27318-87

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ АТИПИЧНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

ГОСТ 27318—87
(СТ СЭВ 5627—86)

Издание официальное

Цена 5 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 636:576.8.07:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы идентификации атипичных микобактерий

Agricultural animals.
Methods of identification of non-typical microbacteria

ГОСТ 27318—87

(СТ СЭВ 5627—86)

ОКСТУ 9809

Срок действия с 01.01.88
до 01.01.93

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт устанавливает бактериоскопический, культуральный, биохимический, биологический и серологический методы идентификации атипичных микобактерий.

Стандарт применяют при идентификации атипичных микобактерий в ветеринарных лабораториях научно-исследовательских учреждений и республиканских производственных ветеринарных лабораториях.

1. БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

1.1. Сущность метода заключается в способности микобактерий, окрашенных фуксином, удерживать краситель после длительного обесцвечивания в соляно-кислом спирте.

1.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

микроскопы биологические марки МПИ или МРП по ГОСТ 8284—78;

осветитель;

горелку газовую или спиртовую;

стекла предметные;

часы песочные на 5 мин;

петли бактериологические;

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—80;

пинцет;

бумагу фильтровальную;

Издание официальное

Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1987



фенол по ГОСТ 6417—72;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67;
кислоту соляную концентрированную по ГОСТ 3118—77, х.ч. или ч.д.а;
натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, ч.д.а.;
калия гидроокись по ГОСТ 24363—80, ч.д.а.;
фуксин основной;
глицерин по ГОСТ 6259—75;
масло иммерсионное по ГОСТ 13739—78;
ксилол по ГОСТ 9410—78 или бензин авиационный;

фуксин Циля карболовый, раствор; готовят следующим образом: 1 г основного кристаллического фуксина растирают в ступке с 5 г кристаллической карболовой кислоты и 0,5 $см^3$ этилового спирта. После растирания краски прибавляют при постоянном помешивании 90 $см^3$ дистиллированной воды. Раствор краски через 24 ч фильтруют через бумажный фильтр.

Карболовый раствор фуксина хранят во флаконах из темного стекла с притертой пробкой.

метиленовую синь;
культуры микобактерий;
соляно-кислый спирт, раствор с массовой концентрацией соляной кислоты 3%; готовят следующим образом: 3 $см^3$ концентрированной соляной кислоты добавляют к 97 $см^3$ 96%-ного этилового спирта;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

1.3. Проведение испытаний

Из отдельной колонии изучаемой культуры готовят тонкий мазок на предметном стекле, который высушивают при комнатной температуре и фиксируют над пламенем. На фиксированный препарат кладут узкую полоску фильтровальной бумаги, закрывающую мазок полностью.

На полоску фильтровальной бумаги наливают карбол фуксина Циля и нагревают до появления паров (два-три раза) в течение 5 мин (не доводя краску до кипения). Раствор краски при этом каждый раз добавляют. Дают препарату остыть, удаляют пинцетом бумагу, сливают избыток красителя и препарат промывают проточной водой.

Для обесцвечивания на предметное стекло наливают раствор соляно-кислого спирта до тех пор, пока он без окрашивания будет стекать с предметного стекла.

После обесцвечивания препарат тщательно промывают водой и окрашивают метиленовой синью в течение 3—5 мин. Затем препарат промывают водой, высушивают на воздухе и просматривают в световом микроскопе с иммерсией.

1.4. Оценка результатов

Нахождение в поле зрения микроскопа кислотоустойчивых микобактерий и отсутствие посторонних микроорганизмов является показателем чистоты испытуемой культуры.

У быстрорастущих культур микобактерий IV группы по Раньону наряду с кислотоустойчивыми встречаются и некислотоустойчивые формы микобактерий.

2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

2.1. Сущность метода заключается в получении при пересевах единичных колоний, определении морфологии и характера роста микобактерий на питательных средах.

