МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 35067— 2024

Средства воспроизводства

СПЕРМА КОБЕЛЕЙ

Технические условия

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2024

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 29 марта 2024 г. № 171-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 апреля 2024 г. № 531-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 35067—2024 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 15 мая 2024 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 3
4 Технические требования 5
5 Требования безопасности 6
6 Правила приемки 7
7 Методы исследований 7
7.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, стандартные образцы, посуда, материалы, реактивы и питательные среды 7
7.2 Подготовка к проведению исследований 11
7.3 Отбор проб 21
7.4 Методы органолептических исследований 22
7.5 Методы исследований физических свойств 23
7.6 Методы биологических исследований 25
7.7 Методы морфологических исследований 26
7.8 Методы микробиологических исследований 28
7.9 Методы молекулярно-генетических исследований. Выявление микроорганизмов рода *Mycoplasma* 44
7.10 Оформление протокола испытания 44
8 Транспортирование и хранение 44
Приложение А (справочное) Морфологические особенности бактерий рода *Clostridium* 45
Приложение Б (справочное) Культуральные и биохимические признаки бактерий рода *Clostridium* 46
Приложение В (справочное) Патологоанатомические изменения у лабораторных животных, вызванные бактериями рода *Clostridium* 48
Приложение Г (справочное) Культурально-морфологические признаки грибов рода *Candida* 49
Приложение Д (справочное) Культурально-морфологические свойства грибов отдельных видов 51
Библиография 55

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Средства воспроизводства

СПЕРМА КОБЕЛЕЙ

Технические условия

Products for reproduction. Sperm of dogs. Technical requirements

Дата введения — 2024—05—15

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сперму кобелей свежеполученную неразбавленную, свежеполученную разбавленную и замороженную (далее — сперма), предназначенную для искусственного осеменения сук.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 8.135 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандарт-титры для приготовления буферных растворов — рабочих эталонов pH 2-го и 3-го разрядов. Технические и метрологические характеристики. Методы их определения

ГОСТ 12.0.004 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения[1)]

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.008 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.2.003 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.3.002 Система стандартов безопасности труда. Процессы производственные. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.011 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 61 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 177 Водорода перекись. Технические условия

[1)] В Российской Федерации не действует до 1 сентября 2026 г.

Издание официальное

ГОСТ 975[1)] Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 1027 Реактивы. Свинец (II) уксуснокислый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 1341 Пергамент растительный. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2156 Натрий двууглекислый. Технические условия

ГОСТ 2222 Метанол технический. Технические условия

ГОСТ 2874[2)] Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4014 Красители органические. Нигрозин водорастворимый. Технические условия

ГОСТ 4148 Реактивы. Железо (II) сернокислое 7-водное. Технические условия

ГОСТ 4159 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4172 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия

ГОСТ 4232 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5833 Реактивы. Сахароза. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6259 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6672 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6691 Реактивы. Карбамид. Технические условия

ГОСТ 6709[3)] Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9284 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9293 (ИСО 2435—73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 9949 Ксилол каменноугольный. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13037 Вазелин ветеринарный. Технические условия

ГОСТ 13739 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16427 Салфетки и отрезы марлевые медицинские. Технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 20015 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 20730 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 21239 (ИСО 7741—86) Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22280 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 22300 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия

ГОСТ 22340 Аквадистилляторы медицинские электрические. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22649 Стерилизаторы воздушные медицинские. Общие технические условия

ГОСТ 23683 Парафины нефтяные твердые. Технические условия

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 70295—2022 «Глюкоза кристаллическая. Технические условия».

[2)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 51232—98. «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества».

[3)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018 «Вода дистиллированная. Технические условия».

ГОСТ 24363 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25706 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 27775 Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Термины и определения

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29230 (ИСО 835-4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ 33567—2015 Сахар молочный. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-1[1)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 7886-1 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 27775, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **бактерии группы кишечной палочки** (колиформные бактерии): Неспорообразующие грамотрицательные палочки, ферментирующие с образованием газа лактозу при 37 °С и принадлежащие к родам — *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*.

3.1.2 **биологическая проба;** биопроба: Метод исследования, основанный на заражении лабораторных животных различными способами: подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно и др. с целью идентификации микроорганизмов по вирулентности или воспроизведения и изучения инфекционного процесса и патологоанатомических изменений.

3.1.3 **бродильный титр:** Наименьший объем исследуемого материала, выраженный в $см^3$, в котором обнаружена хотя бы одна бактерия группы кишечной палочки, разлагающая углеводы на кислоту и газ при 43 °С—44 °С в течение 24 ч.

3.1.4 **гемолитические свойства:** Способность микроорганизмов гемолизировать эритроциты крови.

3.1.5 **интактная акросома:** Неповрежденный органоид сперматозоида, расположенный в передней части головки.

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения».

3.1.6 **искусственное осеменение непродуктивных животных:** Метод воспроизводства непродуктивных животных, заключающийся во взятии спермы у самцов и введении ее в половые пути самок.

3.1.7 **коли-индекс:** Показатель, указывающий на число бактерий кишечной палочки в 1 $см^3$ спермы.

3.1.8 **коли-титр:** Наименьший объем исследуемого материала, выраженный в $см^3$, в котором обнаружена одна кишечная палочка (после идентификации).

Примечание — Коли-титр выражают также степенью разведения: 1 : 10 = 0,1; 1 : 100 = 0,01 и т. д.

3.1.9 **органолептический анализ:** Исследование органолептических характеристик (цвет, внешний вид, консистенция) визуально, при помощи органов чувств (зрения).

3.1.10 **освещенность** (в данной точке поверхности): Отношение светового потока излучения, падающего на элемент поверхности, содержащий рассматриваемую точку, к площади этого элемента поверхности.

3.1.11 **партия:** Определенное количество спермодоз, оформленное одним товаросопроводительным документом.

3.1.12 **плазмокоагуляция:** Способность патогенных микроорганизмов (преимущественно стафилококков) свертывать цитратную плазму крови кролика.

3.1.13 **повторяемость** (*repeatability*): Прецизионность в условиях повторяемости.

3.1.14 **препуций:** Складки кожи, прикрывающие наружный конец (головку) полового члена.

3.1.15 **прецизионность** (*precision*): Степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях.

3.1.16 **санитарно-показательные микроорганизмы:** Все разновидности бактерий группы кишечных палочек, наличие которых является показателем загрязнения и свидетельствует о нарушении санитарного режима.

3.1.17 **спермициты:** Вещества, разрушающие сперматозоиды.

3.1.18 **спермодоза:** Доза спермы, используемой для одного осеменения.

3.1.19 **условия обозрения:** Условия, в которых проводится визуальное наблюдение, включая: угол наблюдения испытуемого образца, относительное пространственное расположение источника света, испытуемого образца и глаза, фотометрические и спектральные характеристики источника света, фотометрические и спектральные характеристики фона в окрестностях образца.

3.1.20 **условия повторяемости [сходимости]:** (*repeatability conditions*): Условия, при которых независимые результаты измерений (или испытаний) получаются одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

3.1.21 **чистая культура** (*pure culture*): Культура микроорганизма, которая представляет собой один биологический вид без содержания других форм.

3.1.22 **штамм:** Чистая культура одного вида микроорганизмов, выделенная из определенного источника, обладающая специфическими физиолого-биохимическими признаками.

3.1.23 **электроэякуляция:** Метод забора спермы от кобелей с помощью специального прибора — электроэякулятора, воздействующего на нервные волокна тазовой и пояснично-крестцовой областей посредством электрического тока низкого напряжения и малой силы; используется при невозможности получения спермы естественным физиологическим путем.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

ГРМ — гидролизат рыбной муки;

ГМФ — гидролизат мяса (говяжьего) ферментативный;

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЕМ — единицы мутности;

МПА — мясо-пептонный агар;

МПБ — мясо-пептонный бульон;

МППА — мясо-печеночный пептонный агар;

ОСО — отраслевой стандартный образец;

ПЖА — полужидкий агар;

ППД — прямолинейно-поступательное движение;

ПЦР — полимеразная цепная реакция.

4 Технические требования

4.1 Сперма должна соответствовать требованиям настоящего стандарта и [1], должна быть получена от кобелей-производителей, свободных от возбудителей инфекционных болезней в соответствии с требованиями [2], а также требованиями, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

4.2 Сперма по органолептическим, физическим, биологическим и морфологическим показателям должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 1.

Таблица 1 — Показатели качества спермы кобелей

Наименование показателя	Характеристика и норма	
	Свежеполученная неразбавленная сперма[1)]	Разбавленная и замороженная сперма[2)]
Консистенция и внешний вид	Водянистая, однородная, без посторонних примесей	Водянистая, однородная, без посторонних примесей
Цвет	Молочно-белый или белый с сероватым оттенком	Желтый или светло-желтый[3)]
pH	6,3—6,7	—
Объем эякулята, $см^3$, в том числе:	1,2—45,0	—
для кобелей массой 1,0—5,0 кг	не менее 1,2	
для кобелей массой 5,1—10,0 кг	не менее 2,2	
для кобелей массой 10,1—34,0 кг	не менее 2,4	
для кобелей массой 35,0—39,0 кг	не менее 3,9	
для кобелей массой 40,0—60,0 кг	не менее 4,5	
для кобелей массой от 60,0 кг	не менее 5,4	
первая фракция, $см^3$	0,1—12,0	—
вторая фракция, $см^3$	0,1—3,0	—
третья фракция, $см^3$	1,0—30	—
Концентрация сперматозоидов в 1 $см^3$, млн., не менее:		—
для кобелей массой 1,0—5,0 кг	110	
для кобелей массой 5,1—10,0 кг	180	
для кобелей массой 10,1—34,0 кг	209	
для кобелей массой 35,0—39,0 кг	359	
для кобелей массой 40,0—60,0 кг	210	
для кобелей массой от 60,0 кг	228	
Объем дозы для осеменения, $см^3$, не менее	—	0,5
Число сперматозоидов в спермодозе, млн., не менее	—	150
Выживаемость сперматозоидов при температуре 37 °С, ч	—	Не менее 5
Количество сперматозоидов с ППД, %, не менее	75	50

Окончание таблицы 1

Наименование показателя	Характеристика и норма	
	Свежеполученная неразбавленная сперма[1)]	Разбавленная и замороженная сперма[2)]
Количество сперматозоидов с аномальной морфологией, %, не более	20	20
Количество сперматозоидов с интактной акросомой, %, не менее	80	80
[1)] Сохраненная не более 30 мин с момента получения. [2)] После оттаивания. [3)] Допускается другой цвет спермы, обусловленный разбавителем.		

4.3 Сперма по микробиологическим показателям должна соответствовать нормам, указанным в таблице 2.

Таблица 2

Наименование показателя	Норма	
	Свежеполученная неразбавленная сперма	Разбавленная и замороженная сперма
Общее количество непатогенных микробных тел в $см^3$, не более	1000	500
Коли-титр, $см^3$, не более	0,1 или 0,3	Св. 0,111 или 0,3
Патогенные и условно-патогенные бактерии и грибы	Не допускаются	Не допускаются

5 Требования безопасности

5.1 Производственный процесс и оборудование должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.003, ГОСТ 12.3.002.

5.2 Требования к обучению персонала безопасности труда — по ГОСТ 12.0.004.

5.3 Средства защиты работающих — по ГОСТ 12.4.011, воздух рабочей зоны должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005, вентиляция — по ГОСТ 12.4.021, при работе с электрическим оборудованием руководствуются ГОСТ 12.1.019.

5.4 Требования безопасности при работе с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007.

5.5 Требования биологической безопасности, производственная санитария и санитарно-противоэпидемический режим должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.008.

5.6 Общие требования проведения микробиологических исследований и работы с микроорганизмами 1—2 групп опасности — по ГОСТ ISO 7218 или нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

5.7 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ISO/IEC 17025.

5.8 К проведению исследований допускаются квалифицированные сотрудники, имеющие опыт работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности, изучившие методики микробиологических работ.

