ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРОПРОМЫШЛЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОИ ЯЗВЫ У ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ, ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ В СЫРЬЕ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

(методические указания)

МОСКВА ВО "АГРОПРОМИЗДАТ" 1989

gost.e-ecolog.ru

УДК 616-07.616.981.51 (083.131)

Редактор Г. А. Зайцева

Методические указания разработаны Ю. А. **Малаховым**, Н. Г. **Ипатенко**, Н. Т. **Татаринцевым**, докторами ветеринарных наук; А. А. **Маничевым**, кандидатом ветеринарных наук (Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов); Б. Л. **Черкасским**, доктором медицинских наук; А. Г. **Кнопом**, кандидатом медицинских наук (Институт эпидемиологии АМН СССР); В. А. **Гавриловым**, А. В. **Никитиным**, кандидатами ветеринарных наук (Всесоюзный научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии); А. А. **Харькевичем** (Всесоюзный научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко); Б. И. **Антоновым** (Центральная ветеринарная лаборатория); В. А. **Седовым**, кандидатом ветеринарных наук (Госагропром СССР); Ю. И. **Соркиным**, кандидатом медицинских наук (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока); Н. П. **Буравцевой**, кандидатом медицинских наук (Научно-исследовательский противочумный институт Кавказа и Закавказья).

Утверждены Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР и Главным управлением карантинных инфекций Минздрава СССР (утв. 01 сентября 1986 г.).

С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают силу "Методические указания по лабораторной диагностике сибирской язвы" (утв. 7 мая 1979 г.), "Методические указания по обнаружению возбудителя сибирской язвы в сырье животного происхождения и объектах внешней среды" (утв. 1 ноября 1979 г.), "Временные методические указания по постановке реакции дискпреципитации при диагностике сибирской язвы и идентификации ее возбудителя" (утв. 24 июня 1980 г.), в "Инструкции и методических указаниях по лабораторной, клинической диагностике, профилактике и лечению сибирской язвы у людей" (утв. 15 июля 1980 г.) раздел "Лабораторные исследования при сибирской язве".

Предназначены для специалистов ветеринарных лабораторий санэпидстанций, ветеринарных и медицинских врачей, научных работников.

Ответственные за выпуск: В. А. **Седов** (Главное управление ветеринарии Госагропрома СССР); А. А. **Маничев** (лаборатория контроля и стандартизации анаэробных и сибиреязвенных препаратов ВГНКИ).

© Государственный агропромышленный комитет СССР, 1989

1. ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ У ЖИВОТНЫХ И ЛЮДЕЙ

1.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1.1. Сибирская язва — острое инфекционное заболевание животных и человека, вызываемое Bac. anthracis, которая относится к роду Bacillus семейства Bacillaceae. Возбудитель сибирской язвы — неподвижная грамположительная палочка, in vitro образует спору, а в организме восприимчивых животных и человека — капсулу и специфический экзотоксин, не обладает фосфатазной активностью, чувствительна к пенициллину, лизируется специфическими бактериофагами, патогенна для лабораторных животных.

1.1.2. Исследование на сибирскую язву осуществляют при помощи микроскопии мазков из исходного патологического материала, высевов на питательные среды, постановки биопробы и при необходимости реакции преципитации, а у человека, кроме того, проведения антраксиновой пробы.

1.2. ВЗЯТИЕ И ПЕРЕСЫЛКА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.2.1. Взятие патологического материала от животных.

Для исследования в лабораторию направляют ухо, перевязанное у основания, или мазок крови, полученной из надреза уха; от трупов свиней — участки отечной соединительной ткани и заглоточные, подчелюстные, а также другие лимфатические узлы, в которых имеются характерные патологоанатомические изменения.

Ухо отрезают с той стороны, на которой лежит труп. Предварительно его туго перевязывают шпагатом у основания в двух местах и отрезают между перевязками. Место отреза уха на трупе прижигают.

Если подозрение на сибирскую язву возникло при вскрытии трупа животного (кроме трупов свиней), вскрытие прекращают и на исследование направляют часть селезенки.

Взятие материала от вынужденно убитых животных и его исследование проводят в соответствии с ГОСТ 21237—75 "Мясо. Методы бактериологического анализа" и действующими "Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов".

1.2.2. Взятие материала от человека. При кожной форме болезни исследуют содержимое везикул, карбункулов, отделяемое язвы или отторгнутый струп. Перед взятием материала у больного (желательно до начала лечения) нужно осторожно очистить спиртом кожу вокруг пораженного места и поверхность карбункула.

В случаях септической формы берут 1 мл крови из вены, желательно в период лихорадки. Кровь (1—2 капли) высевают на питательные среды, а также из нее делают два тонких мазка на предметных стеклах.

У умерших берут части пораженных органов, тканей и обязательно кровь, селезенку.

1.2.3. Направление патологического материала на исследование. Патологический материал, подлежащий исследованию, помещают в чистую посуду (пробирки, банки). Высушенные мазки кладут в чашки Петри, которые обертывают плотной бумагой. На упаковке делают надпись "Мазок нефиксирован!".

Посуду с патологическим материалом помещают во влагонепроницаемую тару, обвязывают, пломбируют или опечатывают, делают надпись "Верх, осторожно!" и направляют в лабораторию с нарочным.

Сопроводительные документы к патологическому материалу от животного заполняют в соответствии с требованиями "Ветеринарного законодательства".

На сопроводительной этикетке к патологическому материалу от человека указывают фамилию, имя, отчество больного (умершего), место и время взятия патологического материала, его наименование и предположительный диагноз.

1.3. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

В лаборатории проводят микроскопическое исследование исходного патологического материала, делают посевы на питательные среды, заражают лабораторных животных, при необходимости ставят реакцию преципитации, идентифицируют выделенные культуры.

Если ухо животного доставлено обескровленным, его обязательно исследуют и по реакции преципитации.

В случае доставки загнившего патологического материала его исследуют только по реакции преципитации.

1.3.1. Микроскопическое (предварительное) исследование.

1.3.1.1. Из доставленного патологического материала делают мазки, фиксируют этиловым спиртом с добавлением 3 % перекиси водорода (приложение, п. 1), окрашивают по Граму и на капсулу — по Ребигеру, Михину, Ольту или Романовскому-Гимзе; при наличии люминесцирующих сывороток используют метод флуоресцирующих антител.

1.3.1.2. В мазках, окрашенных по Граму, Bac. anthracis — грамположительная палочка (прямая). Палочки располагаются короткими цепочками или попарно, концы их, обращенные друг к другу, резко обрублены, свободные концы обычно закруглены. В отдельных случаях (чаще в мазках от человека или свиней) форма микробов сибирской язвы может быть нехарактерной (короткие толстые или изогнутые, иногда зернистые палочки со вздутием посередине или на конце, возможно наличие "теней" микробов).

1.3.1.3. В окрашенных специальными методами мазках из свежего патологического материала сибиреязвенные палочки окружены капсулой, из несвежего — микробы несколько увеличены, концы их закруглены, морфологическая стройность бацилл нарушена (они как бы изъедены), иногда отмечаются "тени", а вместо капсул — слабоокрашенные обрывки.

1.3.1.4. Обрабатывают препараты люминесцирующими сыворотками в соответствии с наставлением по их применению.

Обнаружение в мазке специфического свечения позволяет подозревать наличие в исследуемой пробе возбудителя сибирской язвы.

По результатам микроскопического исследования немедленно дают предварительный ответ.

