МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ СССР

ГЛАВНОЕ
УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ С ГОСУДАРСТВЕННОЙ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ИНСПЕКЦИЕЙ

Н А С Т А В Л Е Н И Е

по диагностике инфекционной болезни овец, вызываемой brucella ovis,(инфекционный эпидидимит баранов)

МОСКВА – ноябрь 1991 г.

gost.e-ecolog.ru

Наставление по диагностике инфекционной болезни овец, вызываемой Бруцелла овис (инфекционный эпидидимит баранов) разработано профессором И.А.Косиловым (ВНИИБТЖ), кандидатом биологических наук У.Э.Ниязовым (ВГНКИ), кандидатом ветеринарных наук В.А.Ромаховым (ВИЭВ), профессором К.В.Шумиловым (ВГНКИ), профессором Н.П.Ивановым (КазНИВИ), кандидатом ветеринарных наук Л.В.Деггяренко (ВНИИБТЖ).

МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ СССР
ГЛАВНОЕ
УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ
С ГОСУДАРСТВЕННОЙ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ИНСПЕКЦИЕЙ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель начальника Главного управления ветеринарии
В.А.Седов
"13" июня 1991 г.

НАСТАВЛЕНИЕ

№ _____

Москва

по диагностике инфекционной болезни овец, вызываемой Бруцелла овис (инфекционный эпидидимит баранов)

I. Общие положения

I.I. Инфекционный эпидидимит баранов (ИЭ) - хронически протекающая болезнь, поражающая как взрослых животных (бараны и овцематки), так и молодняк. Возбудитель - бруцеллы вида овис.

I.2. Диагноз на ИЭ ставят на основании результатов серологических, аллергических и бактериологических исследований с учетом эпизоотологических данных и клинических признаков болезни.

Наиболее частое клиническое проявление болезни у половозрелых баранов - эпидидимиты и орхиты, у овцематок иногда наблюдаются аборты, у молодняка болезнь протекает в бессимптомной форме.

I.3. Диагностика ИЭ включает лабораторные (бактериологическое и серологическое) исследования материала, а также аллергические и клинические исследования животных в хозяйствах.

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

2.I. При отборе проб крови и биологического материала необходимо соблюдать меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом действующими правилами и инструкциями по данному вопросу.

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

2.3. На бактериологическое исследование на ИЭ в лабораторию направляют: от баранов с клиническими признаками болезни – семенники с придатками, от овцематок – выделения из половых путей, взятые в первые 5 дней после аборта, измененные участки плодовых оболочек, абортированные плоды, а от убитых животных – лимфатические узлы, кусочки селезенки, печени, почек, а от баранов дополнительно семенники с придатками и предстательные железы.

2.4. Отобранные для бактериологического исследования пробы упаковывают в целлофан или пергаментную бумагу, помещают в непроницаемую тару (ящик, банка, полиэтиленовый пакет), опечатывают и в тот же день направляют в лабораторию нарочным вместе с сопроводительным документом, в котором указывают наименование и адрес отправителя, опись проб биологического материала, краткую эпизоотическую характеристику хозяйства. От абортировавших овцематок одновременно с биологическим материалом направляют кровь для серологического исследования на ИЭ.

Если в течение 24–30 часов взятый материал доставить в лабораторию не представляется возможным, его консервируют стерильным 30%-ным водным раствором глицерина. Материал заливают консервирующей жидкостью в количестве, превышающем его объем в 4–5 раз.

2.5. На серологическое исследование в лабораторию направляют кровь или сыворотку крови.

2.5.1. Кровь у животных берут из яремной вены в стерильные пробирки в количестве 5–10 мл. Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

Сыворотку крови получают методом отстоя. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают 30–60 мин. при температуре 20–30°С, сгусток крови от стенок отделяют стальной спицей, а затем пробирки выдерживают при 4–10°С. Через 20–24 часа отстоявшуюся сыворотку сливают в сухие стерильные пробирки (лучше в пробирки Флоринского), закрывают пробками и направляют на исследование в лабораторию в свежем или консервированном виде.

Сыворотку консервируют добавлением 0,05 мл (1 капля) 5%-ного раствора карболовой кислоты на каждый миллилитр сыворотки при постоянном перемешивании или сухой борной кислоты (2–4% к объему сыворотки) до получения насыщенного раствора и образованияна дне пробирки небольшого осадка кристаллов.

Неконсервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 6 суток со дня взятия проб, консервированные – в течение 30 суток.

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

3. Бактериологическая диагностика

3.I. Бактериологическая диагностика включает микроскопическое исследование мазков из исходного материала, постановку реакции нейтрализации антител (РНАт) с экстрактами из исходного материала или выделение культур бруцелла овис на питательных средах с последующей их идентификацией.

3.2. Микроскопическое исследование

Микроскопическому исследованию подвергают мазки из спермы от баранов с клиническими признаками эпидидимита и орхита.

Фиксированные на пламени мазки окрашивают по Граму и одному из следующих специальных методов: по Стампу (модифицированный метод Циль-Нильсена), Козловскому или Шуляку-Шин (см.приложение № I, п.I). При микроскопии учитывают, что бруцеллы вида овис – мелкие, грамотрицательные, расположенные отдельно, попарно или кучно, неподвижные коккобактерии, окрашивающиеся по Стампу, Козловскому или Шуляку-Шин в красный цвет.

3.3. Бактериологическое исследование

3.3.I. Для культивирования бруцелл вида овис используют мясо-пептонный печеночный глюкозо-глицериновый бульон (МППГГБ), плотный или полужидкий печеночно-сывороточный или печеночно-аминопептидный агар, сывороточно-декстрозный агар (см. приложение № I, п.2).

3.3.2. Высев материала из семенников, придатков семенников, печени, селезенки, лимфатических узлов производят с помощью стерильной пастеровской пипетки с резиновой грушей. Место прокола органа предварительно прижигают раскаленным шпателем. Набранный в пастеровскую пипетку из каждого органа материал переносят над пламенем спиртовки (газовой горелки) в пробирку с бульоном, затем из нее набирают в эту же пипетку бульон с суспензией посевного материала и засевают на 2 пробирки с агаром.

Посев материала из придатков семенников и семенников производят из 2-3-х мест (например, головки, тела и хвоста придатка), имеющих патологические изменения в виде уплотнений, бугристости, флюктуирующих участков, секвестров с гноеподобным содержимым.

Кожу абортированного плода перед посевом материала протирают с поверхности по белой линии тампоном, смоченным 70%-ным спиртом. Стерильными ножницами вскрывают брюшную и грудную стенку плода, набирают стерильными пастеровскими пипетками содержимое грудной и брюшной полостей и высевают материал в I пробирку с бульоном и 2 пробирки с агаром, а содержимое желудка - в 2 пробирки с бульоном и не менее 5 пробирок с агаром. Высевы из печени, селезенки, легких и сердца плода производят как указано в первом абзаце данного пункта.

3.3.3. Посевы инкубируют в термостате при 37-38°С в атмосфере, содержащей I0-I5% углекислого газа.