5.9 Утилизацию спермы после определения физических, морфологических, биологических свойств производят кипячением в течение 20 мин.

5.10 Обеззараживание спермы после проведения микробиологических исследований, посевов на питательных средах, а также использованных индивидуальных средств защиты, инструментов и т. д. проводят согласно санитарно-эпидемиологическим требованиям, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6 Правила приемки

6.1 Сперму принимают партиями.

6.2 На каждую партию спермы оформляют товарно-сопроводительный документ, в котором указывают:

- наименование организации (ветеринарная клиника, ветеринарная лечебница, ветеринарный кабинет и т. д., различных организационно-правовых форм и собственности) проводившей отбор проб спермы;
- наименование организации (питомника) и адрес;
- Ф.И.О владельца кобеля-производителя и его адрес;
- наименование продукции [свежеполученная неразбавленная, свежеполученная разбавленная, замороженная сперма кобеля(ей)];
- информацию о кобеле-производителе (порода, кличка, дата рождения, номер клейма, номер свидетельства о происхождении и наименование организации его выдавшей);
- дату взятия спермы;
- дату заморозки;
- форму фасовки (флакон, пайета (соломинка), гранула);
- количество фасовочных единиц;
- объем спермы в единице упаковки, $см^3$;
- наименование организации, проводившей исследования по показателям качества, указанным в 4.2 и 4.3, дату и номер протокола исследований;
- подпись ветеринарного врача, удостоверяющая соответствие спермы требованиям [1];
- обозначение настоящего стандарта.

7 Методы исследований

7.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, стандартные образцы, посуда, материалы, реактивы и питательные среды:

- анаэростат или эксикатор 2-250 по ГОСТ 25336 со вставкой для эксикатора 1-230 по ГОСТ 9147;
- бактериологическая петля диаметром около 3 мм;
- баня водяная с обогревом, позволяющая поддерживать температуру от 0 °С до 100 °С с погрешностью ±2 °С;
- бокс биологической безопасности для микробиологических исследований;
- бумага фильтровальная по ГОСТ 12026;
- бумага пергаментная по ГОСТ 1341;
- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;
- весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г, действительная цена деления шкалы 0,001 г;
- воронка полипропиленовая;
- воронка стеклянная ВФ-100-150 по ГОСТ 25336;
- газогенерирующие пакеты, обеспечивающие микроаэрофильные и анаэробные условия;
- аквадистиллятор по ГОСТ 22340;
- дозатор пипеточный автоматический с объемом дозирования 0,01—0,1 $см^3$, с точностью ±0,04 %;
- дозатор пипеточный автоматический с объемом дозирования 0,1—1,0 $см^3$, с точностью ±0,04 %;
- камера Горяева;
- колбы мерные стеклянные 1-100-2, 1-300-2, 1-500-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770;
- корнцанг;
- микроскоп биологический различных марок с увеличением 600—1350 раз (окуляр 15х, объектив 8х, 10х, 40х, 90х);
- микроскоп флуоресцентный, оснащенный кубом флуоресцентных фильтров GFP-L EX460-500 DM 505BA 510 и с окуляром 15х и объективом 20х, 40х, 100х;
- электроплита по ГОСТ 14919;
- ножницы по ГОСТ 21239;
- оптический стандарт мутности бактерийных взвесей (ОСО мутности) 10 МЕ;
- пинцет анатомический по ГОСТ 21241;

- пипетки градуированные прямые, полного слива, 2 класса точности вместимостью 1,0 $см^3$, 2,0 $см^3$, 5,0 $см^3$, 10,0 $см^3$ по ГОСТ 29230;
- полоски для определения pH в диапазоне от не менее 5,0 ед. до не более 8,0 ед. с шагом 0,5—1,0 ед. и наличием в цветовой шкале визуальной оценки pH, равной 6,7 и 6,8 ед.;
- посуда лабораторная мерная по ГОСТ 1770;
- пробирки П1 или П2 по ГОСТ 25336;
- пробирки типа Эппендорф вместимостью 2 $см^3$;
- pH-метр с диапазоном измерения от 0 до 14 ед., ценой деления 0,1 ед. pH, погрешностью ±0,04 ед. pH;
- салфетки марлевые стерильные и нестерильные по ГОСТ 16427;
- секундомер или таймер;
- смеситель (меланжер) эритроцитарный;
- сосуд Дьюара;
- спермоприемник — емкость стеклянная или из полимерного материала одноразовая, присоединяемая к искусственной вагине, для сбора спермы, вместимостью до 50 $см^3$;
- стандарт-титры для pH-метрии, изготовленные в соответствии с ГОСТ 8.135;
- стекла покровные 18 × 18 по ГОСТ 6672;
- стекла предметные 26 × 76 по ГОСТ 9284;
- стекла шлифовальные для приготовления мазков;
- стерилизатор паровой (автоклав) по ГОСТ 22649;
- ступка 3 или ступка 4 по ГОСТ 9147;
- сушильный шкаф, поддерживающий температуру от 120 °С до 180 °С;
- столик электрообогреваемый к микроскопу, обеспечивающий поддержание температуры спермы 37 °С—38 °С;
- счетная камера Вольфгюгеля;
- счетчик колоний или лупа по ГОСТ 25706, с увеличением в 2—10 раз;
- термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С;
- термостат, поддерживающий температуру (25 ± 1) °С;
- термостат, поддерживающий температуру (44 ± 1) °С;
- холодильник бытовой с рабочим диапазоном температур 2 °С—8 °С по ГОСТ 16317;
- центрифуга лабораторная 1000 об./мин;
- цилиндры мерные вместимостью 10, 25, 50, 100, 500, 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770;
- чашки Петри ЧБН-1-100 или ЧБН-2-100 по ГОСТ 25336;
- шприцы инъекционные стерильные вместимостью 1,0 $см^3$ (инсулиновые) или 2,0 $см^3$ по ГОСТ ISO 7886-1;
- тест-штаммы микроорганизмов *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Campylobacter fetus subsp. fetus, Clostridium perfringens, Salmonella enteritidis, Proteus vulgaris, Candida albicans;*
- мыши белые лабораторные, клинически здоровые, массой 14—16 г;
- свинки морские, клинически здоровые, массой 350—400 г;
- кролики, клинически здоровые, массой 2 кг;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- азот жидкий по ГОСТ 9293;
- ацетат свинца по ГОСТ 1027;
- бромтимоловый синий;
- бульон мясо-пептонный по ГОСТ 20730;
- вазелин по ГОСТ 13037;
- вода водопроводная по ГОСТ 2874;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709;
- гидрофосфат натрия $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$;
- глицерин по ГОСТ 6259;
- глюкоза по ГОСТ 975;
- дифибринированная стерильная кровь барана;
- желатин;
- железо сернокислое ГОСТ 4148, х.ч, ч.д.а.;
- желчь говяжья сухая;

- желчь бычья натуральная стерильная;
- йод металлический по ГОСТ 4159, х.ч;
- калий йодистый по ГОСТ 4232, х.ч;
- калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4172, х.ч, ч.д.а.;
- калий хлористый по ГОСТ 4234, х.ч;
- калия гидроокись по ГОСТ 24363, х.ч, ч.д.а.;
- калия теллурит;
- кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61, х.ч.;
- кислота розоловая;
- кристалл- генцианили метилвиолет для микробиологических целей;
- ксилол по ГОСТ 9949;
- лактоза по ГОСТ 33567;
- мальтоза;
- маннит (маннитол);
- масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739;
- метанол по ГОСТ 2222, марки Б;
- метиленовый синий;
- мочевина по ГОСТ 6691, ч.д.а.;
- набор диагностический индикаторный бумажный для межродовой и видовой дифференциации *энтеробактерий*, в состав которого входят следующие компоненты:
  - диски с сорбитом, инозитом, лизином, орнитином, цитратом натрия, малонатом натрия, для определения галактозидазы, уреазы, фенилаланиндезаминазы (диски с фенилаланином, диски с хлоридом железа), сероводорода, для реакции Фогеса-Проскауэра;
  - полоски для определения оксидазы и индола;
- набор для биохимической идентификации анаэробных бактерий, в состав которого входят следующие компоненты:
  - микротитровальные пластинки с субстратами для тестов: индол, глюкоза, мальтоза, фруктоза, галактоза, лактоза, мелецитоза, уреаза, нитраты, сахароза, салицин, трегалоза, маннитол, рамноза, N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза, β-глюкозидаза, эскулин, манноза, раффиноза, целлобиоза, ксилоза, арабиноза и сорбитол;
  - инструкция;
  - цветная шкала для учета результатов;
  - полиэтиленовые пакетики для инкубации;
  - бланки для регистрации результатов;
  - суспензионная среда;
  - реактив для теста на индол;
  - реактив для теста на нитраты;
  - парафиновое (вазелиновое) масло, стерильное;
- набор для идентификации анаэробных бактерий, в состав которого входят следующие компоненты:
  - стрипы из микролунок, содержащих дегидрированные субстраты (активные ингредиенты) для тестов: L-триптофан, мочевина, D-глюкоза, D-маннит, D-лактоза, D-сахароза, D-мальтоза, салицин, D-ксилоза, L-арабиноза, желатин (бычий), эскулин железа цитрат, глицерин, D-целлобиоза, D-манноза, D-мелецитоза, D-раффиноза, D-сорбит, L-рамноза, D-трегалоза;
  - контейнеры для инкубации;
  - суспензионная среда;
  - бланки для учета результатов;
  - инструкция, поставляемая в наборе;
- реактивы и материалы, не включенные в набор:
  - стандарт МакФарланда (3 McF);
  - реактив для выявления подкисления сред с углеводами;
  - реактив для теста на индол;
  - реактив для теста на каталазу (3 %-ная перекись водорода);
  - минеральное масло;
- набор для идентификации бактерий рода *Campylobacter*, в состав которого входят следующие компоненты:

- стрипы из микролунок, содержащих дегидрированные субстраты (активные ингредиенты) для тестов: мочевину, нитрат калия, 5-бром-4-хлор-3-индоксилацетат, гиппурат натрия, γL-глутаминовую кислоту-β-нафтиламид, трифенилтетразолий хлорид, пироглутаминовая кислота-β-нафтиламид, L-аргинин-4-метокси-β-нафтиламид, аспарагиновая кислота-β-нафтиламид, 2-нафтилфосфат, тиосульфат натрия, D-глюкоза, сукцинат натрия, налидиксовая кислота, цефазолин, натрия ацетат, натрия пропионовая, кислота яблочная, кислота тринатрийцитрат, эритромицин;
- стерильный 0,85 %-ный раствор натрия хлорида;
- контейнеры для инкубации;
- стандарт МакФарланда (6 McF);
- бланки для учета результатов;
- инструкция, поставляемая в наборе;
- реактивы и материалы, не включенные в набор:
- реактивы для теста на индол;
- реактив для определения гидролиза гиппуровой кислоты;
- реактив для выявления подкисления сред с углеводами;
- минеральное масло;
- набор для биохимической дифференциации энтеробактерий, в состав которого входят следующие компоненты:
- пластина полимерная, содержащая субстраты для тестов, предназначенные для: выявления уреазы, β-D-галактозидазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, аргининдигидролазы; образования сероводорода, индола, ацетоина; ферментацию глюкозы, сахарозы, маннита, малоната, цитрата, цитрата натрия с глюкозой, инозитола, сорбитола, арабинозы, мальтозы;
- альфа-нафтол;
- пара-диметиламинобензальдегид;
- хлорид железа (3+) гексагидрат;
- калия гидроксид;
- буферный раствор;
- вазелиновое масло;
- таблица биохимических свойств энтеробактерий;
- набор для биохимической идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в состав которого входят следующие компоненты:
- стрипы из микролунок, содержащих дегидрированные субстраты (активные ингредиенты) для тестов: 2-нитрофенил-β-D-галактопиранозид, L-аргинин, L-лизин, L-орнитин, натрия цитрат трехзамещенный, натрия тиосульфат, мочевина, L-триптофан, натрия пируват, желатин (бычий), D-глюкоза, D-маннит, инозит, D-сорбит, L-рамноза, D-сахароза, D-мелибиоза, амигдалин, L-арабиноза;
- реактивы и материалы, не включенные в набор:
- стерильный 0,85 %-ный раствор натрия хлорида;
- реактив для выявления ферментации триптофандеаминазы;
- реактивы для теста на индол;
- реактивы для постановки реакции Фогеса-Проскауэра;
- реактив для теста на оксидазу;
- минеральное масло;
- набор для быстрого дифференцированного окрашивания биопрепаратов, в состав которого входят следующие компоненты:
- раствор № 1 (фиксатор);
- раствор № 2 («розовый»);
- раствор № 3 («синий»);
- буферная смесь;
- набор для биохимической идентификации *Enterobacteriaceae*, в состав которого входят следующие компоненты:
- планшет полимерный с крышкой стрипованный, маркированный, содержащий субстраты (активные ингредиенты) для тестов, определяющих: наличие уреазы, образование индола, наличие лизиндекарбоксилазы, утилизацию маннита, цитрата натрия, сахарозы, инозита, наличие фенилаланиндезаминазы, образование сероводорода, наличие аргининдигидролазы, орнитиндекарбоксилазы, утилизацию лактозы, малоната натрия, сорбита, дульцита, мальтозы, наличие β-галактозидазы, утилизацию арабинозы, рамнозы, адонита, рафинозы, салицина, глюкозы, наличие нитратредуктазы;