2.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—80;

горелку газовую или спиртовую;

петли бактериологические;

термостат с автоматическим регулированием температуры;

автоклав электрический с рабочим давлением 0,15 МПа (1,5 кгс/см^2);

шкаф сушильный электрический для стерилизации лабораторного стекла с диапазоном изменения температуры от 50 до 220°С;

аппарат Коха для стерилизации питательных сред текучим паром;

pH-метр 340;

аппарат для встряхивания;

центрифугу лабораторную с частотой вращения 3000 мин$^{-1}$;

лупу с увеличением 3× и 5×;

штативы металлические для пробирок диаметром 16 мм;

пробирки бактериологические стеклянные по ГОСТ 1770—74;

пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5, 6 вместимостью 1, 2, 5 и 10 см^3 2-го класса точности по ГОСТ 20292—74;

палочки стеклянные;

пробки ватно-марлевые;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77, ч.д.а, раствор с массовой долей 0,85%;

магний лимоннокислый, ч.д.а.;

калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198—75, ч.д.а.;

магний сернокислый, ч.д.а.;

парафин по ГОСТ 23683—79;

L-аспарагин;

глицерин по ГОСТ 6259—75;

малахитовая зелень, раствор с массовой долей 2%;

спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67 с массовой долей 96 и 70%;

среду Левенштейна-Йенсена; готовят следующим образом: 2,4 г однозамещенного фосфорнокислого калия, 0,24 г магния сернокислого, 0,6 г магния лимоннокислого, 3,6 г *L*-аспарагина, 12 см³ глицерина растворяют в указанной последовательности в 600 см³ воды при слабом подогревании и стерилизуют в течение 2 ч текучим паром. К раствору добавляют 100 см³ яичной массы. Смесь фильтруют через марлевый фильтр, добавляют 200 см³ стерильного 2%-ного раствора малахитовой зелени и разливают в пробирки приблизительно по 5 см³. Свертывание проводят при 85°С в течение 45 мин.

Яичную массу готовят из свежих диетических яиц, вымытых проточной теплой водой щеткой с мылом. Вымытые яйца погружают на 30 мин в 70%-ный спирт, а затем над спиртовкой в боксе разбивают стерильным пинцетом в колбу со стеклянными шариками и хорошо перемешивают;

бульон мясо-пептонный (МПБ);

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

Примечания:

1. Для контроля стерильности указанные среды помещают в термостат с температурой 37—38°С на 2 сут.

2. При посевах используют среды, приготовленные не более чем за 14 сут. до испытания.

2.3. Проведение испытания

С целью получения единичных колоний и учета скорости роста при разных температурных режимах, а также характера роста на мясо-пептонном бульоне с поверхности отдельной колонии берут 2—5 мг испытуемой культуры микобактерий и помещают в стерильную пробирку с 1—2 см³ раствора хлористого натрия с массовой долей 0,85%.

Взятую массу микобактерий растирают стеклянной палочкой по стенке пробирки и добавляют раствор хлористого натрия до концентрации 1 мг/см³.

Взвесь культуры микобактерий высевают с помощью пипетки диаметром 3—4 мм в пять пробирок со средой Левенштейна-Йенсена и в две пробирки с мясо-пептонным бульоном. Обе пробирки с мясо-пептонным бульоном и одну пробирку со средой Левенштейна-Йенсена инкубируют при 37—38°С. По одной пробирке со средой Левенштейна-Йенсена инкубируют при 25 и 45°С. Две оставшиеся пробирки со средой Левенштейна-Йенсена ставят в термостат при 37—38°С для изучения пигментообразования.

Учет роста при различных температурах оценивают, разместив пробирки с питательными средами, инкубированными при различных температурах, рядом друг с другом, и сопоставив развитие отдельных колоний.

При оценке регистрируют, на какой питательной среде и в какой срок появляется колония бактерий, и какова ее пигментированность.

2.4. Оценка результатов

Колонии, выросшие на среде Левенштейна-Йенсена до 7 сут, а также образовавшие в течение этого срока на мясо-пептонном бульоне кольцо или пленку относят к группе IV по Раньону.

Колонии, развившиеся в сроки свыше 7 сут, относят к группам I, II и III по Раньону.

Культуры M. bovis или M. tuberculosis растут медленнее (от 21 до 70 сут).

Медленно растущие скотохромогенные микобактерии и микобактерии комплекса aviurn-intracellulare образуют придонный рост, а микобактерии комплекса nonchromogenicum преимущественно образуют кольцо или пленку на поверхности среды в более поздние сроки.

3. БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД

3.1. Сущность метода заключается в определении вида культуры или отдельного комплекса микобактерий на основании изучения их биохимических свойств путем применения отдельных тестов.