Для создания атмосферы с повышенным содержанием углекислого газа засеянные пробирки помещают в эксикатор с хорошо пригнанной шлифованной крышкой, микроанаэростат или CO_2-инкубатор.

Необходимую концентрацию углекислого газа в эксикаторе можно получить путем:

заполнения части объема углекислым газом из баллона или аппарата Киппа;

сжигания сухой ваты. При этом пробирки с посевами должны занимать не более половины объема эксикатора.

3.3.4. Посевы выдерживают в термостате при 37-38°С в течение 30 дней с периодическим просмотром через каждые 3-5 дней визуально, а при необходимости через лупу. При отсутствии роста часть поверхности агара орошают конденсационной жидкостью. Пробирки с агаром и бульоном, заросшие посторонней микрофлорой, отбраковывают.

При просмотре посевов обращают внимание на характер роста микробов. На поверхности агара вырастают типичные для бруцелл мелкие (2-3 мм в диаметре), блестящие, выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью просвечивающиеся колонии, имеющие в отраженном свете голубоватый оттенок, в падающем - сероватый. Первичный рост может быть также в виде тонкого налета на поверхности среды. С возрастом колонии мутнеют и приобретают более темную окраску, что связано с появлением пигмента.

На полужидком сывороточном или амидопептидном агаре рост чистой культуры бруцелл овис отмечается только в верхней части среды в виде помутнения без резко выраженной границы с величиной столбика от 0,4 до I см.

Рост бруцелл овис на бульоне характеризуется равномерным помутнением среды с выпадением в дальнейшем небольшого осадка на дне пробирки.

При обнаружении роста на жидких средах и отсутствии характерного роста на агаре, из каждой пробирки готовят мазки, которые окрашивают одним из специальных методов и делают пересев на 2 пробирки с плотной средой для выделения чистой культуры. Пересевы в пробирках культивируют так же, как и высевы из биологического материала.

Выделенные культуры идентифицируют по тинкториальным (окраска мазков по Граму и одним из специальных методов - по Стампу,

Козловскому или Цуляку-Шин), морфологическим, культуральным свойствам, в реакции агглютинации на стекле с помощью набора компонентов для серологической дифференциации бруцелл, в который входят: R-сыворотка агглютинирующая бруцеллезная, S-сыворотка агглютинирующая бруцеллезная, R-антиген бруцеллезный цветной и антиген бруцеллезный для роз бенгал пробы (см.приложение № 2, п.6).

Для проведения пластинчатой реакции агглютинации на стекле необходимы следующие материалы и компоненты: пастеровские пипетки, пробирки (серологические или бактериологические), пипетки мерные объемом I, 2, 5 или I0 $см^3$, петля бактериологическая, стекла предметные, спиртовка, увеличительное стекло (х2,5 - 4,5), емкость с дезинфицирующим раствором, испытуемая культура, набор для серологической дифференциации бруцелл (выпускается биопредприятием), а также 0,5%-ный карболизированный физиологический раствор pH 6,8 - 7,2.

Для исследования берут двухсуточные агаровые культуры. R - и S-сыворотки бруцеллезные агглютинирующие разводят 0,5%-ным карболинизированным физиологическим раствором до рабочего разведения, указанного в этикетке на коробке. Разведенные сыворотки допускается использовать в течение месяца. R-антиген бруцеллезный цветной для РА и антиген бруцеллезный для роз бенгал пробы в пластинчатой РА применяют неразведенными. Предметные стекла для реакции подготавливают общепринятым способом. Физиологический раствор, пробирки и пипетки должны быть стерильными.

Техника постановки реакции. На предметное стекло раздельно наносят по одной капле R- и S-сывороток бруцеллезных агглютинирующих и физиологического раствора. Испытуемую культуру бактериологической петлей отдельно эмульгируют в каплях R- и S-сывороток и в капле физиологического раствора для определения самоагглютинации культуры. Параллельно в каждом опыте ставят контроли: R -сыворотки в разведении, указанном в этикетке на коробке, с цветным и роз бенгал антигенами; S -сыворотки в разведении, указанном на этикетке, с цветным бруцеллезным антигеном и в неразведенном виде - с роз бенгал антигеном.

Учет и оценка реакции. Реакцию учитывают невооруженным глазом или с помощью увеличительного стекла в течение 2 минут по следующей схеме:

++++ (4 креста) – полное просветление жидкости с образованием четкого, выраженного агглютината – положительная реакция;

+++ (3 креста) – неполное просветление жидкости с выраженным агглютинатом – положительная реакция;

++ (2 креста) – слабое просветление жидкости с нечетко выраженным агглютинатом – положительная реакция;

+ (I крест) – жидкость без просветления с едва заметным агглютинатом – сомнительная реакция;

– (минус) – просветление жидкости не наступало, смесь гомогенная – отрицательная реакция.

Следует иметь ввиду, что реакция с R–бруцеллезной сывороткой проходит замедленно, агглютинат, как правило, мелкозернистый. Результаты реакции с испытуемой культурой считают достоверными, если в контролях R – и S –бруцеллезных сывороток с гомологичными антигенами агглютинация четко выражена не менее, чем на три креста, и с гетерологичными отсутствует.

Реакцию с испытуемой культурой считают положительной при наличии агглютинации на два креста и более. При отрицательной реакции ее проводят повторно с этой же культурой, взятой из трех-четырех мест.

Испытуемую культуру при наличии положительной реакции с R – или S– сывороткой в отдельности или с обеими сыворотками одновременно при отсутствии самоагглютинации в физиологическом растворе по показаниям реакции агглютинации признают бруцеллами. Культура возбудителя инфекционного эпидидимита баранов постоянно агглютинируется только R – бруцеллезной сывороткой.

Культуры, обладающие типичными для бруцелл морфологическими, тинкториальными и культуральными свойствами, а также дающие положительную реакцию агглютинации, относят к бруцеллам.

3.4. Выявление *бруцелл овис* в биологическом материале с помощью реакции нейтрализации антител

3.4.I. Реакцию нейтрализации антител (РНАт) применяют для индикации возбудителя инфекционного заболевания овец, вызываемого бруцелла овис (инфекционный эпидидимит баранов) из биологического материала животных.

3.4.2. Оборудование, необходимое для постановки РНАт:

плексигласовые пластины на 72 лунки *U*-образной формы вместимостью 2,0 мл;

групповой дозатор Флоринского с пипетками вместимостью 0,25 мл или пипетки мерные вместимостью I-2 мл;

калиброванные пипетки-капельницы с объемом капли 0,05 мл.

3.4.3. Компоненты для РНАт:

экстракты биологического материала от животных. Для исследования пригоден свежий, замороженный или консервированный 30%-ным раствором глицерина биологический материал. От баранов берут семенники, придатки семенников, сперму, предстательную железу и тестикулярные лимфатические узлы, от овец - выделения из половых путей (в первые дни после аборта), измененные участки рогов матки, надвыменные и глубокие тазовые узлы, а также абортированные плоды

эритроцитарный диагностикум (эритроциты барана, сенсибилизированные антигеном Бр.овис);

позитивная овисная сыворотка, изготовленная на предприятии;

физиологический раствор pH 7,2, содержащий I% нормальной сыворотки крови лошади, инактивированной при 62-63°С в течение 30 минут;

формалинизированный (I%) физиологический раствор pH I0,0.