- стерильная пленка (защитная пленка);
- масло вазелиновое стерильное;
- реактив по Эрлиху;
- 10 %-ный раствор хлорида железа (III);
- 1 %-ный раствор риванола;
- 1 %-ный раствор кислоты хлористоводородной;
- натрия гидрокарбонат по ГОСТ 2156, ч.д.а.;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х.ч. или ч.д.а.;
- натрий лимоннокислый 5,5-водный по ГОСТ 22280, ч.д.а.;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный по ГОСТ 4172, ч.д.а;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233, х.ч.;
- нейтральрот;
- нигрозин водорастворимый по ГОСТ 4014;
- парафин по ГОСТ 23683;
- пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805;
- перекись водорода по ГОСТ 177;
- пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии (ПБДЭ);
- реактив Эрлиха;
- сахароза по ГОСТ 5833;
- соляная кислота концентрированная (ρ 1,18—1,19 г/см) по ГОСТ 3118;
- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;
- твин-80;
- тест-система для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* в биологическом материале методом ПЦР, в состав которой входят следующие компоненты:
  - ПЦР-смесь-1-R;
  - ПЦР-смесь-2 blue;
  - минеральное масло для ПЦР;
  - положительный контрольный образец ДНК *Mycoplasma hominis*;
  - ДНК-буфер;
  - отрицательный контрольный образец;
- фенол кристаллический, ч.д.а.;
- фуксин кислый;
- фуксин основной для микробиологических целей;
- фурацилин;
- хлороформ по ГОСТ 20015;
- экстракт дрожжевой;
- эозин водорастворимый;
- эфир по ГОСТ 22300;
- эфир петролейный, ч.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и испытательного оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных.

Допускается использование готовых и сухих питательных сред, предназначенных для указанных целей, а также сред, приготовленных по прописи производителя. Питательные среды должны соответствовать ГОСТ ISO 11133.

Допускается использование оборудования и материалов (чашек Петри, пипеток, пробирок, флаконов, бутылок) однократного применения, аналогичных по техническим характеристикам, которые подходят для использования в микробиологии и не содержат веществ, подавляющих рост микроорганизмов.

7.2 Подготовка к проведению исследований

7.2.1 Приготовление растворов и реактивов

7.2.1.1 Приготовление 3 %-ного раствора натрия хлористого

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 3,0 г натрия хлористого и растворяют в дистиллированной воде, доливая до метки.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 2) °С не более 30 сут.

7.2.1.2 Приготовление 0,9 %-ного раствора натрия хлористого

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят навеску 0,9 г хлористого натрия и растворяют в 91,0 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 2) °С не более 30 сут.

7.2.1.3 Приготовление 2,9 %-ного раствора натрия лимоннокислого 5,5-водного

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят навеску 2,9 г натрия лимоннокислого 5,5-водного, растворяют в дистиллированной воде, доливая до метки и тщательно перемешивают. Раствор помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С.

Срок хранения раствора при температуре (37 ± 1) °С не более 1 сут.

7.2.1.4 Приготовление эозин-нигрозиновой краски

1,5 г эозина и 10,0 г нигрозина растворяют в мерной колбе вместимостью 100 $см^3$ в 3 %-ном растворе лимоннокислого натрия по 7.2.1.5 с pH (7,2 ± 0,1), доливая раствор до метки.

Допускается применять растворы без фоновых красок (нигрозина). При этом готовят только 1 %—5 %-ный раствор эозина на 3 %-ном растворе лимоннокислого натрия с pH (7,2 ± 0,1).

7.2.1.5 Приготовление 3 %-ного раствора лимоннокислого натрия с pH (7,2 ± 0,1)

В колбе вместимостью 100 $см^3$ растворяют 3,0 г лимоннокислого натрия в дистиллированной воде, доливая раствор до метки.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 2) °С не более 10 сут.

Для доведения 3 %-ного раствора лимоннокислого натрия до pH (7,2 ± 0,1) добавляют 1 %-ный раствор лимонной кислоты.

Полученный раствор используют в течение 1 сут.

Приготовление 1 %-ного раствора лимонной кислоты: в колбе вместимостью 100 $см^3$ растворяют 1,0 г лимонной кислоты в дистиллированной воде, и доливают раствор до метки.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 2) °С не более 10 сут.

7.2.1.6 Приготовление буферной смеси из набора для быстрого дифференцированного окрашивания биопрепаратов

В мерную колбу вместимостью 300 $см^3$ вносят 1,0 $см^3$ буферной смеси из тест-набора «Дифф-Квик» и доводят объем дистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 2) °С не более 30 сут.

7.2.1.7 Приготовление 1 %-ного раствора эозина

В мерную стеклянную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 1,0 г эозина и растворяют в дистиллированной воде, тщательно перемешивают и доводят объем раствора до метки.

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 2) °С не более 30 сут.

7.2.1.8 Приготовление смеси этилового спирта с эфиром петролейным

В колбе вместимостью 100 $см^3$ смешивают этиловый спирт и петролейный эфир в равных пропорциях (1 : 1).

Срок хранения раствора при температуре (20 ± 2) °С не более 30 сут.

7.2.2 Приготовление питательных сред и реактивов для микробиологических исследований

7.2.2.1 Приготовление 0,9 %-ного раствора натрия хлорида (физиологический раствор)

0,9 г хлористого натрия растворяют в 100,0 $см^3$ дистиллированной воды, разливают в пробирки по 5,0 $см^3$ и по 10,0 $см^3$ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Готовый раствор хранят при температуре (20 ± 2) °С не более 14 сут.

7.2.2.2 Приготовление мясо-пептонного бульона, мясо-пептонного агара и мясной воды

10,0 г пептона и 5,0 г хлористого натрия добавляют к 1 $дм^3$ мясной воды. Устанавливают pH 7,0—7,2, кипятят, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин. При выпадении осадка в мясо-пептонном бульоне его повторно фильтруют с последующей стерилизацией.

Для приготовления мясо-пептонного агара в 1 $дм^3$ мясо-пептонного бульона перед стерилизацией добавляют 15,0—20,0 г агар-агара и кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. Устанавливают pH 7,0—7,2, разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Приготовление мясной воды: мясо освобождают от костей, жира, фасций и сухожилий, режут на кусочки и пропускают через мясорубку. К фаршу добавляют двойное по массе количество воды, пере-

мешивают и выдерживают при температуре (5 ± 3) °С в течение 18—20 ч. Затем смесь помешивают и кипят в течение 1 ч. Жир, пену и всплывающие кусочки во время кипячения несколько раз удаляют, а воду добавляют до первоначального объема. Контроль окончания кипячения: 2,0—3,0 $см^3$ экстракта пропускают через бумажный фильтр в пробирку. Если фильтр прозрачный, кипячение заканчивают. Мясную воду сливают, фарш при этом отжимают через 2—3 слоя марли, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы вместимостью не более 2 $дм^3$ и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 40 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре от (5 ± 3) °С не более 3 мес.

Примечание — Вместо указанного мясо-пептонного агара, мясо-пептонного бульона допустимо применение готового сухого питательного агара (ГМФ-агар (бульон), ГРМ-агар (бульон)), из которого готовят питательную среду в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.3 Приготовление мясо-пептонного агара с 1 % глюкозы

К мясо-пептонному бульону, приготовленному по 7.2.2.2, добавляют 2 % агар-агара, предварительно измельченного, замоченного и хорошо промытого водой. Среду кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. При помутнении среды ее просветляют. Агар в горячем состоянии фильтруют через вату, разливают во флаконы или колбы и стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение 10—20 мин. К расплавленному мясо-пептонному агару добавляют стерильный концентрированный (40 %-ный и более) раствор глюкозы из расчета ее содержания в мясо-пептонном агаре в количестве 1 % и стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при температуре (105—110) °С. Готовая среда должна иметь pH 7,0—7,2. Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре от (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Примечание — Вместо указанного мясо-пептонного агара допускается применение готового сухого питательного агара (ГМФ-агар, ГРМ-агар), из которого готовят питательную среду в соответствии с указаниями, прилагаемыми к препарату, и добавляют 1 % глюкозы.

7.2.2.4 Приготовление мясо-пептонного агара с 5 % крови (5 %-ный кровяной агар)

К расплавленному стерильному 2,0 %-ному мясо-пептонному агару, приготовленному по 7.2.2.2 и охлажденному до 45 °С (не выше), соблюдая правила стерильности, прибавляют 5,0 % дефибринированной, стерильно взятой крови барана. Приготовленную среду разливают в стерильные чашки Петри (предварительно нагретые в термостате) слоем в 5 мм, дают застыть, подсушивают в термостате. Слой агара должен быть равномерно окрашен в красный цвет.

Готовую среду хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 2 сут.

Примечание — Вместо указанного мясо-пептонного агара допустимо применение готового сухого питательного агара (ГМФ-агар, ГРМ-агар), из которого готовят питательную среду, к которой добавляют 5 % дефибринированной, стерильно взятой крови барана.

Приготовление дефибринированной крови барана. В стерильную колбу (со стеклянными бусами) вместимостью 50 $см^3$ помещают только что взятую стерильно кровь барана и непрерывно встряхивают в течение 15 мин. В результате чего находящийся в крови фибрин выпадет в осадок, обволакивая бусы. Дефибринированную кровь в асептических условиях сливают в другую стерильную колбу или пробирку.

Дефибринированную кровь хранят при температуре (5 ± 1) °С в течение 7 сут.

7.2.2.5 Приготовление мясо-пептонного бульона с содержанием 6,5 % натрия хлорида (солевой бульон)

К 100,0 $см^3$ мясо-пептонного бульона с pH 7,0, приготовленного по 7.2.2.2, добавляют 6,5 г хлористого натрия. Разливают в пробирки по 5,0 $см^3$ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С 20 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.2.6 Приготовление среды Булира

На 1 $дм^3$ мясо-пептонного бульона добавляют 2,5 г маннита, устанавливают pH 7,0—7,1 и кипятят 15 мин. Добавляют насыщенный водный раствор нейтральрота до окрашивания среды в вишнево-красный цвет. Среду фильтруют, разливают в пробирки с поплавками по 5,0—7,0 $см^3$ и автоклавируют в течение 15 мин при температуре (121 ± 1) °С.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 7 сут.

7.2.2.7 Приготовление среды Эйкмана (глюкозо-пептонная)

В 1 дм^3 водопроводной воды растворяют 10,0 г пептона и 5,0 г хлористого натрия. Среду кипятят и фильтруют. Добавляют 10,0 г глюкозы и устанавливают pH 7,4. Повторно кипятят и при необходимости фильтруют. В среду добавляют 0,026 г бромтимолового синего. Среду разливают в пробирки с поплавками по 5,0—7,0 см^3. Среду стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 20 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 7 сут.