1.3.2. Посев на питательные среды.

1.3.2.1. Посевы из исходного патологического материала делают в мясо-пептонный бульон (МПБ) и на мясо-пептонный агар (МПА) или бульон и агар Хоттингера (pH 7,4 ± 0,2). Одновременно можно делать посевы на дифференциально-диагностическую среду с 0,01 % фенолфталеинфосфата натрия (приложение, п. 2), желатин, кровяной бульон и агар.

Посевы инкубируют 18—24 ч при температуре 37 ± ± 1 °С и при отсутствии роста выдерживают при той же температуре еще 48 ч.

Из свежего патологического материала можно одновременно делать посевы в систему для постановки реакции диск-преципитации (приложение, п. 3). При этом посев проводят пастеровской пипеткой в мясо-пептонный бульон, находящийся над слоем агарового геля. Не следует вносить в среду большое количество крови или крупные кусочки кровенаполненных органов, так как это затрудняет обнаружение специфического диска преципитации вследствие окрашивания геля. С посевами посту-

пают, как указано в п. 2.5. Полученные результаты оценивают, как и при реакции преципитации, поставленной общепринятым методом.

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

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

1.3.2.3. На плотных питательных средах возбудитель сибирской язвы образует плоские матово-серые шероховатые (R-форма) колонии. Центр их иногда затемнен, периферия бахромчатая с локонообразными отростками. Встречаются колонии с менее выраженной шероховатостью и без отростков, которые также подлежат дальнейшей идентификации.

Под малым увеличением микроскопа (в 10—60 раз) колонии имеют вид локонов, состоящих из сплетений длинных нитей микробов, получивших название "головы медузы", "львиной гривы".

Культуры, выросшие на дифференциально-диагностической среде, обрабатывают парами аммиака (приложение, п. 2) и для дальнейшего исследования отбирают только бесцветные колонии.

При посеве уколом в столбик 10—12 %-ной желатины бациллы на вторые—пятые сутки образуют в ней желтовато-белый стержень. От него под прямым углом отходят нежные боковые отростки — от коротких к более длинным

по мере приближения к поверхности среды (лучшие условия аэрации), что напоминает перевернутую елочку. Постепенно верхний слой желатины разжижается, принимая сначала форму воронки, затем мешочка.

Гемолиз в бульоне с кровью происходит очень медленно, на кровяном агаре он, как правило, не наблюдается.

1.3.2.4. При получении смешанной культуры возбудителя сибирской язвы выделяют путем дробного рассева на плотные питательные среды в чашках Петри, отсева отдельных колоний, заражения белых мышей.

Из шероховатых колоний, выросших на плотной питательной среде, а также из бесцветных колоний на дифференциально-диагностической среде делают мазки и пересев в МПБ и на МПА для дальнейшей их идентификации.

Изучаемые культуры вместо МПБ можно пересевать в систему для постановки реакции диск-преципитации. В этом случае дальнейшую работу проводят только с культурами, давшими положительные или нечеткие результаты (приложение, п. 3).

1.3.3. Биологическое исследование (биопроба).

1.3.3.1. Исследуемый патологический материал (в день поступления) суспендируют в небольшом объеме 0,9 %-ного раствора натрия хлорида, вводят двум белым мышам в дозе 0,2—0,5 мл под кожу спины ближе к корню хвоста или 0,5—1,0 мл двум морским свинкам подкожно в области живота. Гибель зараженных животных наступает через одни—трое суток, иногда позже.

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

1.3.3.3. При биологическом исследовании необходимо учитывать, что лабораторные животные, зараженные суспензией из патологического исходного материала свиней,

могут погибнуть от сопутствующей патогенной микрофлоры, чаще пастерелл. В этих случаях бактериологическое исследование на сибирскую язву продолжают и проводят повторное заражение животных выделенными культурами, имеющими культуральные свойства, характерные для Bac. anthracis.

1.3.3.4. В случаях, если чистая культура возбудителя из посевов исходного патологического материала на питательные среды получена до наступления гибели лабораторных животных, зараженных суточной бульонной культурой, заражают дополнительно двух мышей или морских свинок в дозах, указанных в п. 1.3.3.1.

1.3.3.5. Наблюдение за лабораторными животными, зараженными суспензией из исходного патологического материала или культурой возбудителя, ведут в течение десяти суток.

1.3.4. Реакция преципитации.

1.3.4.1. Перед постановкой реакции свежий патологический материал предварительно выдерживают в термостате в течение 18—20 ч, несвежий экстрагируют сразу.

1.3.4.2. Экстрагирование проводят горячим и холодным способами. При этом следует учитывать, что в экстрактах, полученных горячим способом, меньше преципитиногенов.

Горячий способ: кусочки исследуемого патологического материала (1—2 г) помещают в пробирку или колбу, заливают 0,9 %-ным раствором натрия хлорида в соотношении 1:10 и кипятят 30—40 мин в водяной бане.

Холодный способ: кусочки патологического материала (1—2 г) растирают в ступке с песком, переносят в колбу или баночку, заливают 0,9 %-ным раствором натрия хлорида (с добавлением 0,3 % кристаллического фенола) в соотношении 1:10 и оставляют на 16—18 ч при температуре 20 ± 2 °С.

Полученные экстракты фильтруют через асбестовую

вату до прозрачного состояния, причем первые капли фильтрата удаляют.

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

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

Если при соединении компонентов резко выраженная граница между ними отсутствует, реакцию ставят повторно.

Одновременно ставят контроль преципитирующей сибиреязвенной сыворотки со стандартным сибиреязвенным антигеном. При положительной реакции в течение 1—2 мин после соединения компонентов появляется характерное кольцо.

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

При отрицательном результате реакции преципитации с экстрактом, полученным горячим способом, реакцию ставят повторно с экстрактом, полученным холодным способом.

1.3.5. Идентификация возбудителя сибирской язвы.

1.3.5.1. Идентификацию возбудителя сибирской язвы проводят по следующим признакам:

морфология микроба, включая наличие капсул в мазках из исходного патологического материала или органов павших подопытных животных;

культуральные свойства;

патогенность для лабораторных животных (гибель хотя бы одного из двух лабораторных животных, зараженных суспензией из исходного патологического материала или полученной культурой возбудителя, с последующим выделением ее из органов мыши или морской свинки).

При наличии в мазках характерных морфологических и культуральных свойств и капсул из исходного патологического материала дальнейшее изучение культуры не проводят.

В случае получения нечетких результатов по одному из двух первых свойств, не дожидаясь результатов биопробы, определяют чувствительность культуры к сибиреязвенному бактериофагу и пенициллину.

1.3.5.2. Чувствительность к сибиреязвенному бактериофагу.

Фаготипирование проводят одним из следующих методов: стекающей капли, пробирочным или микрометодом с использованием сибиреязвенных бактериофагов "К"-ВИЭВ и "Гамма-МВА" в соответствии с наставлениями по применению указанных фагов.

1.3.5.3. Чувствительность к пенициллину (тест "жемчужного ожерелья"). Агар с пенициллином (приложение, п. 4) и без него разливают в чашки Петри и после застывания пробиркой с ровными краями делают насечки агара или вырезают пластинки (1,5 × 1,5 см), которые переносят на предметные стекла и помещают в чашки Петри.