3.2. **Тест — пигментообразование**

3.2.1. Сущность теста заключается в образовании культурой пигмента в различных условиях: в темноте и на свету.

Исследованию подвергаются только медленно растущие культуры.

3.2.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:
лампу электрическую мощностью 100 Вт;
термостат с автоматическим регулированием температуры;
бумагу светонепроницаемую;
культуры микобактерий;
среду Левенштейна-Йенсена по п. 2.2;
бульон мясо-пептонный.

3.2.3. Проведение испытания

Микробную массу в разведении соответственно 10^{-4}, 10^{-5} и 10^{-6} вносят в две пробирки питательных сред. Одну пробирку с питательной средой инкубируют, завернув ее в светонепроницаемую бумагу, при полном отсутствии света при температуре 25, 37 и 45°С в течение трех недель. Другую пробирку подвергают освещению в течение 1 ч на расстоянии 1 м от источника света мощностью 100 Вт и инкубируют в течение 7 и 12 сут при тех же температурных режимах и сроках.

По истечении трех недель регистрируют выросшие на двух питательных средах колонии и их пигментированность.

3.2.4. Оценка результатов

Если колонии за время инкубирования выделили пигмент, то культуру относят к группе I по Раньону (фотохромогенная группа). Если культура образовала пигмент при полном отсутствии света, то ее относят к группе II по Раньону (скотохромогенная).

Если культура не выделила пигмента, то ее относят к группе III по Раньону (нефотохромогенная группа).

3.3. **Тест — редукция нитратов**

3.3.1. Сущность теста заключается в определении активности нитратредуктазы по количеству восстановленного из нитрата нитрита, определении микобактерий по изменению окраски.

3.3.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

лопатку платиновую;

термостат с автоматическим регулированием температуры;

автоклав электрический с рабочим давлением 0,15 МПа (1,5 кгс/см²);

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24204—80;

pH-метр 340;

пробирки бактериологические стеклянные по ГОСТ 1770—74;

натрий фосфорнокислый двухзамещенный по ГОСТ 11773—76, ч.д.а.;

калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198—75, ч.д.а.;

парадиметиламинобензальдегид, раствор с массовой долей 2% в растворе соляной кислоты с массовой концентрацией 10%;

кислоту соляную по ГОСТ 3118—77, х.ч. или ч.д.а.; раствор с массовой концентрацией соляной кислоты 10%;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

3.3.3. Подготовка к испытанию

Готовят фосфатный буферный раствор следующим образом:

растворяют 9,47 г двухзамещенного фосфорно-кислого натрия в 1 дм³ воды (раствор 1);

растворяют 9,05 г однозамещенного фосфорно-кислого калия в 1 дм³ воды (раствор 2).

Для получения 100 см³ фосфатного буфера к 61,1 см³ раствора 1 добавляют 38,9 см³ раствора 2 (pH 7,0). Полученный раствор разливают по 4 см³ в пробирки и при 120°С автоклавируют в течение 15 мин. Раствор помещают в термостат при 37°С на 24 ч, после чего проверяют на стерильность.

3.3.4. Проведение испытания

В 1 см³ фосфатного буфера суспензируют 10 мг (одна платиновая лопатка) испытуемой культуры и инкубируют при 37—38°С в течение 15—16 ч.

Образование нитрата проверяют добавлением 2 капель раствора парадиметиламинобензальдегида.

3.3.5. Оценка результатов

Появление желтой окраски свидетельствует о положительной реакции. Для контроля используют виды микобактерий, дающие положительную и отрицательную реакцию на редукцию нитратов.

3.4. **Тест — активность каталазы**

3.4.1. Сущность теста заключается в способности клеток микобактерий образовывать в процессе роста фермент каталазу, количество которой различно у разных видов микобактерий. Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный водород.

3.4.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

линейку измерительную;

пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5, 6 вместимостью 5 $см^3$ 2-го класса точности по ГОСТ 20292—74;

петлю бактериологическую;

пробирки бактериологические стеклянные по ГОСТ 1770—74;

культуры микобактерий;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

3.4.3. Проведение испытания

В пробирку с культурой, выращенной на среде Левенштейна-Йенсена при 37°С и имеющей не менее 10 мг бактериальной массы, вносят разбавленную в соотношении 1 : 1 водой перекись водорода в таком количестве, чтобы при наклонном положении она полностью покрывала культуру микобактерий. Имеющееся в пробирке до внесения раствора незначительное количество конденсационной жидкости не удаляют.