7.2.2.8 Приготовление среды лактозо-пептонной (типа Эйкмана)

В 1 дм^3 дистиллированной воды растворяют при нагревании 10,0 г пептона, 5,0 г натрия хлористого, 5,0 г лактозы. Устанавливают pH 7,4—7,6, добавляют 1,0 см^3 1,6 %-ного спиртового раствора бромтимолового синего и разливают по 5,0—7,0 см^3 в пробирки с поплавками. Среду стерилизуют при температуре (112 ± 2) °С 12 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 7 сут.

7.2.2.9 Приготовление среды Кесслер

10,0 г пептона, 2,5 г лактозы, 5,0 г сухой говяжьей желчи или 50,0 см^3 натуральной желчи, 2,0 см^3 раствора генцианвиолета, или кристаллического фиолетового, или метилового фиолетового добавляют к 1000,0 см^3 дистиллированной воды (в случае использования натуральной желчи — к 950,0 см^3 дистиллированной воды), тщательно перемешивают, нагревают на слабом огне до кипения, кипятят 1—2 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и охлаждают до (45—55) °С. Значение pH после стерилизации при 25 °С должно быть (7,3 ± 0,2). Среду разливают по 5,0—7,0 см^3 в пробирки с поплавками и стерилизуют в течение 20 мин при температуре (115 ± 1) °С.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

Приготовление раствора генцианвиолета, или кристаллического фиолетового, или метилового фиолетового концентрацией 10,0 г/дм^3.

1,0 г одной из анилиновых красок переносят в фарфоровую ступку и постепенно растворяют в дистиллированной воде. Раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100,0 см^3 и доливают дистиллированной водой до метки.

7.2.2.10 Приготовление бульона МакКонки

20,0 г пептона, 10,0 г лактозы, 5,0 г хлористого натрия, 5,0 г сухой говяжьей желчи или 50,0 см^3 натуральной желчи, 1,0 см^3 раствора бромкрезолового пурпурного добавляют к 1 дм^3 дистиллированной воды (если используют натуральную желчь — к 950,0 см^3 воды), тщательно перемешивают, нагревают на слабом огне до кипения и кипятят 1—2 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают до 45 °С—55 °С, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации она составляла при 25 °С (7,2 ± 0,1). Среду разливают по 10,0 см^3 в пробирки с поплавками и стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

Приготовление щелочного раствора бромкрезолового пурпурного

1,0 г бромкрезолового пурпурного переносят в фарфоровую ступку с 19,0 см^3 раствора гидроокиси натрия концентрации 0,1 моль/дм^3 и после растворения добавляют 80,0 см^3 дистиллированной воды.

7.2.2.11 Приготовление среды Кода (SDS-бульон: питательная среда для выделения и идентификации энтеробактерий сухая)

Пептон ферментативный сухой — 13,0 г, натрия хлорид — 6,6 г, лактозу — 10,0 г, сульфанол — 2,2 г, бромтимоловый синий, индикатор — 0,05 г, натрий углекислый — (0,28 г) добавляют к 1 дм^3 воды дистиллированной (до 1 дм^3), кипятят 1—2 мин, фильтруют через бумажный фильтр, охлаждают, устанавливают pH 7,6—8,0, кипятят и разливают по 5,0 см^3 в стерильные пробирки. Готовая к употреблению среда должна быть прозрачной, зеленовато-синего цвета.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 7 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.12 Приготовление среды Эндо

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.13 Приготовление среды Левина

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.14 Агар МакКонки

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.15 Приготовление трехсахарного агара с мочевиной (по Олькеницкому)

Аммоний-железо (II) сульфат [$FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$] — 0,2 г, натрий тиосульфат ($Na_2S_2O_3 \times \times 5H_2O$) — 0,3 г предварительно растворяют в 50,0 $см^3$ дистиллированной воды. 10,0 г лактозы, 10,0 г сахарозы, 1,0 г глюкозы, 10,0 г мочевины растворяют при подогревании в водяной бане в объемах 50,0 $см^3$ дистиллированной воды каждый. 25,0 г сухого питательного агара расплавляют в 750,0 $см^3$ дистиллированной воды при нагревании и помешивании. Затем все ингредиенты смешивают с расплавленным агаром, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Устанавливают pH 7,2—7,4. Добавляют 4,0 $см^3$ индикатора фенолового красного (0,4 %-ный водный раствор), хорошо перемешивают, разливают в пробирки по 6—7 $см^3$. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 20 мин или при температуре (112 ± 2) °С 15 мин. Среду скашивают, оставляя столбик не менее 2—2,5 см. Готовая среда бледно-розового цвета.

Готовую среду до использования хранят в течение 3 сут в темном месте при температуре (20 ± 2) °С или в течение 14 сут при температуре (5 ± 3) °С.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.16 Агар Клиглера

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

Примечание — Готовая к употреблению среда имеет красновато-бурый или оранжево-красный цвет. При скашивании следует оставлять столбик высотой 2—2,5 см.

7.2.2.17 Цитратный агар Симмонса

Коммерческую сухую среду готовят согласно указаниям на этикетке.

Примечание — Расплавленную среду скашивают без столбика.

7.2.2.18 Приготовление полужидкого агара (ПЖА) для определения подвижности

В 1 $дм^3$ бульона Хоттингера добавляют 4,0 г натрия хлорида и 3,0 г агар-агара, кипятят до полного растворения агара при постоянном помешивании, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, охлаждают, устанавливают pH 7,2—7,4. Разливают в пробирки по 5,0—7,0 $см^3$. Среду стерилизуют 30 мин при (121 ± 1) °С и охлаждают в вертикальном положении.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.19 Приготовление среды Кларка

Растворяют 5,0 г пептона, 5,0 г калия гидрофосфата, 5,0 г глюкозы в 1000,0 $см^3$ воды дистиллированной, кипятят 2—3 мин, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают pH 6,9—7,0, разливают в пробирки по 5,0—7,0 $см^3$. Стерилизуют 20 мин при температуре (112 ± 1) °С или по 20 мин три дня текучим паром.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

Примечание — Среду Кларка применяют для постановки реакций с метиловым красным (метилротом) и Фогес-Проскауэра.

7.2.2.20 Приготовление агара с фенилаланином

В 1 $дм^3$ холодной дистиллированной воды растворяют 3,0 г дрожжевого экстракта сухого (или экстракта жидкого — 100,0 $см^3$), нагревают, затем последовательно добавляют 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г натрия гидрофосфата, 2,0 г L-фенилаланина (или DL-фенилаланина), 12,0 г агар-агара, кипятят до полного расплавления агара 5—10 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают pH 7,0—7,2 и разливают по 5,0 $см^3$ в пробирки. Стерилизуют 30 мин при температуре (112 ± 1) °С и охлаждают в скошенном положении. Готовая среда не окрашена.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.21 Приготовление среды с мочевиной (по Преусу)

К стерильному расплавленному агару на бульоне Хоттингера или мартеновском бульоне (бульон Хоттингера или мартеновский бульон — 1000,0 $см^3$, агар-агар — 15,0 г) с pH 6,9—7,0 добавляют 5,0 г глюкозы, 20,0 $см^3$ раствора мочевины и 12,0 $см^3$ индикатора бромтимолблау. Среду разливают в стерильные пробирки по 5,0 $см^3$ и стерилизуют однократно текучим паром 20 мин.

Перед употреблением среду скашивают. Готовая среда имеет зеленовато-оливковый цвет.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.22 ЦПХ-агар

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.23 ХайФлюоро агар

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.24 Приготовление бульона Жиолитти-Кантони

В 1 $дм^3$ дистиллированной воды добавляют 10,0 г казеинового пептона, 5,0 г говяжьего экстракта, 20,0 г маннита, 1,2 г глицина, 1,0 г Твин 80, 3,0 г пирувата натрия, 5,0 г дрожжевого экстракта, 5,0 г хлорида натрия, 5,0 г хлорида лития. Тщательно перемешивают и нагревают. Кипятят в течение 1 мин до полного растворения. Охлаждают до комнатной температуры и устанавливают pH так, чтобы после стерилизации он составлял (6,9 ± 0,2) при температуре 25 °С. Разливают в пробирки по 9,0 $см^3$. Стерилизуют автоклавированием при (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Охлаждают до температуры 45 °С — 50 °С и асептически добавляют 0,1 $см^3$ 1 %-ного раствора теллурита калия в каждую пробирку. Поверх среды вносят по 5,0 $см^3$ стерильного вазелинового масла по 7.2.2.25. Перед использованием пробирки со средой прогревают в водяной бане 15 мин при температуре 100 °С для удаления воздуха.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 7 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке (бульон Жиолитти-Кантони одинарной концентрации).

7.2.2.25 Приготовление стерильного масла вазелинового

Масло разливают по 20,0—50,0 $см^3$ в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

Масло вазелиновое до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более трех месяцев.

7.2.2.26 Приготовление агаризованной среды Байрд-Паркер

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.27 Агар Фогеля-Джонсона

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.28 Среда № 10 для идентификации *Staphylococcus aureus*

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.29 Приготовление желточно-солевого агара

Желточно-солевой агар готовят на основе сухого питательного агара или мясо-пептонного бульона или бульона Хоттингера.

При использовании МПБ к последнему добавляют 2,0 % агар-агара и 6,5 % хлористого натрия. При использовании бульона Хоттингера с содержанием аминного азота 150,0 мг % для получения солевого агара добавляют 2,0 % агар-агара и 6,5 % хлористого натрия.

В случае использования сухого питательного агара к последнему добавляют 6,5 % хлористого натрия.

Солевой агар разливают во флаконы по 200,0 $см^3$ и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 30 мин.

На 100,0 $см^3$ расплавленного и остуженного до 45 °С солевого агара добавляют 20,0 $см^3$ рабочего раствора желтка, размешивают и в условиях бокса, разливают в чашки по 15—17 $см^3$.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 14 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

Приготовление рабочего раствора желтка.

На дно стерильной чашки помещают яйцо, которое предварительно тщательно протирают ватой, смоченной спиртом. Пинцетом пробивают с двух противоположных сторон яйца 2 отверстия. Через одно из этих отверстий из яйца полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную банку с 5—6 бусинами. К желтку постепенно добавляют частями по

20,0—30,0 см^3, 180,0—200,0 см^3 стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Затем содержимое тщательно встряхивают в течение 1 мин.

7.2.2.30 Приготовление молочно-солевого агара

Непосредственно перед посевом к 1 дм^3 расплавленного и охлажденного до температуры 60 °С — 70 °С мясо-пептонного агара, содержащего 65,0 г хлористого натрия, с pH (7,4 ± 0,1), добавляют 100,0 см^3 стерильного обезжиренного молока. Тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 3 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.31 Приготовление среды Китта — Тароцци

Печеночную воду — 250,0 см^3, мясо-пептонный бульон с pH 7,0 — 750,0 см^3, натрия хлорид — 1,25 г смешивают, устанавливают pH 7,6—7,8 и кипятят 15 мин. Среду фильтруют через бумажный фильтр. 100,0 г печени крупного рогатого скота режут на кусочки массой по 1,5—2 г и помещают в пробирки по 2—3 кусочка, заливают по 7,0—8,0 см^3 бульона и добавляют по 0,5 см^3 вазелинового масла по 7.2.2.25. Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 30 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 90 сут.

Коммерческую сухую среду готовят согласно указаниям на этикетке.