На каждую пластинку бактериологической петлей наносят трехчасовую бульонную культуру. Чашки Петри закрывают крышками и помещают в термостат. Через 1—3 ч посевы просматривают под микроскопом с сухой (объектив × 40) и иммерсионной системами. Перед просмотром зону роста культуры накрывают покровным стеклом. Сибиреязвенные микробы на МПА с пенициллин-

ном принимают шаровидную форму, а цепочки имеют вид жемчужного ожерелья. Спорообразующие сапрофитные аэробные микробы в аналогичных условиях вырастают в виде обычных форм. На агаре без пенициллина сибиреязвенные микробы образуют длинные цепочки, состоящие из типичных палочек.

При отрицательном результате микроскопии инкубацию посевов продолжают до 6 ч, после чего исследуют повторно и делают заключительный учет теста.

Выделенную культуру относят к Bac. anthracis при наличии капсул в мазках из исходного патологического материала или органов павшего зараженного животного и других характерных морфологических культуральных свойств возбудителя; при отсутствии капсул, но наличии других характерных морфологических и культуральных свойств возбудителя, чувствительности его к сибиреязвенному фагу и пенициллину.

1.4. КОЖНАЯ АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ПРОБА С АНТРАКСИНОМ

Проба основана на способности организма больного и переболевшего человека отвечать аллергической реакцией в виде гиперемии кожи и образования инфильтрата на месте введения препарата. Реакция может появляться уже с первых дней заболевания, но у подавляющего числа больных она наблюдается на 5—7-е сутки заболевания.

1.4.1. Реакцию ставят на внутренней поверхности верхней трети предплечья: 0,1 мл антраксина при помощи шприца с тонкой иглой вводят строго внутрикожно с соблюдением правил асептики. В кожу другого предплечья (в качестве контроля) вторым шприцем с тонкой иглой инъецируют такое же количество стерильного 0,9 %-ного раствора натрия хлорида.

Реакцию учитывают через 24 и 48 ч в соответствии с наставлением по применению препарата.

1.4.2. Положительную антраксиновую пробу не принимают во внимание у лиц, вакцинированных против сибирской язвы в течение предшествовавших 12 мес или переболевших ею.

1.4.3. Получение положительной пробы с антраксином не исключает необходимости обязательного бактериологического исследования больного, а также предполагаемого источника и факторов передачи.

1.5. ВЫДАЧА ЗАКЛЮЧЕНИЯ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.5.1. Диагноз сибирской язвы у животного считают установленным в одном из следующих случаев:

гибели хотя бы одного лабораторного животного из двух, зараженных суспензией из исходного патологического материала, с последующим выделением из его органов культуры Bac. anthracis даже при отсутствии роста культуры возбудителя из патологического материала;

получения положительной реакции преципитации при исследовании загнившего исходного патологического материала;

получения положительной реакции преципитации при наличии характерной клинической картины и патологических изменений у свиней даже при отсутствии культуры возбудителя в высевах из исходного патологического материала и отрицательном результате биопробы.

1.5.2. Диагноз сибирской язвы у человека считают установленным при наличии соответствующей клинической картины, эпидемиологического анамнеза, подтвержденных одним из перечисленных способов:

выделения из патологического материала культуры Bac. anthracis и гибели хотя бы одного из двух зараженных

лабораторных животных и выделением из его органов культуры со свойствами, характерными для возбудителя сибирской язвы;

гибели хотя бы одного лабораторного животного из двух, зараженных исходным материалом, с последующим выделением из его органов культуры Bac. anthracis;

выделения вирулентной культуры Bac. anthracis из предполагаемого источника или фактора передачи;

положительной антраксиновой пробы.

1.6. СРОКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроскопического — в день поступления материала, бактериологического — до трех суток, биологического — до десяти суток.

2. ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В СЫРЬЕ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

2.1. ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования объектов внешней среды и сырья животного происхождения проводят:

при необходимости установить или подтвердить источник или фактор передачи возбудителя инфекции животному или человеку;

для выявления обсемененности возбудителем сибирской язвы отдельных объектов в случаях, предусмотренных соответствующими инструкциями;

в целях обнаружения возбудителя сибирской язвы в местах старых скотомогильников при строительных, мелиоративных, гидротехнических и других работах, связанных с выемкой и перемещением грунта;

для подтверждения результатов исследования шкурок мерлушки и козлика в случаях положительной реакции преципитации.

2.2. ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1. Отбор проб шерсти. Для бактериологического исследования берут из разных мест упаковки не менее пяти образцов массой около 2 г каждый (лучше брать пучки загрязненной шерсти). Если шерсть упакована в кипы, берут не менее десяти образцов из разных мест каждой кипы, а также свернувшуюся внутри обшивки пыль. Образцы от одной кипы объединяют и упаковывают вместе.

2.2.2. Отбор проб кожевенно-мехового сырья. Для исследования берут кусочки размером 3×3 см с периферических незагнивших и незаплесневевших участков шкурок рядом с местами, откуда брали пробы для контрольного исследования. При наличии на внутренней стороне шкурки кровоподтеков или инфильтратов пробы берут и из этих мест.

2.2.3. Отбор проб кормов. Концентрированные корма (зерно, отруби, комбикорм) отбирают в зависимости от условий их хранения.

При наличии незатаренных кормов первичные пробы отбирают из расчета одна проба массой не менее 10 г на 4 $м^2$ поверхности, но не менее пяти проб от каждого закрома, партии. Первичные пробы берут как из поверхностных, так и из глубоких слоев корма равномерно по всей площади.

При наличии затаренных кормов отбор проб проводят согласно следующей таблице.

Пробы отбирают сухим стерильным пробным щупом. После взятия проб от каждого объекта (партии) щуп очищают и обжигают огнем паяльной лампы.

Число упаковочных единиц	От какого числа упаковочных единиц отбирают пробы
До 10	От каждой упаковочной единицы
От 11 до 100	От 10 упаковочных единиц
От 101 и больше	От 10 упаковочных единиц и дополнительно по 3 от каждых 100 упаковочных единиц

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

Собранную зеленую массу берут, как и грубые корма, увеличив массу первичной пробы до 100 г.

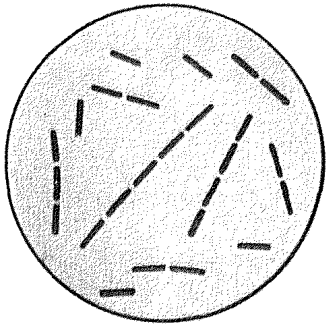
Корнеплоды (клубнеплоды) в зависимости от величины отбирают из расчета одна—три штуки на 4 $м^2$ площади бурта, отсека. С отобранных корнеплодов скальпелем в местах, где имеются остатки земли, срезают поверхностный слой, который используют для исследования.

Пробы силоса, хранящегося в ямах (траншеях), отбирают, как и пробы почвы (п. 2.2.4), вынутого из траншеи — как пробы зеленой массы.

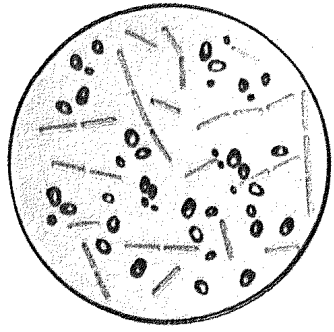
В лабораторию направляют среднюю пробу, которую составляют из хорошо перемешанных первичных проб данной партии, емкости и т. п. Масса средней пробы должна быть не более 500 г.