Оценку реакций проводят по интенсивности образования пузырьков кислорода, образующихся в течение 5 мин после добавления раствора к культуре, и измеряют высоту столбика пены в миллиметрах при вертикальном положении пробирки.

3.4.4. Оценка результатов

Положительной реакция считается, если образуется столбик пены высотой 45 мм и более, отрицательный — если высота столбика пены менее 45 мм или если не происходит образования пузырьков кислорода в течение 5 мин.

3.5. **Тест — аккумуляция железа**

3.5.1. Сущность теста заключается в способности испытуемых культур изменять свой цвет при воздействии лимонно-аммиачного железа.

3.5.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

термостат с автоматическим регулированием температуры;

петлю бактериологическую;

железо лимонно-аммиачное;

культуры микобактерий;
среду Левенштейна-Йенсена по п. 2.2.

3.5.3. Проведение испытания

К питательной среде Левенштейна-Йенсена добавляют лимонно-аммиачное железо в таком количестве, чтобы конечная концентрация его составляла 2%. На эту среду высевают испытуемые культуры и выдерживают в течение 7 сут при температуре 37°С.

3.5.4. Оценка результатов

Реакция считается положительной, если культуры окрашиваются в коричневый цвет, отрицательной — если культура остается прежнего цвета.

3.6. **Тест — амидазная активность**

3.6.1. Сущность теста основана на дезаминировании амидов и выделении аммиака, определяемого специальными реактивами.

3.5.4. Оценка результатов

Для проведения испытаний применяют:
автоклав;
культуры микобактерий;
петлю бактериологическую;
пробирки бактериологические стеклянные по ГОСТ 1770—74;
аппарат Коха;
весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—80;
фильтр Зейтца;
марганец сернокислый по ГОСТ 429—76, ч.д.а.;
фенол по ГОСТ 6417—72;
натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, ч.д.а., раствор с массовой долей 0,5%;
гипохлорит кальция, ч.д.а., раствор с массовой долей 1%;
кальций углекислый по ГОСТ 4530—76, ч.д.а., раствор с массовой долей 20%;
реагив Русселя, состоящий из трех компонентов (раствора сульфата марганца, фенолового раствора и раствора гипохлорита кальция). Компоненты готовят следующим образом:
раствор сульфата марганца — 66,9 мг сульфата марганца растворяют в 100 см³ воды;
феноловый раствор — 12,5 г фенола в 5 см³ воды взбалтывают и приливают 25 см³ раствора гидроокиси натрия с массовой долей 0,5%, взбалтывают до полного растворения фенола и доводят объем водой до 50 см³;
раствор гипохлорита — к 300 см³ нагретой до 90°С воды прибавляют 25 г гипохлорита кальция, взбалтывают и прибавляют 135 см³ раствора углекислого кальция с массовой долей 20%. Доводят до кипения на несколько минут, чтобы дать аммиаку улетучиться. Полученный раствор охлаждают и доводят объем водой до 500 см³.

амидный ряд: ацетамид, бензамид, карбамид, изоникотинамид, никотинамид, пиразинамид, салициламид, аллантоин, сукцинамид, мелонамид;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

3.6.3. Проведение испытания

Из каждого амида готовят раствор из расчета 400 мг/см³, стерилизуют в течение 20 мин при 100°С, а карбамид — фильтрацией через фильтр Зейтца.

0,5 см³ взвеси испытуемых микобактерий плотностью 20 мг/см³ разливают в три ряда стерильных пробирок (по 10 пробирок в каждом ряду).

10 пробирок из первого ряда в течение 20 мин выдерживают при 100°С для инактивации бактерий. Затем в три пробирки каждого вертикального ряда добавляют последовательно перечисленные амиды в количестве 0,5 см³. Пробирку инкубируют в течение 10 ч при 37°С, а затем в каждую пробирку вносят растворы реагентов в следующей последовательности:

а) 0,2 см³ сернокислого марганца;

б) 2,0 см³ раствора фенола;

в) 1,0 см³ раствора гипохлорита натрия с массовой долей 1%.