7.2.2.32 Приготовление среды Вильсон-Блера

100,0 см^3 3,0 %-ного мясо-пептонного агара с 1,0 % глюкозы расплавляют в водяной бане и добавляют 10,0 см^3 20,0 %-ного раствора сульфита натрия и 1,0 см^3 раствора 8,0 %-ного хлорного железа. Оба раствора готовят на стерильной дистиллированной воде. Среду после приготовления не стерилизуют.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 3 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.33 Приготовление кровяного агара по Цейсслеру

К 3,0 %-ному мясо-пептонному агару добавляют 1,0 % — 2,0 % глюкозы, устанавливают pH 7,0—7,2 и разливают во флаконы по 100,0 см^3, стерилизуют при (112 ± 1) °С в течение 30 мин. Перед употреблением к расплавленной и охлажденной до 45 °С среде добавляют 15,0 % — 20,0 % свежевзятой дифибринированной крови по 7.2.2.4. Среду разливают в чашки Петри.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 3 сут.

7.2.2.34 Приготовление молочной среды

Телячью печень разрезают на кусочки по 1,0—1,5 г и кипятят в тройном по весу количестве водопроводной воды 30 мин, затем промывают водопроводной водой, подсушивают фильтровальной бумагой, помещают в стерильные пробирки по два-три кусочка и сверху наливают по 8,0—10,0 см^3 цельного молока. Стерилизуют текучим паром трижды по 20 мин ежедневно.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Примечание — Вместо указанной печени допустимо добавление на каждую пробирку с 10,0 см^3 стерильного цельного молока по 1,5—2 см^3 стерильной сыворотки крови барана или быка. Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 3 сут.

7.2.2.35 Приготовление среды с углеводами для определения биохимических свойств клостридий

К полужидкой пептонной среде (1,0 % пептона, 0,5 % хлорида натрия, 0,5 % агар-агара) с pH 7,4 после ее расплавления добавляют 0,5 % нужного углевода (глюкоза, сахароза, маннит, глицерин, мальтоза, галактоза) и 1,0 % кислого фуксина, перемешивают и разливают в пробирки по 10,0—12,0 см^3. Стерилизуют при (112 ± 1) °С 30 мин и хранят столбиками. Перед употреблением агар регенерируют в кипящей водяной бане в течение 30 мин, охлаждают до 50 °С.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.2.36 Приготовление питательного желатина

В 1 дм^3 дистиллированной воды добавляют 5,0 г пептического перевара животной ткани, 3,0 г мясного экстракта, 120,0 г желатина. Подогревают до 50 °С и разливают в пробирки по 7,0—9,0 см^3. Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Конечное значение pH (6,8 ± 0,2) при 25 °С.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

Коммерческую сухую среду готовят согласно указаниям на этикетке.

7.2.2.37 Приготовление ПЖА (кампилобактер)

В 500,0 см^3 дистиллированной воды добавляют 250,0 см^3 печеночной воды, 250,0 см^3 сердечной воды, 1,0 % пептона, 0,5 % — 1,0 % натрия хлорида, 0,15 % агар-агара и кипятят до полного растворения агара, фильтруют через ватный фильтр, устанавливают pH 7,3—7,4 и разливают в пробирки по 7,0—9,0 см^3. Стерилизуют при (112 ± 1) °С 30 мин или при (115 ± 1) °С 20—25 мин. Готовая среда должна иметь pH 7,0—7,2.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.2.38 Приготовление ПЖА (кампилобактер) с 0,5 % агара; ПЖА (кампилобактер) с 3,5 % хлористого натрия

Среду готовят по 7.2.2.37, добавляя в ПЖА (кампилобактер) соответствующие количества компонентов.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.2.39 Приготовление ПЖА (кампилобактер) с 0,02 % цистина

К расплавленному ПЖА (кампилобактер) добавляют 0,02 % цистина. Среду перемешивают, разливают в пробирки и стерилизуют текучим паром три дня подряд по 20 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.2.40 Приготовление ПЖА (кампилобактер) с 4 % желчи

К расплавленному ПЖА (кампилобактер) добавляют 4,0 % стерильной бычьей желчи. Среду перемешивают, разливают в пробирки и стерилизуют при (112 ± 1) °С 20 мин или текучим паром три дня подряд по 20 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.2.41 Приготовление ПЖА (кампилобактер) с 1 % глицина

К расплавленному ПЖА (кампилобактер) добавляют 1,0 % глицина. Среду перемешивают, разливают в пробирки и стерилизуют текучим паром три дня подряд по 20 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.2.42 Приготовление индикаторных полосок с ацетатом свинца для определения продукции сероводорода микроорганизмами

Состав реактива: ацетат свинца $Pb(CH_3COO)_2$ — 30,0 г, натрия гидрокарбонат $NaHCO_3$ — 1,0 г, дистиллированная вода — 100,0 см^3. Нарезают узкие полоски фильтровальной бумаги, пропитывают их приготовленным раствором и высушивают.

7.2.2.43 Приготовление МППА с добавлением 10 % дефибринированной крови барана

В 50,0 см^3 дистиллированной воды добавляют 25,0 см^3 отвара сердца крупного рогатого скота, 25,0 см^3 печеночного настоя, 1,0 % пептона, 2,0 % — 3,0 % агар-агара. Кипятят до растворения агара, фильтруют через марлевый фильтр. Стерилизуют при (115 ± 1) °С в течение 30 мин, охлаждают до 65 °С — 70 °С, добавляют 10,0 % дефибринированной стерильно взятой крови барана (см. 7.2.2.4). Разливают в стерильные чашки Петри.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 3 сут.

Перед использованием среду подсушивают в термостате.

7.2.2.44 Приготовление селективного бульона Болтона

Коммерческую сухую среду со специальными добавками готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.45 Приготовление агара Престон

Коммерческую сухую среду со специальными добавками готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.2.46 Приготовление раствора с объемной долей перекиси водорода 3 %

10,0 см^3 пероксида водорода с содержанием основного вещества 30,0 % (в случае если пероксид водорода имеет другое содержание основного вещества, то сделать пересчет) переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют дистиллированную воду до метки.

Срок годности — не более 7 сут.

7.2.2.47 Приготовление реактива Эрлиха

В 95,0 см^3 спирта этилового 96° растворяют 1,0 г парадиметиламинобензальдегида, затем добавляют 20,0 см^3 соляной кислоты концентрированной (ρ 1,18—1,19 г/см).

Реактив хранят в закрытом темном флаконе с притертой пробкой при температуре (5 ± 1) °С не более 30 сут.

Примечание — Для обнаружения индола в суточную бульонную культуру добавляют 1—2 см^3 эфира, сильно встряхивают и осторожно, по стенкам пробирки, приливают 1,0 см^3 реактива Эрлиха. Реакцию оценивают не позднее чем через 5 мин. Образование красного кольца — положительная реакция, желто-коричневого кольца — отрицательная реакция.

Коммерческий реактив подготавливают и используют согласно указаниям на этикетке.

7.2.2.48 Приготовление индикатора метилрот

В 30 см^3 спирта этилового растворяют 0,01 г метилового красного, затем добавляют 20 см^3 воды дистиллированной и перемешивают.

Реактив хранят в закрытом темном флаконе с притертой пробкой при температуре (5 ± 1) °С не более 30 сут.

Примечание — Для постановки реакции к 2,5 см^3 двухсуточной культуры бактерий в среде Кларка добавляют 8—10 капель индикатора метилрота, пробирку встряхивают, после чего учитывают реакцию. Розовое окрашивание — положительная реакция, желтое окрашивание — отрицательная реакция, светло-оранжевое окрашивание — сомнительная реакция.

Коммерческий реактив подготавливают и используют согласно указаниям на этикетке.

7.2.2.49 Приготовление реактивов для реакции Фогес-Проскауэра

Реактив 1: в 500,0 см^3 растворяют 30,0 г α-нафтола ($C_{10}H_8O$).

Реактив 2: в 300,0 см^3 воды дистиллированной растворяют 120,0 г калия гидроокиси (KOH).

Реактивы хранят в закрытых темных флаконах с притертой пробкой при температуре (5 ± 1) °С не более 30 сут.

Примечание — Для постановки реакции к 2,5 см^3 двухсуточной культуры бактерий в среде Кларка добавляют вначале 1,0 см^3 реактива 1, затем 0,4 см^3 реактива 2; пробирку встряхивают; результат учитывают через 3—5 мин. Окрашивание в розовый цвет — положительная реакция, желтый цвет — отрицательная реакция, светло-оранжевый цвет — сомнительная реакция.

Коммерческие реактивы подготавливают и используют согласно указаниям на этикетке.

7.2.2.50 Приготовление растворов и реактивов для окраски по Граму

Приготовление насыщенного спиртового раствора фуксина.

8,0—9,0 г основного кристаллического фуксина вносят во флакон, добавляют 100,0 см^3 96° этилового спирта и помещают на 18—24 ч в термостат с температурой (37 ± 1) °С. Содержимое флакона периодически перемешивают. В течение указанного времени значительная часть краски растворяется, и на дне флакона остается осадок, свидетельствующий о насыщении раствора.

Насыщенный раствор хранят во флаконах из темного стекла.

Приготовление водно-спиртового раствора фуксина.

Из насыщенного спиртового раствора готовят водно-спиртовой раствор фуксина. Для этого к 1,0 см^3 насыщенного раствора добавляют 9,0 см^3 дистиллированной воды.

Срок годности — 1 сут.

Приготовление карболового кристаллического фиолетового, генциан-фиолетового или метилового фиолетового для окраски по Граму.

1,0 г кристалл-, генциан- или метилвиолета гомогенизируют в ступке с 2,0 г кристаллической карболовой кислоты (фенола). Во время растирания небольшими порциями добавляют 10,0 см^3 96° этилового спирта. После того как краска полностью растворится, добавляют при постоянном помешивании 100,0 см^3 дистиллированной воды. Раствор краски фильтруют через бумажный фильтр через сутки. Растворы нестойкие.

Хранят в темном прохладном месте. Срок годности — до 2 месяцев.

Приготовление раствора Люголя.

В 10,0 см^3 дистиллированной воды растворяют 2,0 г йодистого калия. Затем добавляют 1,0 г кристаллического йода. Раствор выдерживают 5—6 ч до полного растворения йода, после чего добавляют 290,0 см^3 дистиллированной воды. Хранят раствор во флаконах из темного стекла.

Примечание — Можно использовать коммерческие наборы для окраски мазков по Граму.

7.2.3 Приготовление питательных сред для микологических исследований

Для подавления сопутствующей микрофлоры в питательные среды, используемые для первичного выделения грибов, после стерилизации добавляют антибиотики: пенициллин — 50 ЕД и стрептомицин — 100 ЕД на 1,0 $см^3$ среды, имеющей температуру около 46°.

7.2.3.1 Приготовление суслового агара

Неохмеленное пивное сусло (промежуточный продукт производства пива), содержащее 12,0 % — 14,0 % сахаров, фильтруют через тонкий слой ваты или 3—4 слоя марли, разбавляют водой в соотношении 1 : 2 или 1 : 3 до 3° — 7° по ареометру Баллинга, затем добавляют 2,0 % агар-агара, устанавливают pH 6,0—6,8. Среду стерилизуют при (112 ± 1) °С в течение 10—20 мин.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.3.2 Приготовление кукурузного агара

В 500,0 $см^3$ воды добавляют 40,0 г кукурузной муки и выдерживают при 65 °С в течение 1 ч, после чего настой фильтруют через бумажный фильтр. В 500,0 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 20,0 г агар-агара и кипятят до растворения агара. Обе части растворов смешивают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Среду стерилизуют 15 мин при (121 ± 1) °С.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.3.3 Приготовление пептонной воды с углеводами

В дистиллированную воду добавляют 1,0 % пептона, 0,5 % поваренной соли и две-три капли 0,05 %-ного раствора бромтимолового синего.

Примечание — Синяя окраска индикатора при pH 7,6 переходит в желтую при pH 6,0 и ниже. Для растворения бромтимолового синего можно использовать 20 %-ный этанол или дистиллированную воду с добавлением 3,2 $см^3$ 0,05-нормального раствора едкого натра на 100,0 мг индикатора.

Среду разливают в пробирки, предварительно поместив в них стеклянные «поплавки», в количестве 4,5 $см^3$. Среду стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 15—20 мин.