3.4.4. Экстракты биологического материала готовят следующим образом.

Навеску органа или лимфатического узла (2,0 - 3,0 г) измельчают ножницами и растирают в ступке со стерильным песком с соблюдением правил работы с инфицированным материалом. К растертому таким образом материалу добавляют четыре части формалинизированного (I%) физиологического раствора pH I0,0.

Сперму баранов, выделения из половых путей от абортировавших овец, содержимое желудка абортированного плода перед экстрагированием разводят в соотношении I:I формалинизированным (I%) физиологическим раствором pH I0,0.

Подготовленный материал переносят в бактериологическую пробирку и экстрагируют прогреванием в кипящей водяной бане в течение 30 минут. Полученный экстракт освобождают от плотных частиц путем фильтрования через бумажный фильтр. Фильтрат консервируют формалином, который вносят из расчета 0,5% к массе фильтрата, и исследуют в РНАт.

Использованную посуду, инструменты, бумажные фильтры с осадком обезвреживают кипячением или автоклавируют.

Ампулы (флаконы) с эритроцитарным диагностикумом перед постановкой реакции тщательно встряхивают до получения однородной (гомогенной) взвеси эритроцитов коричневого цвета без хлопьев и комочков.

Для определения рабочего разведения позитивной овисной сыворотки крови в РНГА ее разводят в соотношении I:25 физиологическим раствором (0,I мл сыворотки и 2,4 мл физиологического раствора) и инактивируют в водяной бане при 62-63°С в течение 30 минут.

В один вертикальный ряд (I2 лунок) плексигласовой пластины вносят по 0,5 мл I%-ного раствора нормальной сыворотки крови лошади (разбавитель сывороток) и в первую лунку добавляют 0,5 мл инактивированной позитивной овисной сыворотки (в разведении I:25). Перемешивают сыворотку с разбавителем и 0,5 мл смеси переносят во вторую лунку, из второй – 0,5 мл смеси переносят в третью и т.д. Из последней лунки 0,5 мл смеси удаляют. К полученным разведениям сыворотки (I:50, I:I00, I:200 и т.д.) добавляют по 0,05 мл эритроцитарного диагностикума. Осторожно встряхивают пластины для смешивания сывороток с эритроцитами, выдерживают при температуре I8–25°С в течение трех часов и учитывают результаты. Таким образом определяют предельный титр сыворотки.

Предельное разведение позитивной овисной сыворотки, при котором происходит агглютинация эритроцитов с оценкой не менее, чем на четыре креста, принимают за одну сывороточную единицу (I с.е.). Рабочее разведение сыворотки должно быть в два раза ниже (2 с.е.). Например, предельный титр позитивной сыворотки составляет 6400 (I с.е.), следовательно рабочий титр ее будет равен 6400:2=3200 (2 с.е.). Для приготовления рабочего разведения нативную позитивную сыворотку предварительно разводят физиологическим раствором в соотношении I:I00, инактивируют в водяной бане при 62-63°С в

течение 30 минут и затем готовят разведение сыворотки, необходимое для проведения РНАт. В данном примере, чтобы получить разведение сыворотки I:3200, к I мл исходного ее разведения (I:I00) необходимо добавить 3I мл физиологического раствора.

3.4.5. Постановка РНАт

Реакцию ставят в объеме 0,55 мл в двух лунках по схеме.

Схема постановки РНАт

Компоненты (в мл)	Испытуемый экстракт		Контроли		
	контроль на неспецифическую агглютинацию	диагностическая лунка	с биофабричным антигеном: контроль на неспецифическую агглютинацию	с биофабричным антигеном: диагностическая лунка	на самоагглютинацию эритроцитарного диагностикума
Испытуемый экстракт	0,25	0,25	0,25	0,25	-
Физиологический раствор с I% нормальной сыворотки лошади	0,25	-	0,25	-	0,5
Позитивная овисная сыворотка в рабочем разведении	-	0,25	-	0,25	-

Пластины осторожно встряхивают для смешивания компонентов и помещают в термостат при температуре 37°С на два часа, затем вносят во все лунки эритроцитарный диагностикум.

Эритроцитарный диагностикум	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Пластины вновь осторожно встряхивают для смешивания компонентов, выдерживают при температуре I8-25°С три часа и учитывают результаты.

При постановке РНАт в отдельных лунках ставят контроль для подтверждения правильности приготовления рабочего разведения позитивной овисной сыворотки путем постановки РНГА в пяти последовательных разведениях, начиная с рабочего.

3.4.6. Учет результатов реакции проводят через три часа после постановки и оценивают ее в следующем порядке:

положительная - сенсибилизированные эритроциты оседают в диагностической лунке в виде "пуговки" или компактного колечка с ровными краями;

отрицательная - сенсибилизированные эритроциты в диагностической лунке ровным слоем покрывают всю поверхность дна лунки в виде "зонтика", края агглютината иногда загибаются во внутрь.

Результаты РНАт считают достоверными при:

отсутствии агглютинации эритроцитов испытуемым экстрактом в контроле без позитивной овисной сыворотки;

наличии положительной реакции в контроле с биофабричным овисным антигеном;

отсутствии самоагглютинации эритроцитарного диагностикума в физиологическом растворе;

подтверждении правильности выбора рабочего разведения позитивной овисной сыворотки в РНГА с эритроцитарным диагностикумом.

3.4.7. Результаты исследований экстрактов из биологического материала по каждой экспертизе, номера серий, дату изготовления и сроки годности эритроцитарного антигена, позитивной овисной сыворотки записывают в журнал серологических исследований.

В заключении лаборатории о результатах исследования экстрактов из биологического материала указывают диагностическую оценку каждой пробы (положительная, отрицательная).

3.4.8. При получении положительного результата в РНАт диагноз на инфекционный эпидидимит считают установленным.

4. Методы серологической диагностики инфекционного эпидидимита баранов

4.I. Серологическая диагностика ИЭ заключается в обнаружении специфических антител в сыворотке крови овец к антигенам из бруцелл вида овис с помощью реакции агглютинации в пробирках (РА), реакции длительного связывания комплемента на холоде (РДСК) и реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

4.2. Постановка и учет результатов реакции агглютинации

4.2.I. Оборудование, материалы и компоненты

Для проведения пробирочной реакции агглютинации необходимы:

оборудование - термостат с температурой нагрева 37-38°С;

материалы - штативы, пробирки (серологические или бактериологические), пипетки мерные вместимостью I, 2, 5 и I0 $см^3$, мерные цилиндры, аппарат Флоринского, емкости вместимостью I00, 250, 500 мл;

компоненты - антиген овисный цветной для РА, испытуемые сыворотки крови животных, 0,I5 М фосфатно-буферный раствор pH 8,6 - 9,0 с содержанием 5% NaCI (см.приложение № 2, п.I), R -бруцеллезная сыворотка, негативная сыворотка барана.

4.2.2. Подготовка компонентов к реакции

Перед постановкой РА испытуемые сыворотки и антиген разводят фосфатным буферным раствором. Испытуемые сыворотки разводят I:I2,5. Антиген разводят I:20.