2.2.4. Отбор проб почвы. Обследованию подлежат участки, подозреваемые в обсеменении возбудителем сибирской язвы. Обследуемую площадь разбивают на квадратные участки (сторона каждого не более 4 м). Почвенным буром отбирают пробы почвы массой 20—30 г по углам и в центре каждого участка.

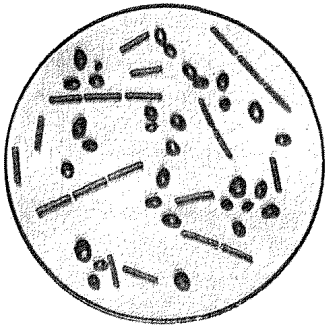
Пробы почвы с территории, подозреваемой в поверх-



I

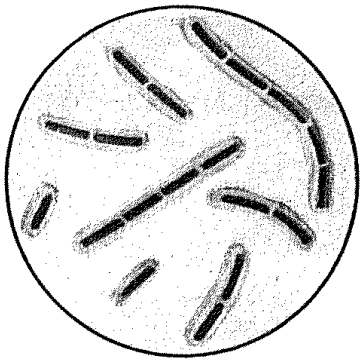


II

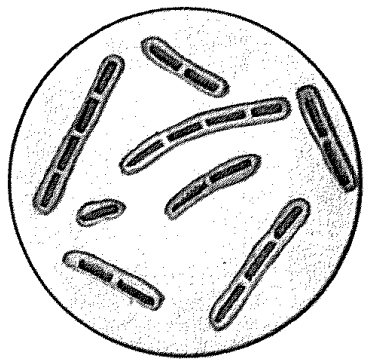


III

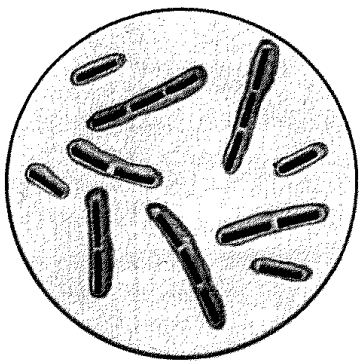
I. Культура Bac. anthracis с МПБ. Окраска по Граму
II. Споры Bac. anthracis. Окраска по методу Пешкова
III. Споры Bac. anthracis. Окраска по методу Шеффера и Фултона



а

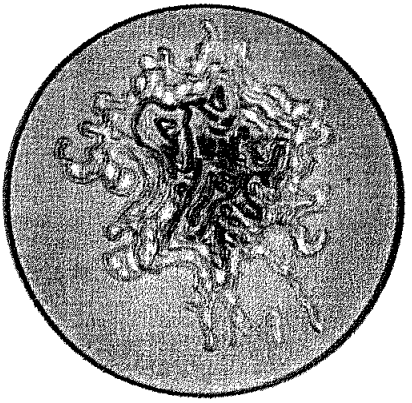


б

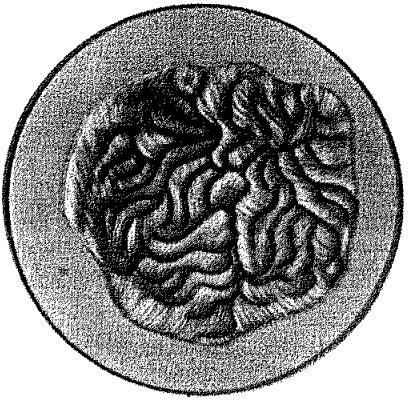


в

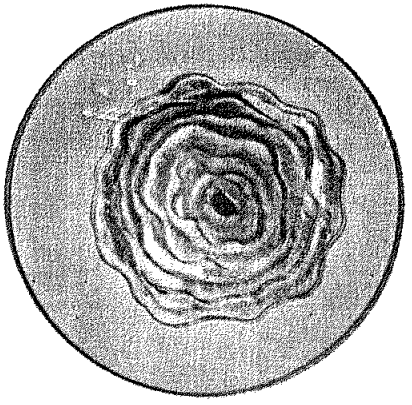
Культура Bac. anthracis:
а — окраска по Ольту; *б* — окраска по Михину; *в* — окраска по Ребигеру



а

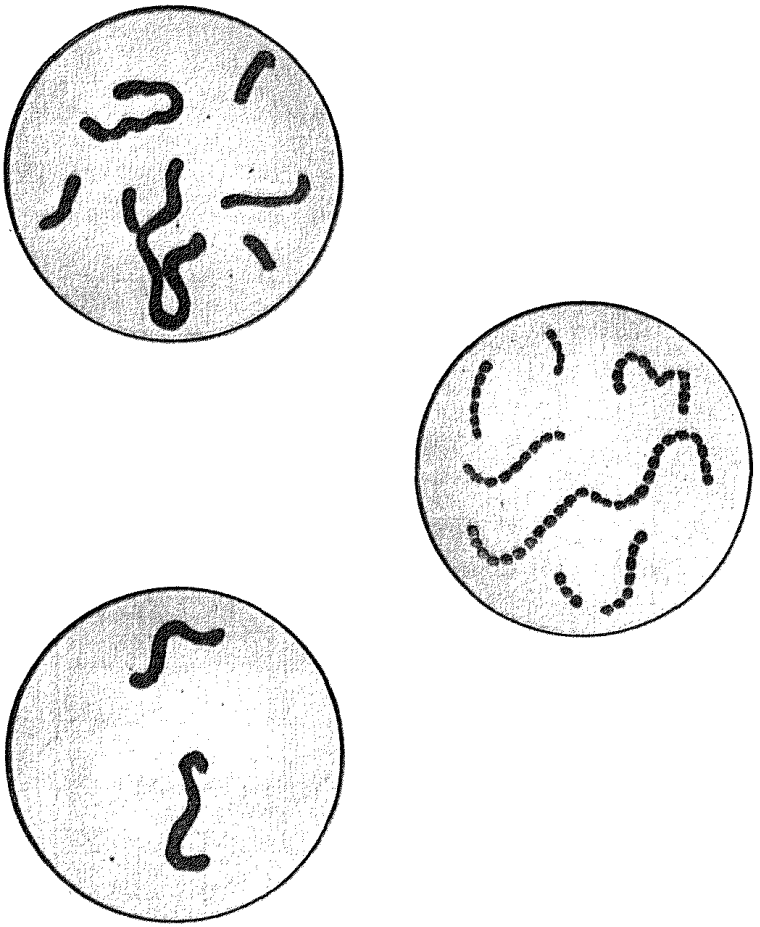


б

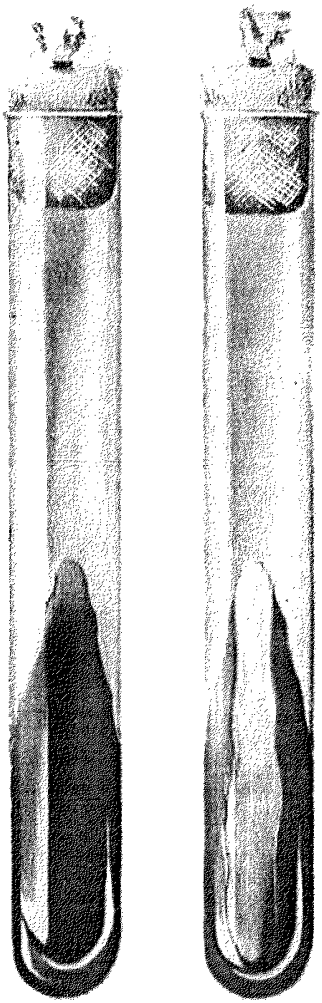


в

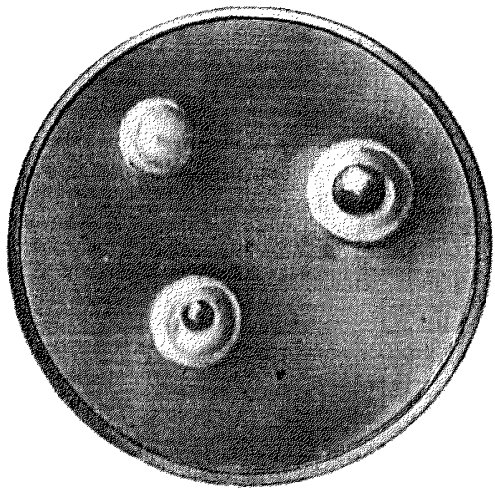
Рост бацилл сибирской язвы:
а — колония R-формы; *б* — колония S-формы; *в* — колония RO-формы