После внесения растворов реагентов пробирки хорошо встряхивают и выдерживают в течение 20 мин при 100°С. Учет реакций проводят через 60 и 90 мин.

3.6.4. Оценка результатов

Реакцию оценивают визуально и считают положительной, если в пробирке образуется сине-зеленое окрашивание.

3.7. **Тест — рост на среде с содержанием хлористого натрия с массовой долей 5%**

Сущность теста основана на способности атипичных быстрорастущих микобактерий (IV группа по Раньону) и M. triviale (III группа по Раньону) расти на среде, содержащей хлористый натрий.

3.7.1. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

термостат с автоматическим регулированием температуры;

горелку газовую или спиртовую;

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—80;

пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5, 6 вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 20292—74;

пробирки бактериологические стеклянные вместимостью 10 см³ по ГОСТ 1770—74;

бактериологические петли;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77, раствор с массовой долей 5%;

среду Левенштейна-Йенсена по п. 2.2;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

3.7.2. Проведение испытания

К 100 см³ питательной среды Левенштейна-Йенсена прибавляют 5 г хлористого натрия и хорошо смешивают перед свертыванием среды. Затем питательную среду разливают по 3—3,5 см³ в бактериологические пробирки. Подобным способом готовят и контрольные пробирки со средой, не содержащей хлористого натрия.

На питательную среду, содержащую хлористый натрий, и на среду без него высевают по 0,2 см³ исследуемой культуры плотностью 2—3 мг/см³.

Культуру сначала инкубируют при 35°С с ослабленной пробкой до испарения влаги с поверхности питательной среды, затем пробирки плотно закрывают и продолжают инкубацию в течение 6 недель.

3.7.3. Оценка результатов

Если в течение указанного времени появляется более 50 колоний на питательной среде, содержащей хлористый натрий, культуру считают толерантной, если менее 50 колоний — резистентной к содержанию хлористого натрия.

В контрольных пробирках должен быть хороший рост культур в виде множественных сливающихся колоний.

4. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *M.* avium от *M.* intracellulare

4.1. Сущность метода заключается в воспроизведении туберкулеза при введении кроликам и курам культур *M. avium*.

4.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—80;

микроскопы биологические марки МБИ или МРБ по ГОСТ 8284—78;

осветитель;

горелку газовую или спиртовую;

часы песочные по 5 мин;

шприцы вместимостью 1—2 см³;

иглы инъекционные;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

флаконы стеклянные вместимостью 10 см³;

петли бактериологические;

бумагу фильтровальную;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77 ,ч.д.а., раствор с массовой долей 0,85%;

туберкулин для птиц;
культуры микобактерий;
фенол по ГОСТ 6417—72;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67;
фуксин карболовый по п. 1.2;
масло иммерсионное по ГОСТ 13739—79;
ксилол по ГОСТ 9410—78 или бензин авиационный;
метиленовую синь;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

4.3. Подготовка к испытанию

Приготавливают взвесь из культуры микобактерий, ранее отнесенной по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам к комплексу avium-intracellulare. Бактерийную массу в количестве 8—10 мг снимают шпателем с поверхности плотной питательной среды и переносят в стерильный флакон с резиновой пробкой, предварительно взвешенный на аналитических весах. Затем флакон вновь взвешивают и по разности между первой и второй массой флакона определяют массу взятой культуры. Во флаконы добавляют раствор хлористого натрия с массовой долей 0,85% из расчета 1 см³ на 1 мг бактерийной массы.

4.4. Проведение испытания

Для постановки биологической пробы берут двух кроликов массой 2000 г и двух кур в возрасте 5 мес, не реагирующих на введение туберкулина.

Взвесь культуры в дозе 1 см³ вводят кроликам в краевую вену уха, курам — в подкрыльцовую вену.

За лабораторными животными, которым введена испытуемая культура, устанавливают наблюдение в течение 90 сут.

При развитии туберкулезного процесса у кроликов и кур после введения им взвеси культуры наблюдается истощение, снижение аппетита. В случае отсутствия падежа животных убивают через 90 сут. Павших или убитых животных вскрывают и проводят осмотр внутренних органов. Из органов готовят мазки по п. 1.3. Просмотр мазков проводят с помощью иммерсионной системы микроскопа.