4.2.3. Срок использования разведенного антигена и сывороток

Разведенные антиген и сыворотки используют в течение 2-х суток. Более длительное хранение не допускается.

4.2.4. Техника постановки реакции агглютинации

Реакцию агглютинации проводят в объеме I мл в разведении I:25. Делают разведение испытуемой сыворотки I:I2,5, для чего в пробирки вносят по 0,04 мл сыворотки и добавляют по 0,5 мл фосфатного буферного раствора. В пробирки с исп мыми сыворотками добавляют по 0,5 мл антигена, тщательно перемешивают. Одновременно к реакции ставят контроли с R-бруцеллезной, негативной сыворотками, фосфатно-буферным раствором и антигеном. Штативы с пробирками помещают в термостат при температуре 37-38°С на I6-I8 часов затем выдерживают при комнатной температуре 5-6 часов и проводят учет реакции. Допускается проводить учет результатов реакции на следующие сутки.

4.2.5. Контроли реакции

К 0,5 мл R-бруцеллезной сыворотки в разведении I:I2,5 добавляют 0,5 мл антигена в разведении I:20. Результат - полное просветление жидкости при наличии хорошо выраженного зонтика на дне пробирки (++++).

К 0,5 мл негативной сыворотки барана добавляют антиген в разведении I:20. Результат - просветление жидкости отсутствует, на дне пробирки осадок в виде пуговицы или небольшого колечка.

К 0,5 мл антигена в разведении I:20 добавляют 0,5 мл фосфатного буферного раствора. Результат - просветление жидкости отсутствует. На дне пробирки осадок в виде пуговицы или небольшого колечка, который при встряхивании легко разбивается образуя равномерную взвесь.

4.2.6. Учет результатов реакции

Результаты реакции агглютинации учитывают визуально и оценивают по четырехбалльной системе в крестах:

++++ (4 креста) – полное просветление жидкости при наличии хорошо выраженного "зонтика" на дне пробирки. При легком встряхивании "зонтик" разбивается. Положительная реакция;

+++ (3 креста) – "зонтик" на дне пробирки хорошо выражен, но жидкость слегка опалесцирует. Положительная реакция;

++ (2 креста) – жидкость слабо просветлена, на дне пробирки "зонтик". Сомнительная реакция;

+ (I крест) – отсутствие или весьма незначительное просветление жидкости, "зонтик" на дне пробирки слабо выражен. Отрицательная реакция;

– (минус) – осадок на дне пробирки в виде "пуговицы" или колечка, при встряхивании легко разбивается, образуя равномерную взвесь. Просветление жидкости отсутствует. Отрицательная реакция.

4.2.7. Диагностическая оценка реакции агглютинации

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сыворотками крови в разведении I:25 с оценкой не менее чем на 3 креста. Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации в разведении I:25 с сыворотками крови с оценкой не менее чем на 2 креста. При получении сомнительного результата реакции сыворотку крови данного животного исследуют повторно через 25-30 дней. При сохранении у животного сомнительной РА таких животных признают больными.

4.3. Постановка и учет реакции длительного связывания комплемента на холоде

Реакцию длительного связывания комплемента на холоде (РДСК) проводят в пробирках в объеме сыворотки, антигена и комплемента по 0,2 мл, гемолитической системы в оттитрованной рабочей дозе.

4.3.I. Компоненты реакции и подготовка их к работе:

набор специфических компонентов для диагностики болезни овец, вызываемой бруцелла овис, включающий: антиген овисный для РДСК, позитивную овисную сыворотку, негативные сыворотки двух разных серий;

испытуемые и контрольные (позитивную и негативные) сыворотки инактивируют в водяной бане в день постановки реакции при температуре 63-64°С в течение 30 мин;

антиген овисный для РДСК применяют в рабочем титре, указанном предприятием, его изготовившем (см.приложение № 2, п.6);

комплемент – сыворотка крови морской свинки (свежая, консервированная добавлением 4% борной кислоты или изготовленная на биопредприятии в лиофильно высушенном состоянии). При использовании в качестве комплемента свежей или консервированной сыворотки и при получении каждой новой серии сухого комплемента проводят титрование его в гемолитической системе для определения активности (см.приложение № 2, п.4) и определяют рабочее разведение для РДСК (табл.I).

Сухой биофабричный комплемент растворяют в физиологическом растворе, как указано на этикетке. Берут такое количество ампул (флаконов), в которых содержится необходимое для проведения всего опыта количество комплемента. Содержимое ампул (флаконов) сливают в одну пробирку (флакон), осторожно смешивают и хранят в холодильнике при плюс 2-6°С до использования;

гемолитическая сыворотка (гемолизин) берут в утроенном титре. Титрование гемолизина проводят периодически один раз в 3 месяца и при использовании каждой новой серии (см.приложение № 2, п.5);

эритроциты барана – 3%-ная от осадка взвесь эритроцитов в физиологическом растворе (см.приложение № 2, п.3).

Для приготовления гемолитической системы 3%-ную взвесь эритроцитов и гемолитическую сыворотку в рабочем разведении смешивают в равных объемах и выдерживают в холодильнике при плюс 2-6°С в течение I6-I8 часов. При смешивании гемолизин вливают во взвесь эритроцитов;

физиологический раствор – 0,85%-ный раствор химически чистого хлорида натрия в дистиллированной воде pH 7,3 – 7,4 или физиологический раствор, содержащий ионы магния и кальция (см.приложение № 2. п.2).

Таблица I

Схема определения рабочего разведения комплемента для РДСК

Компоненты	Номера пробирок и разведения комплемента									
	I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
	I:I0	I:20	I:30	I:40	I:50	I:60	I:70	I:80	I:90	I:I00
	Приготовление разведений комплемента									
Комплемент в разведении I:I0	0,2	0,I	0,I	0,I	0,I	0,I	0,I	0,I	0,I	0,I
Физиологический раствор	-	0,I	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,3	0,9
	Титрование комплемента									
Комплемент в разведениях	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	Водяная баня 37-38°С - I0 минут									
Примерный результат	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	НГ

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

Перед постановкой реакции компоненты проверяют на антикомплементарность и гемотоксичность по следующей схеме:

Компоненты	Проверка на				
	антикомплементарность	гемотоксичность			
		комплемента	гемолизина	антигена	физиологического раствора
комплемент в разведении 1:20	0,2	0,2	–	–	–
гемолизин в рабочем титре	0,2	–	0,2	–	–
антиген в рабочем титре	0,4	–	–	0,4	–
эритроциты (2,5% или 3%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
физиологический раствор	–	0,6	0,6	0,4	0,8
водяная баня 10 минут при 37-38°С					
Результат:	гемолиз	полная задержка гемолиза			

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

4.3.2. Последовательность постановки РДСК

Первый день. Розлив испытуемых и контрольных сывороток для главного опыта и для титрования гемолитической системы.
Инактивирование сывороток.
Контроль компонентов реакции на антикомплементарность и гемотоксичность.
Розлив антигена и комплемента.
Приготовление гемолитической системы.
Помещение пробирок в холодильник.

