DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-01.36>

**ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА PASTEURELLA
НА ОСНОВЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ В СООТВЕТСТВИИ
С СОВРЕМЕННОЙ КЛАССИФИКАЦИЕЙ**

**SPECIFIC IDENTIFICATION OF PASTEURELLA BACTERIA ON THE BASIS
OF BIOCHEMICAL PROPERTIES IN ACCORDANCE WITH MODERN CLASSIFICATION**

Лаишевцев А.И.* , Капустин А.В., научные сотрудники

Laishevtcev A.I., Kapustin A.V., Researchers

**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Москва, Россия**

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

Пименов Н.В., профессор

Pimenov N.V., Professor

**ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия**

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State
Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin»,
Moscow, Russia

*E-mail: a-laishevtsev@bk.ru

АННОТАЦИЯ

В работе приведена современная классификация бактерий рода *Pasteurella* с указанием этиологической значимости и биологических особенностей каждого вида, а также описаны их биохимические свойства, позволяющие провести идентификацию. Разработана и апробирована короткая схема проведения идентификации всех имеющихся видов бактерий *Pasteurella spp.* с использованием коллекционных штаммов и полевых изолятов пастерелл.

ABSTRACT

The paper presents modern classification of *Pasteurella* bacterias with indicating etiological significance, biological characteristics and biochemical properties which allow their identification. Developed and tested a short scheme of identification for all available types of *Pasteurella spp.* with using of strains and field isolates' collection.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Систематизация, классификация бактерий, пастереллёз, экспресс идентификация, диагностика, ферментативные свойства, биохимические особенности.

KEY WORDS

Systematization, classification of bacteria, pasteurellosis, rapid identification, diagnostics, enzymatic properties, biochemical features.

Целью данной работы является систематизация данных о современной классификации бактерий рода *Pasteurella spp.*, и разработка схемы экспресс идентификации и дифференциации видов данного рода благодаря изучению биохимических свойств.

Актуализация современной классификации бактерий и систематизация научных данных о них являются сложным и важным этапом развития биологической науки. За последние годы исторически сложившийся принцип классификации, основанный на изучении морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических,

антигенных и биологических свойств, был дополнен современными методами молекулярной биологии [1,2]. Благодаря внедрению в микробиологию молекулярно-генетических методов идентификации, произошло изменение систематического положения многих ранее описанных видов микроорганизмов. Однако такие методы идентификации возможны только при наличии дорогостоящего оборудования, отдельного помещения и высококвалифицированного кадрового обеспечения, что часто невозможно в условиях районных и региональных лабораторий. Именно поэтому для идентификации вида бактерий при постановке диагноза рекомендованы легко воспроизводимые рутинные методы, основанные на изучении сахаролитических и протеолитических свойств. Учитывая произошедшие изменения в классификации пастерелл возникла необходимость в разработке схемы для типирования всех видов данного рода, что может быть достигнуто использованием коммерческих наборов для биохимической идентификации пастерелл наиболее этиологически значимых видов, либо использованием широкого ряда питательных сред Гисса [3-6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование проводилось на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко» и ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина».

Апробацию предложенной схемы биохимической идентификации пастерелл проводили с использованием музейных штаммов бактерий коллекции типовых культур ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко: *Pasteurella aerogenes*, *P. dagmatis*, *P. multocida subsp. gallicida*, *P. multocida subsp. multocida*, *P. multocida subsp. septica*, *P. pneumotropica*, а также полевых изолятов пастерелл, выделенных в 2015-2016 годах из неблагополучных по пастереллёзу животноводческих хозяйств Астраханской, Нижегородской, Челябинской областей, Ставропольского края и Республики Мордовия.

Для проведения бактериологических исследований, культивирования и накопления бактериальной массы пастерелл использовали мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ), основу кровяного агара с добавлением 10% дефибрированной крови барана, агар МакКонки и Эндо.