Концентрированные 20 %-ные растворы глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы стерилизуют фильтрацией через асбестовый фильтр и добавляют по 0,5 $см^3$ к стерильной пептонной воде, так чтобы конечная концентрация углевода в пробирке была равна 2 %.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.3.4 Приготовление среды Сабуро

В 1 $дм^3$ дистиллированной воды растворяют 40,0 г глюкозы (мальтозы или декстрозы), 10,0 г пептона. Среду стерилизуют в колбах при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Для приготовления агаризированной среды добавляют 18,0 г агар-агара.

Перед использованием среду в колбах расплавляют на водяной бане и стерильно разливают по 15,0—20,0 $см^3$ в чашки Петри.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.3.5 Приготовление среды Пагано-Левин-Трейо

В 1 $дм^3$ дистиллированной воды растворяют 10,0 г пептона, 1,0 г дрожжевого экстракта, 40,0 г глюкозы, 15,0 г агар-агара, 1,0 г 2,3,5-трифенилтетразолхлорида; среду кипятят, разливают в колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20—40 мин. Готовая среда должна иметь pH 6,0—6,2.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 30 сут.

7.2.3.6 Приготовление агара Литмана

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.3.7 CHROMagar Candida

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.3.8 Приготовление среды Чапека с агаром

В 1 $дм^3$ дистиллированной воды растворяют 30,0 г сахарозы, 3,0 г натрия азотнокислого, 1,0 г калия фосфорнокислого одноосновного, 0,5 г калия хлористого, 0,5 г магния сернокислого, 0,01 г железа сернокислого, 15,0—20,0 г агар-агара.

Среду разливают в колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Перед использованием среду в колбах расплавляют на водяной бане и стерильно разливают по 15,0—20,0 $см^3$ в чашки Петри.

Готовую среду до использования хранят в темном месте при температуре (5 ± 3) °С не более 14 сут.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.3.9 Солодовый агар

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.3.10 Микологический агар Киммига

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.3.11 Агар с бенгальским розовым и хлортетрациклином

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.2.3.12 Агар Чапека с дрожжевым экстрактом

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

7.3 Отбор проб

7.3.1 Отбор проб свежеполученной неразбавленной и разбавленной спермы

Сперму от кобелей-производителей берут не ранее, чем через два-три дня после последнего ее получения.

Свежеполученную неразбавленную сперму получают от кобелей-производителей методом мастурбации, с помощью искусственной вагины или методом электроэякуляции.

Искусственную вагину, спермоприемники, воронки, пробирки перед их применением стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С 30 мин или кипячением в стерилизаторе с дистиллированной водой в течение 20—30 мин. Внутреннюю поверхность искусственной вагины смазывают стерильным, безвредным для сперматозоидов вазелином по 7.2.2.25 или стерильной средой для разбавления спермы. Температура в искусственной вагине перед получением спермы должна быть (35 ± 0,5) °С.

Для взятия спермы не используют хрупкие материалы и спермициды.

Для взятия спермы у кобелей необходимо наличие суки в охоте, влагалищные мазки, взятые у суки в охоте, или искусственные феромоны (метилпарабен, гидроксибензоат).

Сперму кобелей-производителей, предназначенную для анализа, отбирают в специально подготовленном помещении с помощью чистого, стерильного оборудования, с соблюдением правил безопасности [2].

Воздух помещения, в котором проводят отбор проб спермы, обезвреживают с помощью ультрафиолетовых ламп, оборудование и пол увлажняют безвредным для сперматозоидов дезинфектантом или раствором фурацилина. Температура воздуха в помещении должна быть не ниже 18 °С.

Перед отбором проб спермы надевают чистую одежду, руки дезинфицируют раствором фурацилина с дистиллированной водой в соотношении 1 : 5000 или 70 %-ным ректификованным спиртом по ГОСТ 5962. Перед взятием спермы у кобеля-производителя наружную поверхность препуция протирают влажной салфеткой по ГОСТ 16427, смоченной в дезинфицирующем растворе (раствор фурацилина с дистиллированной водой в соотношении 1 : 5000), и насухо вытирают стерильной фильтровальной бумагой по ГОСТ 12026.

Эякулят кобелей-производителей, как правило, отбирают фракционно. Полученную сперму переносят из спермоприемника (воронки) в сухой стерильный флакон (пробирку) и закрывают над пламенем спиртовки резиновой пробкой, обернутой пергаментной бумагой, предварительно простерилизованной вместе с флаконом.

Пробу спермы для анализа отбирают после тщательного перемешивания непосредственно из спермоприемника или из флакона со спермой в стерильной комнате (боксе) стерильной стеклянной пипеткой. Лабораторная посуда, применяемая для отбора проб свежеполученной спермы, должна быть подогрета до температуры (29 ± 1) °С в термостате.

Отбор проб спермы для микробиологических исследований проводят в неподогретые стерильные флаконы. Для микробиологических исследований отбирают не менее 5,0 $см^3$ свежеполученной неразбавленной спермы или свежеполученной разбавленной спермы, включающей в себя вторую и третью фракции. Отбор проб проводят с соблюдением правил асептики с целью исключения контаминации спермы микрофлорой из окружающей среды.

Отбор проб свежеполученной неразбавленной и разбавленной спермы для определения физических свойств проводят в объеме не менее 1,0 $см^3$; биологических — не менее 0,5 $см^3$; морфологических анализов — не менее 0,5 $см^3$.

7.3.2 Отбор проб замороженной спермы

Для проведения биологических, морфологических анализов, определения физических свойств от замороженной спермы, расфасованной в соломинки (пайеты) или гранулы, отбирают такое количество спермодоз, которое соответствует требованиям к объему спермы: для определения физических свойств проводят в объеме не менее 1,0 $см^3$; биологических — не менее 0,5 $см^3$; для морфологических анализов — не менее 0,5 $см^3$, для микробиологических исследований отбирают не менее 5,0 $см^3$ и помещают их в отдельный сосуд Дьюара.

7.3.3 Оформление сопроводительных документов

Пробы спермы, направляемые для анализа, сопровождают документом, в котором указывают:

- наименование организации-отправителя (Ф.И.О. владельца кобеля-производителя);
- адрес организации-отправителя (адрес владельца кобеля-производителя);
- наименование материала, направленного в лабораторию (сперма от кобеля-производителя свежеполученная неразбавленная; сперма свежеполученная разбавленная; сперма замороженная);
- фракцию спермы (в случае фракционного отбора);
- в случае направления спермы свежеполученной разбавленной указывают разбавитель;
- количество спермодоз и их объем (для замороженной спермы);
- объем спермы (для свежеполученной неразбавленной спермы и свежеполученной разбавленной спермы);
- количество направляемых проб и их опись;
- дату взятия спермы (год, месяц, число, время);
- краткие сведения о кобеле-производителе: порода, кличка, возраст, клеймо;
- показатели и методы исследования спермы, по которым должны быть получены результаты;
- сведения о результатах клинического осмотра кобеля-производителя и термометрии;
- характер упаковки и способ транспортирования проб;
- время отправления проб в лабораторию (год, месяц, число, время);
- должность и подпись лица, отобравшего пробу для исследования.

7.4 Методы органолептических исследований

7.4.1 Определение цвета

7.4.1.1 Сущность метода

Визуальная оценка цвета в установленных условиях обозрения.

7.4.1.2 Проведение испытания

Цвет спермы определяют визуально при хорошем естественном (рассеянный дневной свет) или искусственном освещении на матовом белом или серовато-белом фоне.

Примечание — Источник освещения, производящий усредненный естественный дневной свет, — люминесцентные лампы «дневного света» с коррелированной цветовой температурой, равной примерно 6500 К, индексом цветопередачи более 90. Для комфортабельного обозрения желательна освещенность на поверхности исследуемого образца спермы в пределах от 1000 лк до 1500 лк.

Сперму помещают в стеклянную посуду (стакан, цилиндр) соответствующего объема по ГОСТ 25336 или ГОСТ 1770. Геометрия проведения визуальной оценки: сперма освещается под углом 45°, луч зрения испытателя перпендикулярен поверхности образца.

7.4.1.3 Обработка результатов

Для описания цвета используют названия цветов, названия оттенков: белый, молочно-белый, желтоватый оттенок и др. Сперма должна соответствовать требованиям, установленным в 4.2

Примечание — При анализе обращают внимание на несвойственные цвета проб спермы, свидетельствующие о наличии примесей крови, гноя, мочи: розовый, красный, желтый, бурый оттенки. Следует учитывать изменения цвета спермы при добавлении в нее разбавителей, что не является отклонением от установленных требований к качеству.

7.4.2 Определение внешнего вида и консистенции

7.4.2.1 Сущность метода

Визуальная оценка консистенции и внешнего вида спермы при покачивании в стеклянной лабораторной посуде.

7.4.2.2 Проведение анализа

Внешний вид и консистенция спермы определяются медленными наклонами стеклянной емкости (стакан, цилиндр) по ГОСТ 25336 или ГОСТ 1770, содержащей исследуемую пробу. По скорости перемещения жидкости по стенкам пробирки определяют консистенцию.

7.4.2.3 Обработка результатов

Для описания консистенции используют термины: жидкая, водянистая, сливкообразная, вязкая, густая и др.

Для описания внешнего вида используют термины: однородная (гомогенная), неоднородная, крошковатая, непрозрачная, прозрачная и др.

Сперма должна соответствовать требованиям, установленным в 4.2.

7.5 Методы исследований физических свойств

7.5.1 Определение объема эякулята

7.5.1.1 Сущность метода

Определение объема прямым измерением с помощью мерной лабораторной посуды.

7.5.1.2 Проведение анализа

Объем эякулята, измеряемый в $см^3$, определяют градуированным мерным цилиндром по ГОСТ 1770 или мерной стеклянной пипеткой по ГОСТ 29230.

7.5.1.3 Обработка результатов

Результат записывают с точностью до 0,1 $см^3$.

Сперма должна соответствовать требованиям, установленным в 4.2.

7.5.2 Определение объема спермодозы

7.5.2.1 Сущность метода

Определение объема прямым измерением с помощью мерной лабораторной посуды.

7.5.2.2 Подготовка криоконсервированной спермы к исследованию

Соломинки с помощью корнцанга вынимают из сосуда Дьюара и погружают в водяную баню при температуре (37 ± 1) °С на 10 с, затем вынимают и протирают насухо марлевой салфеткой. Ножницами отрезают запаянный конец соломинки, а с другого конца поршнем проталкивают содержимое в пробирку типа Эппендорф вместимостью 2 $см^3$.

7.5.2.3 Проведение анализа и обработка результатов

Мерной градуированной пипеткой вместимостью 1 $см^3$ по ГОСТ 29230 измеряют объем спермы, содержащейся в пробирке, и определяют объем дозы в $см^3$.

7.5.2.4 Обработка результатов

Результат записывают с точностью до 0,1 $см^3$.

7.5.3 Определение pH потенциометрическим методом

7.5.3.1 Сущность метода

pH спермы определяют потенциометрическим методом. Сущность метода заключается в измерении электродного потенциала, возникающего при погружении электрода в сперму.

7.5.3.2 Проведение анализа

pH спермы определяют с помощью pH-метра-милливольтметра в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

7.5.3.3 Обработка результатов

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами двух измерений не должны превышать ±0,1 ед. pH.

Сперма должна соответствовать требованиям, установленным в 4.2.

7.5.4 Определение pH с помощью индикаторной бумаги

7.5.4.1 Сущность метода

Изменение цвета индикатора при взаимодействии с ионами водорода пробы.

7.5.4.2 Проведение анализа

Для проведения анализа каплю спермы с помощью пипетки по ГОСТ 29227 наносят равномерно на pH-бумагу и растирают стеклянной палочкой.

7.5.4.3 Обработка результатов

Результат оценивают через 10—30 с после нанесения спермы на индикаторную бумагу, но не ранее приобретения насыщенного цвета или следуя рекомендациям производителя pH-бумаги. Сравнивают цвет с калибровочной шкалой и определяют pH спермы.