Морфологически измененные формы Bac. anthracis, выделенные из подчелюстных лимфатических узлов свиней. Окраска по Граму

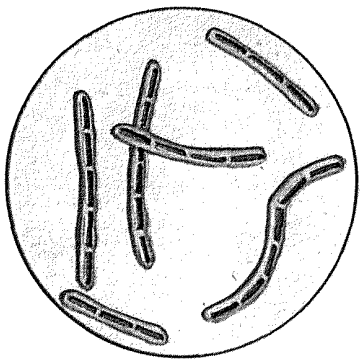


а

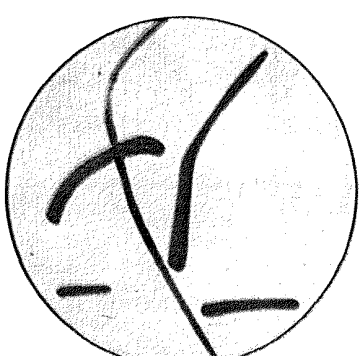


б

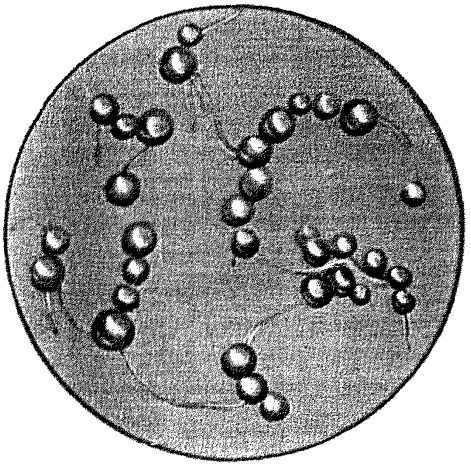
Проба с бактериофагом:
а — в пробирках — метод стекающей капли; *б* — в чашках Петри — микрометод

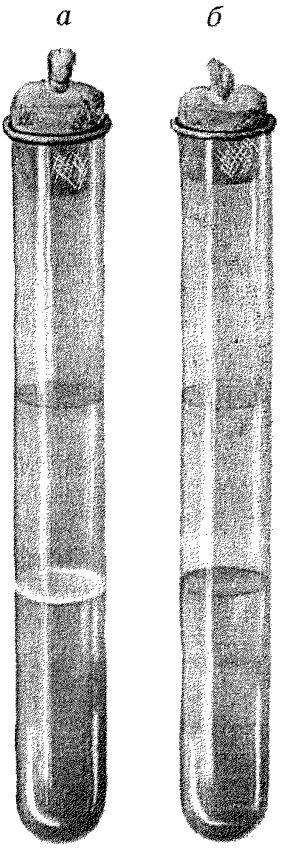


Сибиреязвенные бациллы (крупные палочки) и бациллы псевдоантракса (по Н. А. Кузьмину)

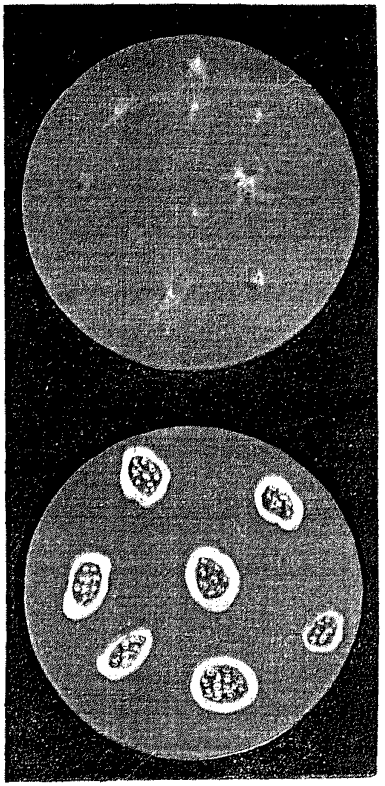


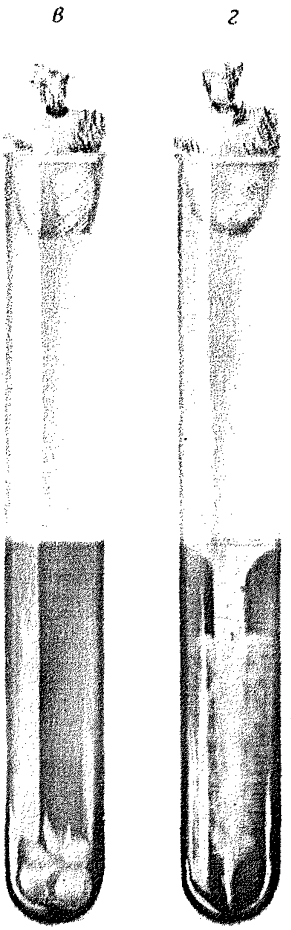
Специфическое свечение сибиреязвенных бацилл, обработанных мечеными глобулинами преципитирующей сибиреязвенной сыворотки





Реакция "жемчужного ожерелья" в чашке Петри
Реакция преципитации в пробирках:
а — положительная (белое кольцо на месте соприкосновения двух жидкостей); *б* — отрицательная (кольца нет)





Рост бацилл:
на кровяном агаре
а — Bac. anthracis; *б* — Bac. anthracoides
в пробирках
в — в мясо-пептонном бульоне; *г* — в мясо-пептон-желатине

ностном обсеменении возбудителем сибирской язвы, берут на глубину до 15 см.

Перед взятием проб на территории скотомогильников верхний слой почвы на месте взятия пробы снимают на 2—3 см и пробу берут на глубину до 2 м через каждые 25 см.

Вынутую из глубины и не использованную для проб почву с целью обеззараживания смешивают с сухой хлорной известью, содержащей 25 % активного хлора, в соотношении одна часть хлорной извести на три части почвы, слегка увлажняют и сбрасывают в шурф. Место отбора проб дезинфицируют раствором хлорной извести, содержащей 5 % активного хлора, инструменты — огнем паяльной лампы.

2.2.5. Отбор проб воды. Пробы воды из естественных и искусственных водоемов берут с поверхности (на глубине 10—15 см) и дна при помощи батометра или специально приспособленной бутыли. 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.

2.2.6. Смывы с объектов внешней среды. Их делают с площади 100 $см^2$ марлевым тампоном, смоченным стерильной водой. Тампоны помещают в пробирки с 4—5 $см^3$ стерильной воды или 0,9 %-ного раствора натрия хлорида, которые закрывают резиновой пробкой.