Идентификация культур до вида проводилась с использованием сред Гисса, в которых в качестве индикаторной питательной среды использовалась пептонная вода с бромкрезоловым пурпурным и различные углеводы: адонит, арабиноза, галактоза, Д-глюкоза, дульцит, инозит, инулин, ксилоза, лактоза, мальтоза, маннит, манноза, мелибиоза, раффиноза, рамноза, салицин, сорбит, сахароза, трегалоза, фруктоза, целлобиоза. Дополнительно были использованы коммерческие наборы для изучения биохимических свойств *Remel Rapid NF Plus*, *Remel Rapid NH*, *API 20 NE*, *API 20 E*, *API 32 E* и *Microbact 24E Oxidase Positive*, позволяющие идентифицировать некоторые широко распространённые и клинически значимые виды пастерелл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И АНАЛИЗ ДАННЫХ

В соответствии с действующими «Методическими указаниями по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц» №22-7/82 от 20.08.1992 род *Pasteurella* spp. включает в себя шесть видов *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. ureae*, *P. pneumotropica*, *P. aerogenes*, *P. gallinarum*. В последней редакции определителя Берджи – «*Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition – 2004*» описано 18 видов данного рода: *P. multocida*, *P. aerogenes*, *P. avium*, *P. bettyae*, *P. caballi*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. gallicida*, *P. gallinarum*, *P. langaaensis*, *P. lymphangitidis*, *P. mairii*, *P. pneumotropica*, *P. skyensis*, *P. stomatis*, *P. testudinis*, *P. trehalosi*, *P. volantium*. Указанная в обоих документах классификация является устаревшей и требующей актуализации. Так на данный момент род включает в себя 14 видовых представителей [7]:

1. *P. aerogenes* – представитель нормальной микрофлоры пищеварительного тракта свиней, возбудитель оппортунистических инфекций.
2. *P. bettyae* – возбудитель оппортунистических инфекций мочеполовых органов у различных видов животных.
3. *P. caballi* – возбудитель эндокардитов, абсцессов и оппортунистических инфекций мочеполовой системы лошадей.
4. *P. canis* - представитель нормальной микрофлоры ротовой полости собак.
5. *P. dagmatis* - возбудитель оппортунистических инфекций у собак и кошек.
6. *P. langaaensis* - представитель нормальной микрофлоры респираторного тракта клинически здоровых цыплят.
7. *P. lymphangitidis* - возбудитель гнойных лимфаденитов большинства видов животных.
8. *P. mairii* – возбудитель оппортунистических инфекций у свиней, может быть причиной абортос у свиноматок.
9. *P. multocida* – возбудитель пастереллеза всех видов животных и птицы.
10. *P. oralis* - представитель нормальной микрофлоры ротовой полости кошек.
11. *P. pneumotropica* – возбудитель пастереллеза кроликов и грызунов.
12. *P. skyensis* - возбудитель пастереллеза рыб.
13. *P. stomatis* - представитель микрофлоры ротовой полости собак.
14. *P. testudinis* - возбудитель пастереллеза у рептилий, в частности черепах.

Систематическое положение некоторых видов, ранее относившихся к пастереллам, было пересмотрено: так вид *P. anatis* реклассифицирован в *Gallibacterium anatis*, *P. avium* реклассифицирован в *Avibacterium avium*, *P. gallinarum* - в *Avibacterium gallinarum*, *P. granulomatis* - в *Mannheimia granulomatis*, *P. haemolytica* - в *Mannheimia haemolytica*, *P. trehalosi* - в *Bibersteinia trehalosi*, *P. ureae* - в *Actinobacillus ureae*, *P. volantium* - в *Avibacterium volantium* [8,9,10].

Идентификация родовой и видовой принадлежности бактерий подразумевают определение морфологических, тинкториальных и культуральных свойств.

Морфологические свойства. Все виды бактерий рода *Pasteurella* представляют собой сферические, овальные или палочковидные клетки размером 0,3-1,0х1,0-2,0 мкм, расположенные одиночно, реже парно или в цепочках. При микроскопировании мазков-отпечатков тканей животных, а также мазков культур микроорганизмов, выделенных из патологического материала, пастереллы обычно имеют биполярное окрашивание. При последующих пересевах культуры биполярная окраска часто утрачивается и пастереллы выглядят как мелкие коккоподобные палочки. Спор не образуют, но имеют капсулу [11].