Второй день. Выдерживание пробирок главного опыта и гемолитической системы при комнатной температуре 20 минут.
Титрование гемолитической системы.
Определение рабочей дозы гемолитической системы.
Главный опыт.
Розлив гемолитической системы в пробирки с исследуемыми сыворотками.
Учет о оценка результатов реакции.

Испытуемые сыворотки исследуют в разведениях I:5 и I:10 с антигеном и I:5 без антигена (контроль на антикомплементарность сыворотки), при массовом исследовании реакцию проводят в одной пробирке в разведении сыворотки I:5 с антигеном (см.табл.3). Одновременно разливают сыворотки для титрования гемолитической системы. Для этого позитивную овисную сыворотку, негативные сыворотки (2 серии), взятые из набора, и одну сыворотку, взятую из исследуемой партии, разводят I:5 физиологическим раствором (I мл сыворотки + 4 мл физиологического раствора). Инактивирование сывороток крови проводят как указано было в данном подпункте.

Комплемент применяют в рабочем разведении I:20, I:25 или I:30 в зависимости от его титра. Если титр комплемента в гемсистеме не известен, перед постановкой реакции определяют его рабочее разведение согласно схеме по таблице I.

Розлив компонентов и последовательность постановки реакции осуществляют по схеме, указанной в таблице 3.

Перед розливом гемолитической системы в пробирки с исследуемыми сыворотками проводят титрование гемолитической системы по схеме согласно таблице 2.

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

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

Таблица 2

Система титрования гемолитической системы

Компоненты реакции	Ряд пробирок в штативе	Номера пробирок									
		I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
Позитивная, негативные или испытуемая сыворотки в разведении I:5	первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	первый	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген в рабочем титре	первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	второй	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Комплемент в рабочем разведении	первый	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	второй	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Холодильник I6-I8 часов при плюс 2-6°											
Гемолитическая система	первый	0,I	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	I,0
	второй	0,I	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	I,0
Водяная баня 37-38° - 20 минут											
Примерный результат	первый	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ
	второй	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ

Таблица 3

Схема постановки РДСК

Компоненты реакции	При массовом исследовании		Для повторного исследования			
	пробирки с испытуемыми сыворотками	контроль гемолитической системы	пробирки для каждой испытуемой сыворотки			контроль гемолитической системы
			I	2	3	
Испытуемая сыворотка	0,04	-	0,04	0,04	0,02	-
Физиологический раствор	0,I6	0,6	0,36	0,I6	0,I8	0,6
Водяная баня 63-64° - 30 минут						
Антиген овисный в рабочем титре	0,2	-	-	0,2	0,2	-
Комплемент в рабочем разведении	0,2	-	0,2	0,2	0,2	-
Холодильник плюс 2-6° - I6-I8 часов и 20 минут при комнатной температуре						
Гемолитическая система в рабочем титре	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Водяная баня 37-38° - 20 минут						

Контроли реакции:

негативные и позитивная овисная сыворотки в разведениях I:5 и I:I0 с антигеном и I:5 без антигена;

гемолитическая система без сыворотки, антигена и комплемента.

4.3.3. Учет результатов РДСК

Реакцию длительного связывания комплемента учитывают визуально. При постановке реакции в одной пробирке (при массовом исследовании) учет проводят один раз - сразу после извлечения штативов из водяной бани. При исследовании в трех пробирках - через 3-4 часа, когда в контрольных пробах с позитивной овисной сывороткой эритроциты осядут на дно пробирки, или на следующий день (в этом случае штативы с пробирками главного опыта оставляют в холодильнике).

Результаты реакции оценивают в крестах по следующей схеме:

++++ (4 креста) – отсутствие гемолиза, надосадочная жидкость прозрачная и бесцветная;

+++ (3 креста) – гемолиз 25% эритроцитов;

++ (2 креста) – гемолиз 50% эритроцитов;

+ (1 крест) – гемолиз 75% эритроцитов;

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

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

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

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

4.3.4. Диагностическая оценка РДСК

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

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

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

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

4.4. Постановка и учет результатов реакции непрямой гемагглютинации

4.4.I. Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) применяют в комплексе исследований при диагностике инфекционного заболевания овец, вызываемого возбудителем бруцелла овис (инфекционный эпидидимит баранов - ИЭ).

4.4.2. Оборудование, необходимое для постановки РНГА:

плексигласовые пластины на 72 лунки U -образной формы, вместимостью 2 мл;

групповой дозатор Флоринского с пипетками, вместимостью 0,I; 0,5 и 0,8 мл;

пипетки мерные, вместимостью I, 2 и 5 мл;

микропипетки вместимостью 0,0I или 0,02 мл;

калиброванные пипетки-капельницы с объемом капли 0,05 мл;

плексигласовые или полистироловые планшеты на 96 лунок U -образной формы, вместимостью 0,2 мл, или набор для постановки серологических реакций в микрообъемах типа "Такачи" или "Титертек".

4.4.3. Компоненты для РНГА:

испытуемые сыворотки.

Сыворотки крови свежие или консервированные 5%-ным раствором фенола (I капля фенола на I мл сыворотки) или сухой борной кислотой (2% кислоты к объему сыворотки). Консервированные сыворотки пригодны для исследования в течение I мес. со дня их консервирования, а свежие - в течение 3 дней, гемолизированные, мутные, проросшие сыворотки не исследуют;

позитивная овисная сыворотка, изготовленная биопредприятием;

негативная сыворотка барана, изготовленная биопредприятием;

эритроцитарный диагностикум (эритроциты барана, сенсибилизированные антигеном Бр.овис);

онтрольные (не сенсибилизированные антигеном) эритроциты барана;

разбавитель сывороток – физиологический раствор pH 7,2, содержащий 1% нормальной сыворотки крови лошади, инактивированной при температуре 62-63°С в течение 30 минут.

4.4.4. Подготовка компонентов

Испытуемые и контрольные (овисная и негативная) сыворотки крови разводят в пробирках физиологическим раствором в соотношении I:25 (0,I мл сыворотки и 2,4 мл физиологического раствора) и инактивируют в водяной бане при температуре 62-63°С в течение 30 минут.

Ампулы (флаконы) с эритроцитарным диагностикумом и контрольными эритроцитами перед постановкой реакции тщательно встряхивают до получения гомогенной (однородной) взвеси эритроцитов коричневого цвета без хлопьев и комочков.

4.4.5. Постановка РНГА

РНГА проводят в объеме 0,55 мл (макрометод) или в объеме 0,I мл (микрометод).

Реакцию ставят в объеме 0,55 мл (макрометод) в двух разведениях сыворотки – I:50 и I:I00. Для получения этих разведений испытуемых и контрольных сывороток в лунки каждого ряда пластины вносят по 0,5 мл разбавителя сыворотки. В первую лунку первого горизонтального ряда добавляют 0,5 мл инактивированной испытуемой сыворотки крови в разведении I:25 (п.4.4.4.), тщательно перемешивают с разбавителем (получают разведение сыворотки I:50), затем 0,5 мл смеси переносят в первую лунку второго горизонтального ряда (получают разведение I:I00) и тщательно перемешивают, 0,5 мл удаляют.