2.2.7. Каждую отобранную пробу помещают в сухую стерильную стеклянную банку и закрывают стерильной крышкой, пробкой или пергаментом; можно использовать полиэтиленовые мешочки, которые завязывают шпагатом. Пробы воды наливают в стерильные стеклянные бутылки и закрывают стерильными резиновыми пробками. Пробы нумеруют (на пробы шерсти ставят номер кипы), затем упаковывают во влагонепроницаемую тару и направляют в лабораторию с нарочным.

В сопроводительной к пробам указывают причину проведения исследования, какой материал и в каком количестве направляют, место и дату отбора материала, для проб шерсти и кормов дополнительно указывают их происхождение, объем (массу) партии, вид упаковки и число упаковочных единиц. При направлении в лабораторию нескольких проб и сопроводительной прилагают опись, где указывают номера и место отбора каждой пробы.

2.2.8. Отбор и упаковку проб проводят с соблюдением мер личной профилактики, не допуская рассеивания возбудителя при отборе и транспортировке проб и контаминации самих проб.

2.3. ПОДГОТОВКА ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ

2.3.1. При подготовке проб к исследованию и дальнейшей обработке используют только стерильные растворы, посуду, фильтры, инструменты.

2.3.2. От каждой пробы шерсти отбирают наиболее загрязненные части, измельчают ножницами, вместе с пылью помещают в колбу и заливают 10-кратным (по массе) количеством 0,9 %-ного раствора натрия хлорида. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 10—15 мин и дают отстояться. Смыв фильтруют через два-три слоя марли для удаления грубых частиц.

2.3.3. Из разных мест присланной пробы шкуры берут кусочки массой 1 г, помещают в фарфоровую ступку и заливают 0,9 %-ным раствором натрия хлорида с таким расчетом, чтобы получить 10—15 мл суспензии. Спустя некоторое время (после достаточного размягчения материала) кусочки измельчают ножницами и оставляют при температуре 20 ± 2 °С еще на 2—3 ч. После этого пробы хорошо растирают в той же жидкости до получения волокнистой мезги, которую удаляют, предварительно отжав

ее пестиком на внутренней боковой поверхности ступки.

2.3.4. Пробу корма в количестве 50—100 г (грубые корма после измельчения ножницами) помещают в колбу необходимой вместимости и заливают 0,9 %-ным раствором натрия хлорида из расчета получения 15—20 мл смыва. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 10—15 мин, дают отстояться 5—8 мин, не допуская набухания кормов, и фильтруют через два-три слоя марли.

2.3.5. Пробы почвы освобождают от корней, камешков и тщательно перемешивают. От каждой пробы берут 50—70 г, помещают в колбу, заливают 0,9 %-ным раствором натрия хлорида, дистиллированной водой или 0,5 %-ным раствором пирофосфата натрия из расчета получения 15—20 мл смыва, хорошо встряхивают в течение 25 мин, дают отстояться 5—8 мин и фильтруют через три слоя марли.

2.3.6. Воду с илистыми частицами фильтруют через два-три слоя марли, чистую воду исследуют без предварительной подготовки.

2.3.7. Тампоны, используемые для взятия смывов с объектов внешней среды, отжимают о стенки пробирки и удаляют, а оставшуюся жидкость подвергают исследованию.

2.4. МЕТОДЫ ОБОГАЩЕНИЯ ПРОБ И БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

2.4.1. Каждый взятый смыв с шерсти, кормов, почвы, объектов внешней среды делят на две части.

2.4.2. Одну часть прогревают на водяной бане 80 мин при 65 °С и фильтруют через одну-две фильтровальные мембраны № 3 в фильтре Зейтца при небольшом вакууме. Осадок с каждого фильтра смывают несколькими (6—8) каплями 0,9 %-ного раствора натрия хлорида и используют для посева.

Фильтровальные мембраны перед использованием стерилизуют кипячением в дистиллированной воде (со сменой ее) два раза по 10 мин, фильтр Зейтца — обычным способом. Мембраны закладывают в фильтр Зейтца в стерильных условиях.

2.4.3. Вторую часть смыва или пробы без предварительного прогревания фильтруют через фильтровальные мембраны и исследуют аналогично (п. 2.4.2). Кроме того, смывом с мембраны заражают двух белых мышей подкожно в дозе 0,2—0,3 мл и наблюдают за ними десять суток. Из органов павших мышей делают мазки, которые окрашивают по Граму и на капсулу, и посевы на МПА и в МПБ.

2.4.4. Смывы с мучнистых кормов, которые трудно фильтруются через фильтровальные мембраны, центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Высевы делают из верхнего слоя надосадочной жидкости и осадка.

2.4.5. При отсутствии фильтровальных мембран прогретые и непрогретые смывы, а также пробы воды центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость удаляют, а из осадка делают посевы.

2.4.6. Суспензией из шкурок (п. 2.3.3) заражают двух белых мышей, как указано в п. 2.4.3.

Остаток суспензии центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин, затем $^2/_3$ надосадочной жидкости удаляют, оставшуюся жидкость с осадком прогревают на водяной бане 30 мин при 65 °С. После охлаждения осадок используют для посева.

2.4.7. Материал, подготовленный для исследования, высевают на три-четыре чашки с МПА или агаром Хоттингера и на дифференциально-диагностическую среду с 0,01 % фенолфталеинфосфатом натрия (при наличии ее). Чашки с посевами инкубируют при 37 ± 1 °С в течение 18—24 ч.

2.4.8. Для идентификации с МПА отбирают не менее

десяти шероховатых колоний (при отсутствии такого количества — все шероховатые колонии), а с дифференциально-диагностической среды — все колонии, не изменившие цвета после обработки парами аммиака.

2.4.9. Из отобранных колоний делают пересев на МПА и в МПБ для дальнейшей идентификации (вместо МПБ пересев можно делать в систему для постановки реакции диск-преципитации).

2.5. ПОСТАНОВКА И УЧЕТ РЕАКЦИИ ДИСК-ПРЕЦИПИТАЦИИ

2.5.1. Посевы делают в жидкую питательную среду системы, не касаясь геля, из каждой колонии в отдельности или высевают суспензию, приготовленную из нескольких (5—10 колоний). Посевы выдерживают в термостате при 37 ± 1 °С в течение 16—20 ч.

2.5.2. Учет результатов проводят визуально. При отрицательном результате дополнительно инкубируют в течение 3—4 ч и повторно исследуют.

2.5.3. Пробирки вынимают из термостата и оставляют на 10—15 мин при температуре 20 ± 2 °С, после чего просматривают в проходящем свете на черном фоне.

2.5.4. Возбудитель сибирской язвы образует в средней части столбика агарового геля тонкую с четкими границами белую линию (диск) преципитации, которая сохраняется в течение четырех дней.

2.5.5. Почвенные сапрофитные бациллы, за исключением некоторых штаммов Bac. cereus, дают отрицательный результат (диск преципитации отсутствует). Отдельные штаммы Bac. cereus через 16—20 ч образуют в нижней части агарового столбика на границе с преципитирующей сывороткой рыхлую зону преципитации, которая не имеет четких границ и значительно толще, чем диск преципитации, образуемый возбудителем сибирской язвы. Через

36—40 ч зона преципитации, образуемая Bac. cereus, разрыхляется и сливается с преципитирующей сывороткой.

2.5.6. В качестве контроля при постановке реакции могут быть использованы посевы из противосибиреязвенной вакцины СТИ.