Тинкториальные свойства. Окрашенные по Граму культуры пастерелл имеют вид мелких грамотрицательных коккобактерий, при возможном одиночном или попарном расположении, не исключается наличие в мазках коротких цепочек бактериальных клеток. Окрашивание культур методом Романовского-Гимза или Михина позволяет выявить полиморфные биполярные палочки, окруженные крупной капсулой. В отношении биполярности бактерий рода *Pasteurella* стоит принять к сведению, что данное свойство проявляется преимущественно при изучении мазков-отпечатков патологического материала [12,13,14].

Культуральные свойства. Все виды *Pasteurella spp.* хорошо растут на обычных питательных средах - МПБ, МПА, бульон Хоттингера, агар Хоттингера, колумбийский агар, а также на неселективных высокопитательных средах - сердечно-мозговой агар, триптон-соевый агар, триптон-соевый бульон, эугоник бульон, эугоник агар. Оптимальная температура роста 37-38°C [15].

Таблица 1 – Биохимические свойства бактерий *Pasteurella* используемые для идентификации и дифференциации до видовой принадлежности

п/п	<i>Pasteurella aerogenes</i>	<i>Pasteurella bettyae</i>	<i>Pasteurella caballi</i>	<i>Pasteurella canis</i>	<i>Pasteurella dagmatis</i>	<i>Pasteurella langaaensis</i>	<i>Pasteurella lymphangitidis</i>	<i>Pasteurella mairii</i>	<i>Pasteurella multocida subsp. Gallicida</i>	<i>Pasteurella multocida subsp. Multocida</i>	<i>Pasteurella multocida subsp. Septica</i>	<i>Pasteurella oralis</i>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	<i>Pasteurella skyensis</i>	<i>Pasteurella stomatis</i>	<i>Pasteurella testudinis</i>
Каталаза	+	d	-	+	+	-	+	(+)	+	+	+	+	+	-	+	+
Оксидаза	(+)	-	-	+	+	+ ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	d	+	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	+	-	+	+	-	-	-	(+)	+	+	d	+	+	+	-	-
Аргининдекарбоксилаза	-	n	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Образование H ₂ S	+	n	n	-	-	-	n	-	+	+	+	-	(+)	n	-	-
Образование индола	(-)	-	-	d	+	-	-	-	+	+	(+)	+	+	+	+ ²	+
ОНПГ	d	-	+	-	d	+	-	d	-	-	-	-	+	-	-	(+)
Уреаза	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	n	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Желатиназа	-	n	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	d	n	-	-
Образование кислоты из:																
D-адонитола	-	n	-	-	-	-	n	-	(-)	(-)	(-)	-	(-)	-	-	n
L-арабинозы	(+)	-	-	-	-	-	+	+	d	-	-	-	d	n	-	d
Арбутина	-	-	n	-	-	n	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+ ¹
Целлобиозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n	-	-
Декстрина	+	n	n	-	+	-	n	-	d	d	d	+	d	n	-	d
Дульцитоло	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Фруктозы	+	n	+	+	+	+	n	+	+	+	+	+	+	n	+	n
D-галактозы	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	(+)
D-глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Глицерола	+	n	n	-	d	-	n	d	d	d	d	-	(+)	n	-	-
Инулина	-	n	-	-	-	-	n	-	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-
Лактозы	(-)	-	+ ¹	-	d	+ ¹	-	(+)	-	-	-	-	d	+	-	(-)
Мальтозы	+	d	(+)	-	+	-	d	d	-	-	(-)	+	d	+	-	(+)
D-маннитола	-	-	d	-	-	+	+	(+)	+	+	(+)	-	-	+	-	+
D-маннозы	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Мелицитозы	-	n	n	n	n	n	n	-	(-)	(-)	(-)	-	-	n	n	n
Мелибиозы	d	-	n	-	-	-	+	-	-	-	(-)	-	d	-	-	+
Рафинозы	d	-	+ ¹	-	+ ²	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d
L-рамнозы	d	d	(-)	-	-	-	n	-	(-)	(-)	(-)	-	(-)	-	-	+
Салицина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)
D-сорбитола	(-)	-	(-)	-	-	-	d	d	+	+	-	-	-	-	-	d
L-сорбозы	-	n	n	-	-	-	n	-	(-)	(-)	(-)	-	-	n	-	n
Сахарозы (сукрозы)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Трегалозы	-	-	-	d	d	-	+	+	-	d	+	+	(+)	+	+	d
D-силозы	+	-	d	(-)	-	-	-	+	d	+	+	+	d	-	-	+
Гидролиз эскулина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n	-	+
Рост на агаре МакКонки	+	d	-	-	-	+	d	d	d	d	d	+	d	n	-	d
Образование газа из D-глюкозы	(+)	d ³	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	n	-	-