В каждую лунку с соответствующим разведением сыворотки вносят по 0,05 мл эритроцитарного диагностикума (п.4.4.3.). Сыворотку и эритроцитарный диагностикум тщательно перемешивают путем осторожного встряхивания пластины и оставляют при температуре I8-25°С на три часа, затем проводят учет реакции.

К реакции ставят следующие контроли:

испытуемые и контрольные сыворотки крови в разведении I:50 с контрольными эритроцитами (контроль на отсутствие гемагглютинирующих свойств сыворотки);

негативная и позитивная сыворотки крови (в тех же разведениях, что и испытуемые сыворотки) с эритроцитарным диагностикумом;

разбавитель сывороток с эритроцитарным диагностикумом (на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов).

РНГА в объеме 0,I мл (микрометод) осуществляют с помощью набора "Такачи" (при ручной постановке) или набора для полуавтоматической постановки серологических реакций "Титертек" в полистироловых микропластинах с лунками, имеющими U- или V-образную форму дна.

В лунки пластины калиброванной пипеткой-капельницей вносят по 0,05 мл разбавителя сывороток. В лунки первого горизонтального ряда добавляют по 0,05 мл инактивированных испытуемых сывороток крови в разведении I:25 (получают разведение сывороток I:50). Затем 0,05 мл хорошо перемешанной смеси сыворотки с разбавителем переносят из первой лунки первого ряда в первую лунку второго горизонтального ряда (получают разведение I:I00). Из лунок второго ряда выбирают отдельными делюторами по 0,05 мл смеси, осушают делюторы фильтровальной бумагой и ополаскивают их физиологическим раствором. Перенос сыворотки производят с помощью петли (делютора) на 0,05 мл (делюторы входят в наборы "Такачи" и "Титертек").

Во все лунки с разведенными сыворотками вносят по 0,05 мл эритроцитарного диагностикума, предварительно разведенного в соотношении I:I0 физиологическим раствором хлорида натрия pH 7,2 (получают 0,25%-ную взвесь эритроцитов).

Путем легкого встряхивания пластин смешивают эритроцитарный диагностикум с сыворотками и оставляют при температуре I8-25°С на три часа.

К РНГА микрометодом ставят те же контроли, как и при постановке реакции макрометодом.

4.4.6. Учет результатов реакции

Результаты реакции учитывают через три часа визуально и определяют в крестах по следующей схеме:

++++ - агглютинированные эритроциты ровным слоем покрывают всю поверхность дна лунки, края агглютината иногда загибаются во внутрь;

+++ - агглютинированные эритроциты равномерно покрывают всю поверхность дна лунки, заметна граница агглютината;

++ - по краю агглютинированных эритроцитов образуется кольцо из несклеенных эритроцитов;

\+ - агглютинированные эритроциты оседают на дно лунки в виде небольшого кольца с ровными краями;

\- - эритроциты оседают на дно лунки в виде "пуговки" или компактного колечка с ровными краями.

За титр антител испытуемой сыворотки принимают последнее ее разведение, в котором произошла агглютинация эритроцитов оценкой не менее, чем на два креста (++).

4.4.7. Диагностическая оценка РНГА

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации сенсибилизированных эритроцитов с испытуемыми сыворотками в разведении I:I00 с оценкой не менее, чем на два креста (++).

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации сенсибилизированных эритроцитов с испытуемыми сыворотками в разведении I:50 с оценкой не менее, чем на два креста (++) и I:I00 с оценкой не выше, чем на один крест (+).

Реакцию считают отрицательной при налии агглютинации эритроцитов в разведении сывороток I:50 с оценкой на один крест (+) и при полном ее отсутствии (-).

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

5. Аллергический метод диагностики инфекционного эпидидимита

5.I. Метод аллергического исследования основан на выявлении у овец, больных инфекционным эпидидимитом, повышенной чувствительности замедленного типа к специфическому аллергену.

5.I.I. Аллергическое исследование животных на инфекционный эпидидимит разрешается проводить ветеринарным врачам или фельдшерам со средним образованием под наблюдением врача.

5.I.2. Для аллергической диагностики инфекционного эпидидимита применяют бруцеллоовин, представляющий собой стерильную, прозрачную жидкость светло-желтого цвета, содержащую специфические белковые вещества, извлеченные из штамма бруцелл вида овис. Препарат выпускают во флаконах или ампулах. На каждом флаконе (ампуле) должна быть этикетка с обозначением наименования препарата, объема во флаконе (ампуле), номера серии, даты изготовления. Флаконы должны быть плотно укупорены резиновыми пробками, обкатаны алюминиевыми колпачками, а ампулы запаяны под вакуумом и упакованы в картонные коробки с наставлением по применению бруцеллоовина.

На коробке с бруцеллоовином должна быть этикетка, в которой указано: наименование препарата, наименование предприятия-изготовителя, количество флаконов (ампул), объем препарата во флаконе (ампуле), номер серии, номер госконтроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения, обозначение ТУ.

5.I.3. Бруцеллоовин хранят в темном сухом помещении при температуре +2+I0°С. Срок годности препарата I2 месяцев со дня изготовления.

Препарат во флаконах (ампулах) без этикеток, с трещинами, содержащий посторонние примеси, подвергавшийся замораживанию, а также неиспользованный в течение 6 часов после вскрытия, к применению не пригоден и подлежит уничтожению путем кипячения в течение 30 минут.

5.I.4. Для введения животным бруцеллоовина используют короткие инъекционные иглы (№ 0420-08I3) или иглы для внутрикожных инъекций и шприцы, снабженные бегунком, вместимостью 2 или 5 мл.

При проведении исследований животных соблюдают правила асептики и антисептики. Шприцы и иглы перед и после использования стерилизуют кипячением 30 мин в дистиллированной воде. Поверхность кожи в месте введения бруцеллоовина дезинфицируют 70%-ным спиртом. Во время исследования животных иглы меняют перед каждым наполнением шприца бруцеллоовином, а в промежутках между инъекциями препарата их протирают 70%-ным спиртом.

5.2. Применение бруцеллоовина

5.2.I. Бруцеллоовин вводят животным под кожу нижнего века на I см ниже края века со стороны наружного угла глаза (пальпебральная проба) в дозе 0,5 мл или внутрикожно в центре одной из

подхвостовых складок (внутрикожная проба) в дозе 0,2 мл. Вводить препарат под кожу века, имеющую травматические повреждения, уплотнения, абсцессы и другие поражения, не разрешается.

5.2.2. У животных, зараженных возбудителем бруцелла овис, на месте введения бруцеллоовина наступает воспалительная реакция в виде плотной или тестоватой припухлости, обычно хорошо видимой при осмотре. У здоровых животных местная реакция не возникает.

5.2.3. Реакцию на бруцеллоовин у овец учитывают одни раз через 48 часов путем осмотра и пальпации места инъекции препарата в сравнении с кожей века другого глаза или подхвостовой складкой.

5.2.4. Животных, привитых бруцеллезными вакцинами, исследуют бруцеллоовином не ранее, чем через 12 мес. после прививки.