4.5. Оценка результатов

Микобактерии птичьего вида у кроликов вызывают сепсис (тип Йенсена), характеризующийся резким увеличением селезенки. При этом гибель животного наступает через 13—30 сут.

M. avium при внутривенном заражении кур вызывают в большинстве случаев гибель их в течение 30 сут. Иногда куры выживают от 10 до 90 сут. На вскрытии павших или убитых кур обнаруживают много серо-желтых бугорков в печени и селезенке, а в мазках из них — значительное количество микобактерий туберкулеза.

5. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

5.1. Сущность метода заключается в определении сероваров M. avium и M. intracellulare в реакции прямой агглютинации (РА) по методу Шефера с гипериммунными сыворотками, дающими положительные результаты с гомологичными антигенами.

5.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

пластинки плексиглазовые с лунками;

штативы;

пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5, 6 вместимостью 1, 5 и 10 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 20292—74;

pH-метр 340;

раствор буферный фосфатный, pH 7,1;

гипериммунные кроличьи сыворотки комплекса avium-intracellulare различных сероваров;

фенол по ГОСТ 6417—72, водный раствор с массовой долей 0,5%;

антигены - живые культуры микобактерий;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

5.3. Подготовка к испытанию

Для серологической реакции используют культуры микобактерий, выросших в S форме.

В качестве антигена для реакции агглютинации применяют бактерийную массу культур микобактерий, выращенную на питательной среде в течение 21 сут.

Антиген готовят на фосфатном буферном растворе накануне проведения испытания в концентрации 0,3 мг/см³ с добавлением 0,5%-ного водного раствора фенола. Гипериммунные сыворотки разводят в рабочем разведении на том же растворе.

5.4. Проведение испытания

Для каждой культуры микобактерий берут по две разные сыворотки одинакового серовара. Разведенные сыворотки сероваров микобактерий комплекса avium-intracellulare в рабочем титре разливают в дозе 0,5 см³ в лунки вертикального ряда, за исключением последней лунки, которая служит для контроля. В горизонтальные ряды гнезд разливают по 0,5 см³ взвеси определяемых культур микобактерий.

В контрольные лунки наливают по 0,5 см³ фосфатного буфера и по 0,5 см³ взвеси микобактерий.

Пластинки без встряхивания помещают в термостат и инкубируют при 37°С в течение 20 ч.

Учет реакции проводят через 4 и 20 ч.

5.5. Оценка результатов

Результаты реакции оценивают в крестах:

4 креста — все агглютинационные частицы в виде зонтика осаждены на дно лунки, а надосадочная жидкость совершенно прозрачна;

3 креста — на дне лунки образовался агглютинационный зонтик, а в надосадочной жидкости наблюдается некоторая опалесценция;

2 креста — агглютинационные частицы находятся в жидкости;

1 крест — имеются следы агглютинации;

контроль — агглютинация отсутствует.

Положительной реакцией считают агглютинацию, выраженную в 4 или 3 креста, сомнительной — 2 или 1 крест и отрицательной — отсутствие агглютинации.

Схема изучения микобактерий и основные свойства видов или комплексов микобактерий приведены в приложении.

ПРИЛОЖЕНИЕ
Обязательное

Таблица 1

Основные свойства видов или комплексов микобактерий

Наименование показателя	Наименование видов и комплексов микобактерий																	
	M. tuberculosis	M. bovis	M. kansasii	M. marinum	M. similae	M. scrofulaceum	M. gordonae	M. xenopi	M. avium-intracellulare	M. nonchromogenicum	M. gastri	M. vaccae	M. fortuitum	M. chelonei	M. flavescens	M. thamnopheos	M. phlei	M. diernhoferi	M. smegmatis
1. Скорость роста	21—60	42—70	10—30	10—30	10—20	10—20	10—20	10—20	11—30	10—30	10—20	2—7	3—7	3—7	2—7	2—7	3—7	3—7	3—7
2. Рост на среде Левенштейна-Йенсена:																			
при 25°С	−	−	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
при 37°С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+
при 45°С	−	−	−	−	−	−	−	−	±	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
3. Форма колоний	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S
4. Рост на МПБ при 37°С	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. Окраска	−	−	Ф	Ф	Ф	С	С	С	−	−	−	Ф/С	−	−	С	−	С	−	−
6. Редукция нитратов	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	−	±	+	−	+	−	+	±	+
7. Аккумуляция железа	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−
8. Рост на среде с 5% хлористого натрия	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+	+	+	−	+
9. Активность каталазы	−	−	+	−	+	+	+	+	±	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−

Примечание. Буквы означают: Ф — фотохромогенная окраска (пигмент); С — скотохромогенная окраска (пигмент); R — шероховатая форма колоний; S — гладкая форма колоний.