+ - положительное значение теста.

- - отрицательное значение теста.

(+) – в большей степени положительное значение теста.

(-) – в большей степени отрицательное значение теста.

d – переменный результат значения теста.

+¹ – замедленное получение положительного значения теста.+² – слабое проявление положительного значения теста.d³ – слабое проявление переменного значения теста.

n – не определялись.

При росте на жидких питательных средах (МПБ, бульон Хоттингера) *Pasteurella spp.* вызывает равномерное помутнение с образованием слизистого осадка, который при встряхивании поднимается со дна пробирки в виде косички. Культуры бактерий в «М»-форме растут более интенсивно и дают более выраженный слизистый осадок, в «R»-форме образуют хлопьевидный или зернистый осадок. На агаризированных средах через 18-24 часа культивирования микроорганизм образует мелкие, круглые, выпуклые, полупрозрачные с гладкой поверхностью и ровными краями колонии в «S» - форме, флюоресцирующие в косо проходящем свете, колонии «М»-формы более крупные слизистые с непрозрачным центром; колонии «R»-формы - шероховатые непрозрачные.

Для определения подвижности используют полужидкий МПА, в который культуру засевают уколом с последующим инкубированием в течение 18-24 часов при температуре 37-38 °С. Культуры всех видов пастерелл неподвижны, рост в ПЖА отмечается по уколу без помутнения окружающей питательной среды [16].

Добавление к агаризированным средам 5-10 % дефибрированной крови животных способствует улучшению роста, при этом колонии возбудителя достигают размеров 1-3 мм, имеют сероватый цвет и слизистую консистенцию. Форма колоний может существенно варьировать от четких округлых и выпуклых до больших слившихся колоний с плавными размытыми краями [17].

Биохимические свойства. Для идентификации бактерий существуют коммерческие наборы, позволяющие определить наиболее значимые виды пастерелл. Набор *Remel Rapid NF Plus* позволяет идентифицировать – *P. pneumotropica*, *P. multocida* и *P. aerogenes* за 4 часа. Набор *Remel Rapid NH* позволяет произвести идентификацию вида *P. multocida* за 4 часа. Набор *API 20 NE* позволяет произвести идентификацию *P. aerogenes*, *P. multocida* и *P. pneumotropica* за 24 часа. Набор *API 20 E* позволяет произвести идентификацию *P. aerogenes* и *P. pneumotropica* за 24 часа. Набор *API 32 E* позволяет произвести идентификацию *P. aerogenes*, *P. multocida* и *P. pneumotropica* за 24 часа. Набор *Microbact 24E Oxidase Positive* позволит произвести идентификацию *P. multocida* за 24 часа.

В тех случаях, когда наборы не позволяют произвести видовую идентификацию стоит использовать отдельные тесты, так биохимические свойства всех видов бактерий рода *Pasteurella* приведены в таблице 1, схема проведения родовой идентификации приведена на рисунке 1 [18].

Для проведения родовой идентификации грамотрицательных бактерий с использованием рутинных методов стоит прибегнуть к схеме на рисунке 1.

Для проведения видовой идентификации бактерий рода *Pasteurella spp.* в разработанную схему были включены 12 наиболее воспроизводимых тестов: оксидазный тест, каталазный тест, тест на восстановление нитратов, уреазный тест, тест на орнитиндекарбоксилазу, тест на образование сероводорода, тесты на образование кислоты из D-галактозы, D-маннитола, дульцитола, D-сорбитола, декстрина и трегалозы (см. рисунок 2). Схема проведения видовой идентификации приведена на рисунке 2.