5.2.5. На проведение аллергической диагностики на ИЭ животных составляют акт, в котором указывают наименование хозяйства, номер отары, ее состояние по ИЭ, количество исследованных баранов, наименование аллергена, изготовителя, номер серии, дату изготовления, срок годности, количество израсходованного препарата и результаты исследований.

5.2.6. В случае местных осложнений у животных после введения аллергена применение данной серии прекращают и направляют по 3 невскрытых флакона (ампулы) серии бруцеллоовина, вызвавшего осложнения, в соответствии с указанием Главного управления ветеринарии Госагропрома СССР № 432-3 от 19.09.87 г. "О порядке предъявления рекламаций на ветпрепараты отечественного производства и закупаемые по импорту" во Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветпрепаратов (123022 Москва, Звенигородское шоссе, 5) и изготовителю.

6. Клинический и патологоанатомический методы диагностики инфекционного эпидидимита баранов

6.I. Клиническую диагностику болезни у баранов проводят путем внешнего осмотра семенников и пальпации содержимого мошонки. При этом учитывают, что у баранов болезнь протекает преимущественно в хронической форме. Острая форма наблюдается редко.

6.I.I. При внешнем осмотре обращают внимание на размеры семенников, наличие припухлости мошонки, ассиметрии семенников, общее состояние животного и температуру тела.

6.I.2. При пальпации мошонки и ее содержимого учитывают местную температуру кожи, наличие болезненности отдельных участков при надавливании, флюктуирующих участков, размеры семенников и придатков и их подвижность в полости мошонки. При этом пальпируют одновременно правый и левый семенники и их придатки.

6.I.3. Острая форма болезни характеризуется сильным отеком мошонки в результате скопления в ее полости большого количества экссудата. Кожа мошонки диффузно покрасневшая, горячая, напряженная и при пальпации болезненна. При поражении одного семенника резко выражена ассиметрия. Животные теряют аппетит, состояние угнетенное. Температура тела может повышаться на I-2 градуса. Продолжается острая форма I0-I5 дней и обычно к 20-25 дню видимые изменения исчезают и болезнь переходит в хроническую форму.

6.I.4. Хроническая форма болезни устанавливается путем тщательной пальпации одновременно правого и левого семенника и придатка. Обычно выявляют одно- или двустороннее увеличение хвоста придатка размером от грецкого ореха до куриного яйца. Бороздка между семенником и придатком не прощупывается вследствие разроста фиброзной ткани. Изменения придатка выражаются в виде уплотнения отдельных участков (головки, тела или хвоста), бугристостью поверхности; нередко отмечают флюктуирующие участки. При сильном разрастании фиброзной ткани происходит атрофия семенника, сращение оболочек с семенником, придатком и кожей мошонки и вследствие этого ограниченная или полная неподвижность семенников в полости мошонки. Хроническая форма не сопровождается ухудшением общего сос-

тояния баранов, однако, вследствие частичного или полного нарушения воспроизводительных функций, такие животные не представляют ценности в племенном отношении, подлежат выбраковке и сдаче на мясокомбинат.

6.2. При патологоанатомическом осмотре семенников наиболее характерные изменения отмечают в придатках. Придатки семенников увеличены в объеме, ткани плотные. Хвост придатка окружен фиброзной оболочкой и нередко срастается с семенником. Изменения придатка чаще всего локализуются в хвосте, реже в головке и теле и еще реже поражается весь придаток. Патологически измененный участок придатка значительно увеличен с резко выраженной бугристой поверхностью. При разрезе в паренхиме придатка обнаруживают различной величины абсцессы, заполненные белой или желтоватой массой сметанообразной консистенции. Абсцессы окружены толстой соединительнотканной капсулой. Иногда в абсцессах обнаруживают творожистую крошковатую массу, которая в старых очагах подвергается кальцификации. В некоторых случаях, вследствие фиброзного воспаления общей влагалищной и белочной оболочек, отмечают сращение семенника с мошонкой. Часто наблюдается различной степени атрофия одного, реже обоих семенников, наступающая в результате сдавливания семенника сильно разросшейся вокруг него соединительной тканью, при этом на разрезе паренхима семенника имеет склеротический вид.

6.3. У овцематок заболевание проявляется абортами, чаще всего во второй половине беременности, сопровождающимися обычно метритами. Иногда рождаются мертвые или слаборазвитые ягнята, погибающие в первые дни жизни.

Патологоанатомические изменения локализуются в матке и плодовых оболочках, которые утолщаются до 2-3-х, а в некоторых случаях и до 5-ти сантиметров. Отечный послед имеет студневидную консистенцию. Плаценты темно-красные, местами с очагами некроза в виде темно-бурых пленок, покрывающих карункулы. Слизистая оболочка покрыта желто-бурым гноем. В толще ее между котиледонами встречаются мелкие, сероватые, плотные узелки. Пораженные котиледоны имеют желтовато-бурый цвет, твердые и часто сильно увеличены. Нередко в одном из рогов матки обнаруживают задержавшийся послед, иногда отмечают эндометриты и вагиниты.

Приложение № I

к Наставлению по диагностике
инфекционного эпидидимита баранов

I. Методы окраски бруцелл вида овис

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

Микроскопическая картина: бруцеллы вида овис - красные, другая микрофлора и фон препарата - синие.

Окраска мазков по Козловскому. Фиксированный на пламени мазок окрашивают 2%-ным раствором сафранина, подогревая до появления пузырьков. Затем мазок быстро промывают водой и дополнительно окрашивают 0,75 - 1%-ным водным раствором малахитового зеленого в течение 0,5 - I мин. Краску сливают, мазок промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: бруцеллы вида овис - яркокрасные, другая микрофлора и фон препарата окрашены в зеленый цвет.

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

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

Микроскопическая картина: бруцеллы вида овис - яркокрасные, другая микрофлора и фон препарата окрашены в сине-голубой цвет.

2. Приготовление питательных сред

Мясная вода. Свежее мясо крупного рогатого скота освобождают от костей, жира и сухожилий и пропускают через мясорубку. 500 г фарша заливают I л водопроводной воды и выдерживают в течение 15-18 час в прохладном месте. Затем настой кипятят в течение

30-40 мин, доливают дистиллированной водой до первоначального объема и фильтруют через ватно-марлевый фильтр или через полотно. Полученную мясную воду стерилизуют при 120° в течение 20 мин.

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

Мясо-пептонный печеночно-глюкозо-глицериновый бульон (МППГГБ). К 610 мл мясной воды добавляют 305 мл печеночной воды, 10 г пептона и 5 г хч хлорида натрия. Фильтруют через нейлоновый или ватно-марлевый фильтр, устанавливают pH 7,2, добавляют 10 г глюкозы и 20 мл глицерина. Среду разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют при 110° (0,4 атм.) в течение 30 мин. pH среды до стерилизации - 7,3 - 7,4, после стерилизации - 6,8 - 7,0.