При установлении pH менее 6,0 ед. или более 7,0 ед. необходимо определить pH потенциометрическим методом.

Точность pH-бумаги необходимо проверять на соответствие путем сравнения с показаниями pH-метра не реже одного раза в месяц с использованием стандарт-титра pH-метрии 6,86.

7.5.5 Определение общей концентрации сперматозоидов

7.5.5.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в подсчете сперматозоидов в счетной камере Горяева.

7.5.5.2 Подготовка свежеполученной неразбавленной и разбавленной спермы с помощью меланжера

Сперму тщательно перемешивают и набирают до метки «1» в меланжер, предварительно обработанный смесью спирта и эфира по 7.2.1.8 в соотношении 1 : 1 и высушенный. Для разбавления спермы и обездвиживания сперматозоидов в меланжер вводят до метки «101» 3 %-ный раствор хлористого натрия по 7.2.1.1. Зажав большим и указательным пальцами оба конца наполненного меланжера, тщательно перемешивают содержимое, переворачивая меланжер вверх и вниз не менее 60 раз.

7.5.5.3 Подготовка свежеполученной неразбавленной и разбавленной спермы с помощью автоматических дозаторов

В пробирки Флоринского или в лунки полистироловых пластин разливают с помощью автоматического дозатора 0,1 $см^3$ 3 %-ного раствора натрия хлористого (см. 7.2.1.1). Автоматическим микродозатором набирают 0,001 $см^3$ предварительно перемешанной спермы. Марлевой салфеткой протирают наружную поверхность наконечника пипетки от спермы и переносят содержимое на дно пробирки (лунки) с 3 %-ным раствором натрия хлористого. Для перемешивания осторожно несколько раз набирают и выливают содержимое пробирки (лунки) с помощью автоматического микродозатора.

7.5.5.4 Проведение анализа

Аккуратно притирают покровное стекло к камере Горяева, слегка надавливая на него до появления цветных колец Ньютона. Удалив из меланжера первые три-четыре капли, кончик меланжера, а при использовании автоматического дозатора — кончик наконечника, обтирают марлевой салфеткой и осторожно наносят одну каплю смеси на край притертого к счетной камере шлифовального покровного стекла. Капля, затекая под стекло, заполняет камеру Горяева. Выдерживают 1—2 мин для прекращения движения клеток (осаждения сперматозоидов). Устанавливают увеличение микроскопа таким образом, чтобы в поле зрения помещалось 16 малых (один большой) квадратов.

Сперматозоиды подсчитывают в 80 малых (пяти больших) квадратах, расположенных по диагонали. Для подсчета сперматозоидов, расположенных в глубине камеры, постоянно вращают микровинт. Положение сперматозоидов внутри или вне квадрата определяют по месту нахождения головки. Головки, расположенные на левой и верхней линиях, относят к тому квадрату, в котором проводят подсчет. Головки можно также учитывать на правой и нижней линиях.

7.5.5.5 Обработка результатов

Концентрацию сперматозоидов спермы, млрд/$см^3$, вычисляют по формуле

$$C = \frac{n}{200}, \quad (1)$$

где n — количество подсчитанных сперматозоидов в 80 маленьких квадратах;

200 — постоянный коэффициент.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1.

7.5.6 Определение концентрации сперматозоидов в спермодозе (в счетной камере)

7.5.6.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в подсчете сперматозоидов в счетной камере Горяева.

7.5.6.2 Подготовка к исследованию

Криоконсервированную спермодозу подготавливают по 7.5.2.2. Затем в пробирку со спермой добавляют автоматическим дозатором с объемом дозирования 0,1—1,0 $см^3$ раствор 3 %-ного натрия хло-

ристого по 7.2.1.1, доводя объем до 1,0 см^3. Полученный образец переливают в колбу вместимостью 50 см^3 и вносят 19,0 см^3 раствора 3 %-ного натрия хлористого, используя градуированную пипетку вместимостью 10 см^3, и тщательно перемешивают содержимое.

7.5.6.3 Проведение анализа

Анализ проводят по 7.5.5.4.

7.5.6.4 Обработка результатов

Концентрация сперматозоидов спермы, млн/см^3, равна количеству подсчитанных сперматозоидов в 80 малых (пяти больших) квадратах.

Концентрацию сперматозоидов в спермодозе $C_д$, млн/доза, вычисляют по формуле

$$C_д = n \cdot V, \quad (2)$$

где n — концентрация сперматозоидов, млн/см^3, равная количеству подсчитанных сперматозоидов в 80 малых (пяти больших) квадратах;

V — объем спермы в соломинке, см^3.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1.

7.6 Методы биологических исследований

7.6.1 Определение выживаемости сперматозоидов при температуре 37 °С

7.6.1.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в определении количества сперматозоидов в замороженной сперме, сохранивших ППД после оттаивания и хранения в течение 5 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С.

7.6.1.2 Подготовка к исследованию

В чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 2 см^3 автоматическим дозатором с объемом дозирования 0,1—1,0 см^3 добавляют 0,25 см^3 или 0,5 см^3 (в зависимости от объема исследуемой спермы) 2,9 %-ного раствора натрия лимоннокислого по 7.2.1.3, чтобы соотношение разбавителя и спермы было 1 : 1. Затем пробирки закрывают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С не более 30 мин.

Подготовку криоконсервированной спермодозы к исследованию проводят по 7.5.2.2 с тем отличием, что сперму поршнем проталкивают в пробирку, содержащую 2,9 %-ный раствор натрия лимоннокислого и находящуюся в термостате.

Затем объем содержимого пробирки доводят до 1,0 см^3 2,9 %-ным раствором натрия лимоннокислого автоматическим дозатором с объемом дозирования 0,1—1,0 см^3, пробирку закрывают и перемешивают, переворачивая закрытую пробирку вверх и вниз не менее 10 раз.

Пробирки помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С и инкубируют в течение 5 ч.

7.6.1.3 Проведение исследования

После 1, 2 и 5 ч инкубации спермы в термостате при температуре (37 ± 1) °С определяют подвижность сперматозоидов по 7.6.2.

7.6.1.4 Обработка результатов

Сперматозоиды имеют выживаемость не менее 5 ч, если после 5 ч инкубации спермы в термостате при температуре (37 ± 1) °С в ней обнаруживают не менее 1 % сперматозоидов с ППД.

7.6.2 Определение количества сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением

7.6.2.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в визуальном определении с помощью микроскопа в раздавленной капле спермы количественного соотношения сперматозоидов с ППД к их общему числу.

7.6.2.2 Подготовка замороженной спермы к исследованию

Подготовка пробы проводится по 7.6.1.2 с тем отличием, что пробирки с разведенной спермой инкубируют при температуре (37 ± 1) °С не более 15 мин.

7.6.2.3 Подготовка свежеполученной и разбавленной спермы к исследованию

Свежеполученную и разбавленную сперму допускается исследовать без разбавления.

При большой концентрации сперматозоидов в сперме перед исследованием допускается ее разбавление. Для этого в пробе спермы определяют концентрацию сперматозоидов по 7.5.5, 7.5.6 и затем доводят ее до концентрации 0,2—0,4 млрд/см^3, добавляя 2,9 %-ный раствор натрия лимоннокислого по 7.2.1.3.

7.6.2.4 Проведение исследования

На электрообогреваемый столик биологического микроскопа помещают предметное стекло и подогревают при температуре (37 ± 1) °С в течение 1 мин, после чего автоматическим дозатором с объемом дозирования 0,1—1,0 $см^3$ из пробирки наносят небольшую каплю разбавленной спермы и покрывают покровным стеклом. Устанавливают увеличение от 100×—150×, дающее возможность добиться четкого изображения, и, просматривая весь препарат, выбирают участок с небольшим движением сперматозоидов. Определяют визуально в трех полях зрения общее количество сперматозоидов, включая неподвижных, количество сперматозоидов с ППД, а также сперматозоидов, имеющих манежное и колебательное движение.

7.6.2.5 Обработка результатов

Результаты анализа представляют в процентах и в количестве сперматозоидов с ППД в дозе, млн/доза.

Количество сперматозоидов с ППД $П_1$, %, вычисляют по формуле

$$П_1 = \frac{C_{ППД}}{C_{общ}} \cdot 100, \quad (3)$$

где $C_{ППД}$ — количество сперматозоидов с ППД, шт;

$C_{общ}$ — общее количество сперматозоидов, шт.

Количество сперматозоидов с ППД в дозе $П_2$, млн/доза, вычисляют по формуле

$$П_2 = \frac{П_1 \cdot C_Д}{100}, \quad (4)$$

где $П_1$ — количество сперматозоидов с ППД, %;

$C_Д$ — концентрация сперматозоидов в спермодозе, млн/доза.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов трех измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами определений не должны превышать 10 %.

7.7 Методы морфологических исследований

7.7.1 Определение количества сперматозоидов с аномальной морфологией и включений

7.7.1.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в подсчете под микроскопом аномальных форм сперматозоидов и включений спермы.

Примечание — К аномальным формам относят сперматозоиды с отклонениями в строении головки (микроскопическая, круглая, несимметричная, укороченная, заостренная, двойная, без мембраны или жгутика), шейки (двойная, ломаная, изогнутая, укороченная), тела (изогнутое, удвоенное, нитевидное, с цитоплазматической капелькой), жгутика (изогнутый, двойной, извитой, скрученный, рудиментарный). К включениям спермы относятся форменные элементы крови, клетки эпителия и т. д.

7.7.1.2 Подготовка замороженной, свежеполученной и разбавленной спермы

В пробе спермы определяют концентрацию сперматозоидов по 7.5.5, 7.5.6 и затем доводят ее до концентрации 0,2—0,4 млрд/$см^3$, добавляя 0,9 %-ный раствор хлористого натрия по 7.2.1.2.

7.7.1.3 Проведение исследования

Приготавливают мазки спермы на сухих предметных стеклах, предварительно обезжиренных в течение 3 ч в смеси спирт-эфира, по 7.2.1.8. Каплю приготовленной для анализа спермы автоматическим дозатором с объемом дозирования 0,01—0,1 $см^3$ переносят на край предметного стекла и шлифованным покровным стеклом делают мазок, проводя покровное стекло вдоль предметного, наклонив его на 45° в сторону, противоположную направлению движения. Мазок подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания и фиксируют 5 мин метанолом или в течение 15 мин смесью этилового спирта с эфиром петролейным по 7.2.1.8.

Для окрашивания сперматозоидов применяют 1 %-ный раствор эозина по 7.2.1.7.

Зафиксированный мазок спермы помещают на штатив-рельсы для окраски препаратов. Пипеткой вместимостью от 0,1 см^3 до 1,0 см^3 добавляют 0,5—1,0 см^3 1 %-ного раствора эозина так, чтобы краска равномерно распределилась по всему мазку, и оставляют на 10—15 мин для окрашивания, затем мазок промывают в стакане с дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Подсчет нормальных и патологических форм сперматозоидов проводят в проходящем свете микроскопа с иммерсионной системой (увеличение 600—1350 раз). Подсчитывают не менее 100 сперматозоидов, учитывая отдельно количество нормальных и аномальных форм. Также при подсчете общего количества сперматозоидов учитывают число включений спермы.

7.7.1.4 Обработка результатов

Подсчет сперматозоидов и включений проводят не менее чем в трех мазках, суммируя отдельно количество аномальных форм, нормальных сперматозоидов и включений спермы.

Содержание аномальных форм сперматозоидов $N_П$, %, вычисляют по формуле

$$N_П = \frac{П}{П + Н} \cdot 100, \quad (5)$$

где П — количество аномальных форм сперматозоидов, шт.;
Н — количество нормальных форм сперматозоидов, шт.

Содержание включений спермы $N_В$, %, вычисляют по формуле

$$N_В = \frac{В}{П + Н} \cdot 100, \quad (6)$$

где В — количество включений спермы, шт.;
П — количество аномальных форм сперматозоидов, шт.;
Н — количество нормальных форм сперматозоидов, шт.