Знак «+» означает показатель положительный; «−» — отрицательный; «∓» — преимущественно отрицательный; «±» — преимущественно положительный.

Схема изучения микобактерий

Наименование показателя	M. tuberculosis	M. bovis	Атипичные микобактерии (группы по Раньону) I		II		III		IV
			M. kansasii	M. marinum	M. scrofulaceum	M. gordonae	Комплекс avium intracellulare	Комплекс nonchromogenicum	Быстрорастущие микобактерии
(Кислотоустойчивые палочки)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1. Бактериоскопия	—	—	+	+	+	+	±	±	+
2. Рост на среде Левенштейна-Йенсена: при 25°С									
при 37°С	+	+	+	±	+	+	+	+	+
при 45°С	—	—	—	—	—	—	±	±	∓
3. Рост на МПБ: придонный	—	—	±	—	+	+	∓	∓	∓
поверхностный	—	—	∓	+	—	—	—	∓	±
4. Пигментообразование: на свету	—	—	—	+	+	+	—	—	±
в темноте	—	—	+	—	+	+	—	+	∓
5. Редукция нитратов	+	—	+	—	—	—	—	±	±
6. Активность каталазы	—	—	+	+	+	+	—		+

Примечание. Знак «+» означает показатель положительный; «—» — отрицательный; «∓» — преимущественно отрицательный; «±» — преимущественно положительный.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Госагропромом СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

Н. П. Овдиенко, канд. вет. наук (руководитель темы); **А. М. Кадочкин,** канд. вет. наук; **В. И. Косенко,** канд. вет. наук; **В. А. Шаров,** канд. вет. наук; **А. Н. Шаров,** канд. вет. наук; **В. С. Тырина,** канд. биол. наук; **Б. И. Антонов; Э. С. Плотников; А. В. Ткаченко-Кузьмин,** канд. вет. наук

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 02.06.87 № 1797.

3. СРОК ПРОВЕРКИ — 1992 г.
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ — 5 ЛЕТ

4. СТАНДАРТ ПОЛНОСТЬЮ СООТВЕТСТВУЕТ СТ СЭВ 5627—86

5. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта, подпункта, перечисления, приложения
ГОСТ 429—76	3.6.2
ГОСТ 1770—74	2.2, 3.3.2, 3.4.2, 3.6.2, 3.7.1
ГОСТ 3118—77	1.2, 3.3.2
ГОСТ 4198—75	2.2, 3.3.2
ГОСТ 4233—77	2.2, 3.7.1, 4.2
ГОСТ 4328—77	1.2, 3.6.2
ГОСТ 4530—76	3.6.2
ГОСТ 5962—67	1.2, 2.2, 4.2
ГОСТ 6259—75	1.2, 2.2
ГОСТ 6417—72	1.2, 3.6.2, 4.2, 5.2
ГОСТ 6709—72	1.2, 2.2, 3.3.2, 3.4.2, 3.6.2, 3.7.1, 4.2, 5.2
ГОСТ 8284—78	1.2, 4.2
ГОСТ 9284—75	4.2
ГОСТ 9410—78	1.2, 4.2
ГОСТ 11773—76	3.3.2
ГОСТ 13739—78	1.2, 4.2
ГОСТ 20292—74	2.2, 3.4.2, 3.7.1, 5.2
ГОСТ 23683—79	2.2
ГОСТ 24104—80	1.2, 2.2, 3.6.2, 3.7.1, 4.2
ГОСТ 24204—80	3.3.2, 3.6.2
ГОСТ 24363—80	1.2

Редактор *А. А. Зимовнова*
Технический редактор *О. Н. Никитина*
Корректор *Е. И. Евтеева*

Сдано в наб. 05.06.87 Подп. к печ. 03.09.87 1,0 усл. п. л. 1,13 усл. кр.-отт. 1,05 уч.-изд. л. Цена 5 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123840, Москва ГСП, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 883

gost.e-ecolog.ru