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

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

Плотный печеночно-сывороточный и печеночно-аминопептидный агар. К 1000 мл печеночной воды добавляют 10 г пептона, 5 г хч хлорида натрия, 20 г агар-агара. К полученной смеси добавляют 17 мл 10%-ного раствора двууглекислой соды и автоклавируют при 115° (0,7 атм.) в течение 20-25 мин, фильтруют через ватный

фильтр, устанавливают pH 7,0 - 7,2 и добавляют 10 г глюкозы и 20 мл глицерина. Разливают в колбы и стерилизуют при 110° (0,4 атм.) в течение 20 мин. Хранят в прохладных условиях. Перед употреблением смесь расплавляют, охлаждают до 50° и добавляют 10-20% стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота (овец) или 10-15% аминопептида, затем разливают в пробирки или бактериологические чашки.

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

3. Определение концентрации углекислого газа

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

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

Окраска смеси	Процентное содержание CO_2 в атмосфере эксикатора
синяя	до 5
сине-зеленая	5
зеленая	10
зелено-желтая	15
желтая	20

Приложение № 2
к Наставлению по диагностике
инфекционного эпидидимита баранов

I. Приготовление фосфатно-буферного раствора для РА

Для приготовления 0,I5 М фосфатно-буферного раствора берут 23,8 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия (Na_2HPO_4), растворяют в I литре дистиллированной воды, устанавливают pH 8,6–9,0 с применением I0% раствора натрия гидроокиси или соляной кислоты, затем добавляют 5% хлористого натрия (50 г на I л раствора).

2. Приготовление физиологического раствора хлорида натрия для РДСК

2.I. Для приготовления физиологического раствора хлорида натрия в I л горячей (60–70°С) дистиллированной воды растворяют 8,5 г хлорида натрия. Раствор охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и доводят pH до 7,3 – 7,4 прибавлением раствора едкого натрия или соляной кислоты.

2.2. Для приготовления физиологического раствора хлорида натрия с добавлением ионов магния и кальция вначале готовят основные растворы солей магния и кальция путем растворения в отдельных флаконах (колбах) I г хлорида магния хч в II,8 мл и I г хлорида кальция хч – в 54,4 мл дистиллированной воды. Основные растворы этих солей хранят в холодильнике.

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

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

Кровь у барана берут из яремной вены с соблюдением правил асептики в сосуд со стеклянными или фарфоровыми бусами (для дефибринирования) или в сосуд с налитым в него раствором Алсивера в количестве, равном объему крови (для дефибринирования и консервирования). Для консервирования дефибринированной крови применяют раствор стрептомицина (Iг стрептомицина, растворенного в 20 мл физиологического раствора, на I00 мл крови).

Дефибринированная кровь пригодна для исследования в течение трех дней, консервированная стрептомицином или раствором Алсивера – в течение I2 дней.

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

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

4. Титрование комплемента в гемолитической системе

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

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

В примере, приведенном в таблице 1, титр комплемента в гемолитической системе равен 0,08.

5. Титрование гемолизина

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

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

Таблица I

Схема титрования комплемента в гемолитической системе

Компоненты	Номера пробирок									
	I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
Комплемент в разведении I:20	0,02	0,04	0,06	0,08	0,I0	0,I2	0,I4	0,I6	0,I8	0,20
Физиологический раствор	0,I8	0,I6	0,I4	0,I2	0,I0	0,08	0,06	0,04	0,02	-
Гемолизин в удвоенном титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2,5%-ная взвесь эритроцитов барана	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	Водяная баня I0 минут при 37-38°									
Примерный результат	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Таблица 2

Схема титрования гемолизина

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

Основное разведение гемолизина I:I00 (мл)	Физиологический раствор (мл)	Получаемые разведения
0,4	I,6	I:500
0,I	0,9	I:I000
0,I	I,4	I:I500
0,I	I,9	I:2000
0,I	2,4	I:2500
0,I	2,9	I:3000
0,I	3,4	I:3500
0,I	3,9	I:4000

Титром гемолизина считают наименьшее его количество, необходимое для полного гемолиза в течение I0 мин 0,2 мл взвеси эритроцитов в присутствии 0,2 мл комплемента, разведенного I:20. В приведенной таблице 2 титр гемолизина равен I:I500.

Рабочий титр гемолизина для РДСК в 3 раза выше. Так, если титр гемолизина равен I:I500, то рабочий титр в РДСК будет I:500.

6. Овисные антигены и наборы диагностикумов, используемые в серологических реакциях

Набор компонентов для серологической дифференциации культур бруцелл

Компоненты, входящие в набор, выпускают в соответствии с ТУ сыворотки в ампулах в объеме по 2 мл, антигены во флаконах в объеме по 20 мл.

В набор входят:

R -сыворотка агглютинирующая бруцеллезная – 4 ампулы;
S -сыворотка агглютинирующая бруцеллезная – 4 ампулы;
R -антиген бруцеллезный цветной – I флакон;
антиген бруцеллезный для роз бенгал пробы (РБП) – I флакон.

Антиген овисный цветной для РА представляет собой взвесь бруцелл вида овис, окрашенных роз бенгал краской. Выпускают диагностикум во флаконах по 20 мл, уложенных в коробки в соответствии с ТУ. Перед употреблением антиген тщательно встряхивают.

Набор специфических компонентов для диагностики болезни овец, вызываемой бруцеллой овис (для РДСК)

Компоненты, входящие в набор, выпускают во флаконах в объеме по 5 мл в соответствии с ТУ.

В набор входят:

антиген овисный для РДСК – 4 флакона.

Антиген представляет собой жидкость, содержащую специфические активные вещества, извлеченные из селекционированных штаммов бруцелл вида овис с помощью ультразвука. Перед употреблением антиген тщательно встряхивают;

позитивная овисная сыворотка для РДСК – 2 флакона;

негативные сыворотки для РДСК (2 серии) – по 2 флакона.

Набор препаратов для диагностики инфекционного эпидидимита баранов (для РНГА и РНАт)

Компоненты, входящие в набор, выпускают: эритроцитарный диагностикум и контрольные эритроциты в ампулах или флаконах в объеме по 4 мл, позитивная овисная и негативная сыворотка во флаконах по 5 мл в соответствии с ТУ.

В набор входят:

эритроцитарный диагностикум – 5 ампул (флаконов);

контрольные эритроциты – 3 ампулы (флакона);

позитивная овисная сыворотка – I флакон;

негативная сыворотка барана – I флакон.

Эритроцитарный диагностикум представляет собой 2,5%-ную взвесь формалинизированных и танизированных эритроцитов барана в фосфатно-буферном физиологическом растворе, сенсибилизированных антигеном бруцелла овис.

Контрольные эритроциты – 2,5%-ная взвесь формалинизированных и танизированных эритроцитов барана в фосфатно-буферном физиологическом растворе.

Перед употреблением ампулы (флаконы) с эритроцитарным диагностикумом и контрольными эритроцитами тщательно встряхивают до получения равномерной взвеси.

Антигены и наборы препаратов для диагностики инфекционного эпидидимита баранов хранят в сухом темном месте при температуре плюс 2-I2°С.

Препараты в ампулах (флаконах) без этикеток (без надписи) или с трещинами, содержащие постороннюю примесь, неразбивающиеся хлопья, плесень, с истекшим сроком годности или подвергавшиеся замораживанию, для применения не пригодны.

gost.e-ecolog.ru

_ _ _ _