2.5.7. Культуры, давшие положительные результаты по реакции диск-преципитации или нечеткие результаты (рыхлое кольцо), идентифицируют, как указано в п. 2.6.

Культуры, давшие отрицательный результат, дальнейшему исследованию не подлежат.

2.6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ КУЛЬТУР

Полученные чистые культуры идентифицируют по следующим тестам: наличие капсулы, морфология микроба, характер роста в МПБ и на МПА, чувствительность к фагам "К"-ВИЭВ и "Гамма-МВА", чувствительность к пенициллину (тест "жемчужного ожерелья").

Методы постановки и учета этих тестов даны в пункте 1.3.5.

2.6.1. Метод выявления капсулообразования in vitro. Испытуемую культуру высевают в среду ГКИ (приложение, п. 5).

Пробирки с посевами закрывают стерильными резиновыми пробками и помещают в термостат при 37 ± 1 °С. Через 30—120 мин инкубирования у отдельных сибиреязвенных клеток начинается капсулообразование, а спустя 16—18 ч все или большинство сибиреязвенных клеток образуют капсулу. Для выявления капсулообразования из посевов делают мазки.

Мазки фиксируют (приложение, п. 1), окрашивают на капсулу и микроскопируют. При положительном тесте в мазках обнаруживают синие палочки и цепочки, окруженные розовой капсулой.

2.6.2. Методы выявления капсулообразования in vitro

(ускоренная биологическая проба). Испытуемую культуру в дозе 0,1—0,2 мл вводят внутрибрюшинно четырем белым мышам. Через 1—2 ч после заражения убивают по одной мыши, вскрывают, из перитониального экссудата и органов делают мазки-отпечатки для исследования на наличие капсульных палочек возбудителя сибирской язвы. Двух белых мышей оставляют под наблюдением до естественной гибели или на десять дней, как при классической биологической пробе.

2.7. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУР

Культуру относят к Bac. anthracis в случае выделения культуры с характерными свойствами и гибели хотя бы одного из двух зараженных суспензией из исходного патологического материала или культурами лабораторных животных с последующим обнаружением в мазках из его органов капсульных палочек; гибели хотя бы одного из двух зараженных суспензией из исходного патологического материала лабораторных животных и выделения из его органов бескапсульных культур, имеющих характерные свойства и чувствительных к сибиреязвенному фагу и пенициллину; выделения культуры с характерными свойствами, не вирулентной для белых мышей, но чувствительной к сибиреязвенному фагу и пенициллину.

2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ КУЛЬТУР

2.8.1. Для заражения готовят споровую культуру исследуемого штамма. Для этого суточную бульонную культуру засевают на одну из следующих сред: МПА, агар Хоттингера, голодный пшеничный или гороховый агар. Посевы выдерживают три-четыре дня в термостате при 37 ± 1 °С. Процесс спорообразования контролируют

путем подсчета спор при микроскопии раздавленной капли или окрашенных мазков.

2.8.2. После образования спор у 90—100 % микробов бактериальную массу смывают физиологическим раствором и определяют концентрацию спор по стандарту мутности или путем посева серийных разведений на МПА. Из суспензии спор известной концентрации готовят три рабочих разведения с содержанием 10 тыс., 100 тыс. и 1 млн спор в 1 мл.

2.8.3. Для определения вирулентности культур двум кроликам массой 2—2,5 кг вводят подкожно в области живота по 1 мл разведения с концентрацией 1 млн спор в 1 мл.

2.8.4. Для определения степени вирулентности по 1 мл раствора каждого разведения (п. 2.8.2) вводят подкожно в области живота двум кроликам и наблюдают за ними в течение 10 суток.

Степень вирулентности Bac. anthracis определяют по дозе, вызвавшей гибель кроликов. Высоковирулентные штаммы вызывают гибель кроликов при введении 10 тыс. спор, умеренно вирулентные — при введении 100 тыс. и 1 млн спор, слабовирулентные и авирулентные штаммы в указанных дозах не вызывают гибель кроликов.

3. ТРЕБОВАНИЯ К РЕЖИМУ РАБОТЫ И ПЕРЕДАЧЕ ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР

При проведении исследований на сибирскую язву необходимо строго соблюдать правила действующей "Инструкции о противоэпидемическом режиме работы с материалом, зараженным и подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I—II группы".

Выделенные культуры Bac. anthracis медицинские

учреждения направляют в специализированные лаборатории Научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока или Научно-исследовательского противочумного института Кавказа и Закавказья Минздрава СССР, ветеринарные — во Всесоюзный научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии или Научно-исследовательский ветеринарный институт (г. Казань).

Данным учреждениям предоставлено право давать окончательное заключение о принадлежности атипичных штаммов к виду Bac. anthracis, при этом характер и объем противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий до получения заключения специализированных лабораторий должны решаться на месте, исходя из конкретной сложившейся ситуации.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. Способ фиксации мазков в этиловом спирте с добавлением 3 % перекиси водорода

При данном способе фиксации мазков споровые и вегетативные формы Bac. anthracis обезвреживаются через 30 мин, при этом не нарушается морфология микроба и специфичность свечения при окраске люминесцирующими сыворотками.

1.1. Для приготовления фиксирующей жидкости во флакон наливают 180 мл этилового 96 °-ного спирта и 20 мл 30 %-ного пергидроля. Содержание перекиси водорода в пергидроле при необходимости определяют по методике, изложенной в Государственной фармакопее СССР.

Фиксирующую жидкость можно использовать в течение 1 мес, при этом флакон необходимо закрывать притертой пробкой и хранить в темном месте.

1.2. Мазки готовят на чистых обезжиренных стеклах общепринятыми методами, высушивают на воздухе, затем опускают в посуду с фиксирующей жидкостью. Через 30 мин мазки извлекают и высушивают на воздухе. Выдерживать мазки более 30 мин в фиксирующей жидкости нежелательно. Дальнейшие манипуляции с мазками проводят как с обезвреженным материалом.

2. Дифференциально-диагностическая среда для выделения Bac. anthracis

2.1. Для дифференциации колоний сибиреязвенного микроба от колоний спорообразующих сапрофитов используют тест обнаружения щелочной фосфатазы.

Первичные посевы или посевы подозрительных культур на дифференциально-диагностической среде инкубируют в термостате при 37 ± 1 °С в течение 18—24 ч.

При наличии роста микроорганизмов в крышку чашки Петри вносят 1—2 мл 25 %-ного водного раствора аммиака. Чашку (крышкой вниз) выдерживают при 20 ± 2 °С в течение 1 мин, после чего визуально или под малым увеличением микроскопа проводят учет теста.

Под действием паров аммиака происходит порозовение колоний микроорганизмов, обладающих фосфатазной активностью, а Bac. anthracis фосфатазной активностью не обладает и его колонии остаются бесцветными.

2.2. Приготовление растворов. Полимиксина М сульфат во флаконе растворяют в стерильной дистиллированной воде, а затем последовательными разведениями стерильным 0,9 %-ным раствором натрия хлорида доводят до концентрации 10 000 ЕД/мл.

Невиграмон переносят в стеклянный флакон или пробирку и растворяют в 25 %-ном водном растворе аммиака при тщательном перемешивании стеклянной палочкой. Затем последовательно разводят стерильным 0,9 %-ным раствором натрия хлорида до концентрации 100 мкг/мл.

Моющее средство "Прогресс" разводят стерильной дистиллированной водой до 0,1 %-ной концентрации.

