снова центрифугируют в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 5-10 мл 10%-ного раствора соляной кислоты, перемешивают и вновь центрифугируют при тех же параметрах. Надосадочную жидкость сливают, а из осадка делают посевы на яичные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2, не менее 5 пробирок каждой среды.

Смывы с различных предметов и сперму обрабатывают по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши.

Яйца перед исследованием инкубируют в термостате при 37-38°С в течение 2 сут, после чего содержимое обрабатывают по методу Гона-Левенштейна-Сумиоши.

Посевы, их дальнейшую обработку, инкубацию и изучение свойств выращенных микобактерий осуществляют по общепринятой методике.

3. *Изучение сенсибилизирующих свойств атипичных микобактерий*

Для подтверждения причины реакций на туберкулин в благополучных по туберкулезу хозяйствах изучают сенсибилизирующие свойства атипичных микобактерий, выделенных из послеубойного материала от крупного рогатого скота.

Культуру атипичных микобактерий вводят подкожно 2-м морским свинкам в дозе 1 мг/мл. Спустя 21-30 дней после введения культуры их исследуют симультанной аллергической пробой с КАМ. ППД - туберкулин для млекопитающих в дозе 25 ТЕ и КАМ в дозе 10 ЕД в объеме 0,1 мл физиологического раствора или растворителя вводят внутрикожно с левой и правой стороны в депиллированные участки кожи на боках животного. Реакцию учитывают через 24-48 ч. Положительная реакция проявляется гиперемией кожи и образованием припухлости диаметром 5 мм и более, иногда с некрозом в

центре. Обнаружение реакции на один или оба препарата свидетельствует о сенсибилизирующих свойствах изучаемой культуры. После проведенного аллергического исследования животных убивают.

Приложение № 6
к Наставлению по диагностике
туберкулеза

Меры безопасности при работе с патологическим материалом и культурами микобактерий

1. Весь материал, поступающий в лабораторию для исследования, следует рассматривать как инфицированный. При работе с материалом и культурами обязательно строгое соблюдение мер, предотвращающих опасность заражения работающих и исключающих возможность выноса возбудителя инфекции за пределы лаборатории.

2. При распаковке поступившего материала необходимо соблюдать осторожность: банки, содержащие материал для исследования, при получении обтирают снаружи дезинфицирующим раствором и ставят на поднос или в кювету. Работать с патологическим материалом необходимо в резиновых перчатках и пользоваться при этом инструментами (пинцетами, корцангами, ножницами и др.). Прикасаться к исследуемому материалу непосредственно руками запрещается. После исследования биоматериал автоклавируют или сжигают.

3. Посевы биоматериала на питательные среды и пересевы культур микобактерий проводят в боксе. Для этого в боксе необходимо иметь стол металлический (или покрытый металлом) и шкаф для хранения запаса питательных сред, физиологического раствора, штативов и других предметов.

На столе располагают две газовые горелки или спиртовки, шпатели, подставку для их прокаливания, стерильные пастеровские пипетки, банку с ватой, карандаши или чернила по стеклу, банку с предметными стеклами,

ножницы, пинцеты, скальпели в фарфоровом стакане, ватные тампоны в банке с притертой пробкой, банки с 5%-ным раствором хлорамина для отработанных пипеток и инструментов. Для работы в боксе необходимо иметь кроме основной спецодежды специальный халат, маски, защитные очки, хирургические перчатки.

4. Перед работой бокс облучают бактерицидными лампами в течение 1-2 часа из расчета 1,5-2,5 Вт на 1м^3 помещения. После облучения входить в бокс можно только через 30-60 мин.

Работу с патологическим материалом и культурами проводят над кюветой. Для горения в спиртовке используют спирт-ректификат.

Посевы и пересевы производят петлей или пастеровской пипеткой над пламенем горелки. После посева петлю и нижнюю часть петледержателя прожигают сначала в нижней, затем в верхней трети пламени, а пастеровские пипетки помещают в банку в 5%-ным раствором хлорамина.

При проведении посевов из материала и пересевов культур пастеровскими пипетками насасывать жидкости следует с помощью резиновой груши или шланга. Насасывание жидкости ртом запрещается.

5. После окончания исследований отработанные посевы (в пробирках, чашках, ступках и др.), кусочки органов или суспензии органов, взятые для заражения лабораторных животных, обеззараживают автоклавированием при 1,5 атм в течение 1 ч. Использованные пипетки, стекла, инструменты и бывшую в употреблении посуду сначала обеззараживают 5%-ным раствором хлорамина, затем кипячением в течение 30 мин в растворе соды. Рабочий стол тщательно дезинфицируют 1%-ным раствором хлорамина. Руки дезинфицируют 5%-ным раствором хлорамина, потом тщательно моют теплой водой с мылом.

6. Зараженных лабораторных животных помещают в клетки и содержат в закрытом изолированном помещении. На клетки прикрепляют этикетки с

указанием номера экспертизы, даты заражения, наименования материала или культуры и числа зараженных животных.

Уборку в клетках необходимо проводить ежедневно. При этом удаленные из клеток навоз и остатки корма складывают в специальный бак, после чего моют поилки и кормушки. Собранные в клетках остатки корма и навоз сжигают в специальной печи.

После окончания уборки персонал, обслуживающий животных, сначала дезинфицирует перчатки, не снимая с рук, затем снимает их и опускает в банку с дезраствором и только после этого снимает с себя спецодежду, дезинфицирует и моет руки.

7. Трупы лабораторных животных из вивария во влагонепроницаемой таре переносят во вскрывочную. Для вскрытия трупы помещают в кюветы. Перед вскрытием кожный покров животного увлажняют спиртом при помощи ватного тампона и обжигают или смачивают 5%-ным раствором хлорамина. После окончания вскрытия трупы сжигают в печи. Стол и инструменты дезинфицируют.

Лицензия ЛР № 021238 от 22.08.97.

Подписано в печать 19.02.2004 г.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Бумага 60х84 1/16
Усл.печ.л. 4,0 Тираж 500 экз. Заказ 33

111621, г. Москва, ул. Оренбургская, 15
Отдел оперативной полиграфии
ФГУП «ВО Минсельхоза России»

gost.e-ecolog.ru