Апробирование предложенной схемы с использованием культур различных видов пастерелл позволило подтвердить работоспособность обеих схем.

Реализованный в схеме №2 подход к проведению типирования пастерелл позволяет с высокой точностью идентифицировать все существующие, на данный день, виды возбудителя с использованием минимального оборудования и минимальных экономических затрат.

Рисунок 1 – Схема проведения биохимической идентификации грамотрицательных палочковидных бактерий

Рисунок 2 – Схема проведения биохимической идентификации бактерий рода *Pasteurella*

Заключение. Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний заключается в получении из клинического и/или патологического материала чистой культуры возбудителя с последующей её типизацией. Несомненно, наибольшую достоверность таких исследований могут дать молекулярно - генетические методы, но требования к их использованию зачастую не могут быть реализованы в малообеспеченных лабораториях, поэтому идентификация бактерий проводится рекомендованными рутинными методами с определением биохимических свойств возбудителя. Существующие в свободном доступе наборы для идентификации микроорганизмов позволяют произвести типирование лишь ограниченного количества видов бактерий, в связи, с чем использование разработанной унифицированной схемы идентификации пастерелл позволит получить достоверный результат в кратчайший период.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Laishevtcev A.I. Features of biochemical identification and differentiation of *Mannheimia haemolytica*. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 54. № 6. С. 70-77.
2. Kapustin A.V. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia haemolytica*. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 52. № 4. С. 3-12.
3. Bashkirev A.P. Fundamental principles of pulsed light technique in food preservation: mini review. Entomology and Applied Science Letters. 2016. Т. 3. № 3. С. 47-49.
4. Максимович В.В. Эпизоотология и инфекционные болезни. - учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / Минск, 2012.
5. Tatarenko Y.S. The study of pathogenic properties of Enterobacterial flora of clinically healthy quails for possible detection of bacteriocarrier.// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 56. № 8. С. 67-73.
6. Тухфатова Р.Ф. Средства и методы лечения молодняка сельскохозяйственных животных при желудочно-кишечных и респираторных болезнях смешанной этиологии. - учебно-методическое пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению подготовки (специальности) 36.05.01- Ветеринария (квалификация (степень) «ветеринарный врач») / Москва, 2015.
7. Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей. Методические указания. Капустин А.В. ФГБНУ ВИЭВ им. Коваленко Я.Р. 2016
8. Health Services Advisory Committee. Safety in Health Service laboratories. Safe working and the prevention of infection in clinical laboratories and similar facilities. 2nd ed. Suffolk: HSE Books; 2003
9. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Categorisation of biological agents according to hazard and categories of containment, 4th ed. Suffolk: HSE books; 1995 (with supplements 1, 1998 and 2, 2000)
10. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, editors. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 196
11. Angen, Muters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E. & Bisgaard, M. (1999). Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49, 67-86
12. Engelhard, E., Kroppenstedt, R. M., Muters, R. & Mannheim, W. (1991). Carbohydrate patterns, cellular lipoquinones, fatty acids and phospholipids of the genus *Pasteurella* sensu stricto. Med Microbiol Immunol (Berl) 180, 79-92.
13. Davies, R. L. (2004). Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. Microbiology 150, 4199-4210.
14. Bisgaard, M. (1993). Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals. Zentralbl Bakteriell 279, 7-26.

15. Christensen, H. & Bisgaard, M. (2006). The genus *Pasteurella*. In *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol. 6, pp. 1062–1090. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
16. Foster, G., Ross, H. M., Patterson, A. P., Hutson, R. A. & Collins, M. D. (1998). *Actinobacillus scotiae* sp. nov., a new member of the family Pasteurellaceae Pohl (1979) 1981 isolated from porpoises (*Phocoena phocoena*). *Int J Syst Bacteriol* 48, 929–933
17. Mannheim, W. (1984). Family III. Pasteurellaceae POHL 1981a, 382. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 550–569. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
18. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The management, design and operation of microbiological containment laboratories. Suffolk: HSE Books; 2001