Гризеофульвин в таблетках тщательно растирают в ступке, затем растворяют в стерильной дистиллированной воде до содержания 100 мкг препарата в 1 мл.

Фенолфталеинфосфат натрия (коммерческий 10 %-ный раствор) для стерилизации прогревают на водяной бане при 56 °С в течение 30 мин.

2.3. Приготовление дифференциально-диагностической среды. Питательный агар в колбах вместимостью 100 мл расплавляют в кипящей водяной бане и охлаждают до температуры 45—50 °С. Затем в агар добавляют основные растворы: полимиксина М сульфата — 0,5 мл; невиграмона — 0,5 мл; гризеофульвина* — 1 мл; моющего средства "Прогресс" — 1 мл; фенолфталеинфосфата натрия — 0,1 мл.

После перемешивания среду разливают в чашки Петри и подсушивают в течение 1,5—2 ч, оставив крышки чашек открытыми. Дифференциально-диагностическую среду после разлива можно хранить в холодильнике в течение одних-двух суток.

2.4. Готовую дифференциально-диагностическую среду выпускает Ставропольский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток (355100, г. Ставрополь, ул. Биологическая, 20).

3. Приготовление системы для постановки реакции диск-преципитации

3.1. Для постановки реакции диск-преципитации необходимо иметь преципитирующую сибиреязвенную сыворотку, очищенный 1 %-ный агаровый гель или 1 %-ный

---

* Гризеофульвин добавляют в среду при подозрении на загрязнение материала грибами.

агар Дифко, жидкую питательную среду, пригодную для культивирования возбудителя сибирской язвы.

3.2. Приготовление системы для постановки реакции диск-преципитации. Преципитирующую сибиреязвенную сыворотку разливают по 0,5—1 мл в стерильные бактериологические пробирки. На поверхность сыворотки, по стенке пробирки, наслаивают пастеровской пипеткой расплавленный и охлажденный до 45—50 °С 1 %-ный агаровый гель столбиком высотой 5—7 мл. Пробирки необходимо держать в вертикальном положении до застывания агара.

На поверхность застывшего агара вносят 1—1,5 мл жидкой питательной среды. При идентификации культур, выделенных из объектов внешней среды и сырья животного происхождения, в качестве жидкой питательной среды вместо МПБ можно использовать среду ГКИ или бульон Хоттингера с 40 %-ной инактивированной сывороткой крови, в этом случае одновременно проводят исследование на капсулообразование.

Систему готовят и применяют в день постановки реакции.

3.3. Приготовление очищенного 1 %-ного агарового геля. Сначала готовят нейтральную дистиллированную воду (pH 7,0). Для этого определяют pH имеющейся дистиллированной воды и в зависимости от полученных результатов ее нейтрализуют 1 %-ным раствором соляной кислоты (при щелочной реакции).

Необходимое для нейтрализации количество раствора определяют следующим способом. К 100 мл воды небольшими порциями (миллилитрами или каплями) добавляют один из указанных растворов, постоянно определяя pH; по достижении нейтральной реакции (pH 7,0) точно рассчитывают количество раствора, необходимое для нейтрализации всего объема дистиллированной воды.

5 г агар-агара заливают 300 мл нейтральной дистил-

лированной воды и нагревают в кипящей водяной бане до полного расплавления агар-агара.

Одновременно готовят водный раствор белка куриного яйца.

Берут охлажденное яйцо массой не менее 56 г и отделяют белок, который тщательно взбивают до образования пенистой массы и растворяют в 200 мл нейтральной дистиллированной воды. Приготовленный раствор белка делят на две части по 100 мл.

В расплавленный агар вносят 0,5 г хлористого кальция ($CaCl_2 \times 6H_2O$), перемешивают и охлаждают до 45–50 °С. К смеси добавляют 100 мл водного раствора белка куриного яйца, ставят в кипящую водяную баню и нагревают (примерно 15–20 мин) до появления хлопьев (реакция коагуляции).

Если белок не свертывается или коагуляция проходит плохо, вносят еще 0,25–0,5 г хлористого кальция и продолжают нагревать до появления хлопьев.

Горячий агар фильтруют через предварительно смоченный в горячей дистиллированной воде и отжатый ватный фильтр.

К профильтрованному агару добавляют вторую часть (100 мл) водного раствора яичного белка, перемешивают и снова нагревают в кипящей водяной бане до появления хлопьев. В случае плохого свертывания белка вносят 0,25–0,5 г хлористого кальция и продолжают нагревать до получения коагуляции белка.

После свертывания белка агар вновь фильтруют в горячем виде. Очищенный 1 %-ный агаровый гель должен быть прозрачным. Затем его разливают в пробирки или колбы и автоклавируют при 0,5 атм в течение 20 мин. Если после стерилизации выпадает осадок, агаровый гель фильтруют и стерилизуют повторно.

Готовую среду хранят в холодильнике (2–4 °С) и используют в течение 6 мес. Для предотвращения высы-

хания пробирки с агаровым гелем заворачивают в полиэтиленовый пакет.

4. Постановка теста "жемчужного ожерелья"

Перед постановкой теста готовят стерильный МПА и разливают в три пробирки вместимостью 10 мл (или три колбы вместимостью 100 мл).

В две пробирки (колбы) с охлажденным до 45–50 °С агаром стерильно вносят пенициллин из расчета 0,5 и 0,05 ЕД на 1 мл среды. Третья пробирка контрольная.

5. Приготовление среды ГКИ

Для приготовления среды к раствору Хенкса с бикарбонатом натрия или бульону Хоттингера добавляют 40 % стерильной бычьей сыворотки крови, инактивированной при 56 °С в течение 70 мин.

После смешивания компонентов pH среды доводят до 7,2–7,4 5 %-ным раствором бикарбоната натрия.

Получение необходимой концентрации пенициллина

Номер разведений	Количество разводимого пенициллина	Количество добавляемого МПБ, мл	Полученная концентрация, ЕД/мл	Количество среды			
				100 мл		10 мл	
				вносят раствора пенициллина, мл	концентрация пенициллина, ЕД/мл	вносят раствора пенициллина, мл	концентрация пенициллина, ЕД/мл
1	100 000 ЕД	10	10 000	—	—	—	—
2	1 мл разведения № 1	9	1000	—	—	—	—
3	1 мл разведения № 2	9	100	0,5	0,5	—	—
4	1 мл разведения № 3	9	10	0,5	0,05	0,5	0,5
5	1 мл разведения № 4	9	1	—	—	0,5	0,5

СОДЕРЖАНИЕ

1. Диагностика сибирской язвы у животных и людей 3
1.1. Общие положения 3
1.2. Взятие и пересылка патологического материала для исследования 3
1.3. *Порядок проведения исследования* 5
1.4. Кожная аллергическая проба с антраксином 12
1.5. Выдача заключения по результатам исследования. . . 13
1.6. Сроки исследования 14
2. Обнаружение возбудителя сибирской язвы в сырье животного происхождения и объектах внешней среды 14
2.1. Цель исследования 14
2.2. Взятие материала для исследования 15
2.3. Подготовка проб к исследованию 18
2.4. Методы обогащения проб и бактериологическое исследование 19
2.5. Постановка и учет реакции диск-преципитации 21
2.6. Идентификация культур 22
2.7. Учет результатов идентификации культур 23
2.8. *Определение вирулентности сибиреязвенных культур* 23
3. Требования к режиму работы и передаче выделенных культур 24
Приложение 25

gost.e-ecolog.ru