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое значение результатов трех измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами определений не должны превышать 10 %.

7.7.2 Определение количества мертвых сперматозоидов

7.7.2.1 Сущность метода

Количество мертвых сперматозоидов определяют дифференцированным окрашиванием. Сущность метода заключается в подсчете окрашенных мертвых клеток под микроскопом.

7.7.2.2 Подготовка замороженной, свежеполученной и разбавленной спермы

Пробу спермы подготавливают по 7.6.2.3.

7.7.2.3 Проведение исследования

На чистое, обезжиренное, подогретое до температуры (37 ± 1) °С предметное стекло наносят небольшую каплю неразбавленной или предварительно разбавленной 2,9 %-ным раствором лимоннокислого натрия спермы и добавляют две-три капли раствора эозин-нигрозиновой краски по 7.2.1.4, подогретой до температуры 30 °С. Сперму и краску смешивают в течение 2—4 с и делают тонкие мазки на трех обезжиренных стеклах.

Мазки высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой микроскопа при увеличении 600×—1350× при голубом или зеленом светофильтре.

В каждом препарате подсчитывают по 100—150 сперматозоидов. Отдельно считают количество сперматозоидов с окрашенными и неокрашенными головками. Сперматозоиды с головками, окрашенными частично, относят к мертвым.

7.7.2.4 Обработка результатов

Количество мертвых сперматозоидов $Н_С$, %, вычисляют по формуле

$$Н_С = \frac{C_н^+}{C_н^- + C_н^+} \cdot 100, \quad (7)$$

где $C_н^+$ — количество сперматозоидов с окрашенными головками, шт.;
$C_н^-$ — количество сперматозоидов с неокрашенными головками, шт.

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое значение результатов трех измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1. Допускаемые расхождения между результатами определений не должны превышать 10 %.

7.7.3 Определение целостности акросомы

7.7.3.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в подсчете под микроскопом количества сперматозоидов с интактной акросомой. Целостность акросомы определяют с помощью дифференцированного окрашивания специальными красителями.

7.7.3.2 Подготовка замороженной, свежеполученной и разбавленной спермы

Пробу спермы подготавливают по 7.6.2.3.

7.7.3.3 Приготовление мазка спермы

Предметное стекло перед исследованием тщательно моют и обезжиривают этиловым спиртом.

Каплю подготовленной для анализа спермы автоматическим дозатором с объемом дозирования 0,01—0,1 $см^3$ переносят на край предметного стекла и шлифовальным покровным стеклом делают мазок, проводя покровное стекло вдоль предметного, наклонив его на 45° в сторону, противоположную направлению движения. Мазок подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания.

7.7.3.4 Фиксация мазка

Фиксацию мазка производят фиксирующим раствором (раствор № 1) из набора для быстрого дифференцированного окрашивания биопрепаратов или метанолом.

Мазки спермы погружают в кювет с фиксирующим раствором на 15 мин. По истечении времени пинцетом вынимают стекла из фиксирующего раствора и оставляют на воздухе до полного высыхания.

7.7.3.5 Проведение исследования

Для окраски мазка используют набор красителей дифференцированного окрашивания биопрепаратов. Зафиксированный мазок спермы помещают на штатив-рельсы для окраски препаратов, добавляют 0,5—1,0 $см^3$ красителя № 1 (розовый) автоматическим дозатором с объемом дозирования 0,1—1,0 $см^3$ так, чтобы краска равномерно распределилась по всему мазку, и оставляют при комнатной температуре на 10—15 мин для окрашивания, остатки краски удаляют при помощи фильтровальной бумаги. Затем образец аналогичным образом красят, добавляя краситель № 2 (синий) в объеме 0,5—1,0 $см^3$, время окрашивания составляет 10—15 мин, после чего мазок промывают буферным раствором. После окрашивания мазок промывают буферным раствором по 7.2.1.6 и подсушивают при комнатной температуре до полного высыхания. Приготовленный образец микроскопируют с иммерсионной системой микроскопа при увеличении 600×. В норме у сперматозоидов акросома окрашивается в розовый или коричневый цвет, а при патологии органоид приобретает частичную окраску. Если акросома отсутствует, то головка сперматозоида красится равномерно в один цвет и дифференцировка головки и акросомы отсутствует.

В каждом препарате подсчитывают не менее 100 сперматозоидов. Отдельно считают количество сперматозоидов с интактной и с поврежденной акросомой (в том числе сперматозоиды без акросомы).

7.7.3.6 Обработка результатов

Количество сперматозоидов с интактной акросомой $A_П$, %, вычисляют по формуле

$$A_П = \frac{C_A^+}{C_A^- + C_A^+} \cdot 100, \quad (8)$$

где C_A^+ — количество сперматозоидов с интактной акросомой, шт;

C_A^- — количество сперматозоидов с поврежденной акросомой (в том числе без акросомы), шт.

За окончательный результат, округленный до третьего десятичного знака, принимают среднеарифметическое значение результатов не менее чем трех измерений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1.

7.8 Методы микробиологических исследований

7.8.1 Приготовление разведений

7.8.1.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в приготовлении суспензии с равномерным, насколько это возможно, распределением микроорганизмов, содержащихся в сперме.

Ряд десятикратных разведений готовят с целью сокращения количества микроорганизмов в единице объема, чтобы после инкубации установить наличие роста бактерий или произвести подсчет колоний, как установлено в стандарте.

7.8.1.2 Подготовка проб к исследованиям

Соломинки с помощью корнцанга вынимают из сосуда Дьюара и погружают в водяную баню при температуре (37 ± 1) °С на 10 с, затем вынимают и протирают насухо марлевой салфеткой и обрабатывают ватным тампоном, смоченным 70 %-ным спиртом-ректификатом. Стерильным пинцетом придерживают один конец пайеты, а другой конец срезают стерильными ножницами и выливают содержимое в стерильную сухую пробирку.

Колпачки флаконов (пробирок, колбочек) со свежеполученной неразбавленной и свежеполученной разбавленной спермой обрабатывают ватным тампоном, смоченным 70 %-ным спиртом-ректификатом.

7.8.1.3 Приготовление разведений

Разведения для посевов готовят следующим образом.

К 4,5 или 9,0 см^3 стерильного 0,9 %-ного раствора хлористого натрия по 7.2.2.1 добавляют соответственно 0,5 см^3 или 1,0 см^3 спермы. Тщательно перемешивают и готовят десятикратные разведения 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000.

Для оптимальной точности пипетку вводят в эякулят не более чем на 1,0 см. Избегают какого-либо соприкосновения пипетки, содержащей инокулят, со стерильным 0,9 %-ным раствором хлористого натрия.

Для приготовления каждого разведения берут новую стерильную пипетку.

При посеве на чашки Петри и в пробирки посевной материал вносят от большего разведения к меньшему. В этом случае пользуются одной пипеткой.

Между окончанием приготовления десятикратных разведений и внесением их в питательную среду должно проходить не более 30 мин.

7.8.2 Определение общего количества микробных клеток (общего микробного числа) в 1 см^3 спермы

7.8.2.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в определении общего количества микробных клеток в 1,0 см^3 спермы, способных образовывать на питательном агаре колонии, видимые невооруженным глазом и при увеличении в два раза после инкубации при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

7.8.2.2 Проведение исследования

Для количественного учета микробных тел в 1,0 см^3 спермы в две параллельные стерильные бактериологические чашки Петри вносят по 1,0 см^3 из разведений 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 приготовленных по 7.8.1, и добавляют 15,0 см^3 стерильного, расплавленного и охлажденного до температуры 44 °С — 45 °С мясо-пептонного агара с 1 % глюкозы по 7.2.2.3. Осторожно покачивая чашки, засеянный материал равномерно распределяют в агаре. Для контроля стерильности разливают 15,0 см^3 мясо-пептонного агара с 1 % глюкозы в чашку Петри без разведений эякулята. После застывания среды чашки Петри инкубируют в течение 44—48 ч при температуре (37 ± 1,0) °С.

7.8.2.3 Обработка результатов

Количество выросших колоний подсчитывают в каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне. При подсчете пользуются лупой или прибором для счета колоний.

При небольшом количестве выросших колоний подсчитывают их на всей площади чашки. Подсчитанные колонии отмечают на чашке восковым карандашом или чернилами. При сравнительно большом росте микробов дно чашки делят карандашом на секторы (2, 4, 8) и подсчитывают число колоний отдельно в каждом секторе. Полученные числа складывают. При равномерном распределении колоний можно ограничиться подсчетом на 1/2 или 1/4 площади чашки. Полученные числа умножают на 2 или 4 соответственно.

Подсчет большого числа колоний (до 600) на чашках Петри проводят, используя счетную камеру Вольфгюгеля. В счетной камере подсчитывают число колоний в 10—12 квадратах в разных частях чашки, суммируют и определяют среднее арифметическое из числа колоний, приходящихся на один квадрат (т. е. 1,0 см^2). Пересчитывают количество колоний на всю площадь чашки Петри.

Пример

На чашке в 10 квадратах счетной камеры Вольфгюгеля насчитано 90 колоний. Среднее арифметическое на один квадрат равно 9. Площадь чашки при диаметре 10 см равна πR^2, или $3,14 \cdot 5^2 = 78,5$ см^2. Следовательно, на всей чашке выросло: $9 \cdot 78,5 = 706$ колоний.

По результатам подсчета вычисляют среднеарифметическое значение числа колоний из двух посевов одного разведения.

Общее количество микробных клеток в 1,0 см^3 спермы $C_{мк}$ определяют следующим образом: результаты, полученные при подсчете колоний, умножают на разведения, суммируют и делят на количество разведений.

$$C_{мк} = \frac{\sum n_1 \cdot 10 + \sum n_2 \cdot 100 + \sum n_3 \cdot 1000}{N}, \quad (9)$$

где $\sum n_1$ — среднеарифметическое значение числа колоний, полученных при подсчете на чашке с разведением спермы 1 : 10;

$\sum n_2$ — среднеарифметическое значение числа колоний, полученных при подсчете на чашке с разведением спермы 1 : 100;

$\sum n_3$ — среднеарифметическое значение числа колоний, полученных при подсчете на чашке с разведением спермы 1 : 1000;

N — количество разведений.

Пример

Среднеарифметическое значение числа колоний в одной чашке — 253, в другой — 23 и третьей — 1. В эти чашки посев проводили из пробирок с разведениями соответственно 1 : 10; 1 : 100; 1 : 1 000. Следовательно, 1 см^3 спермы содержит

$$\frac{253 \cdot 10 + 23 \cdot 100 + 1 \cdot 1000}{3} = 1943 \text{ КОЕ.}$$

Санитарная оценка качества спермы: в зависимости от количества микроорганизмов в 1,0 см^3 неразбавленной спермы и коли-титра различают пять степеней чистоты спермы в соответствии с показателями, указанными в таблице 5.

7.8.3 Определение коли-титра (коли-индекса) спермы

7.8.3.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в сбраживании микробами углеводов — маннита, глюкозы, лактозы (в зависимости от используемой среды), в течение 24 ч инкубации при температуре (43 ± 1) °С, которое сопровождается выделением газа и изменением цвета среды/помутнением.

Количество кишечной палочки, обнаруженной в сперме, выражают в виде коли-титра (титр кишечной палочки) или коли-индекса.

Коли-титр можно перевести в коли-индекс и наоборот. Для перевода коли-титра в коли-индекс единицу делят на объем, выражающий коли-титр. Для перевода коли-индекса в коли-титр необходимо единицу разделить на число, выражающее коли-индекс.

Пример

При коли-титре, равном 0,01 см^3, коли-индекс равен 100 (в 1 см^3 содержится 100 кишечных палочек).

7.8.3.2 Проведение исследования

Коли-титр определяют методом бродильных проб при посеве на одну из сред: Булира, Эйкмана (глюкозо-пептонная среда), типа Эйкмана (лактозо-пептонная среда) по 7.2.2.6—7.2.2.8. Для этого в три пробирки, содержащие по 5,0—7,0 см^3 одной из сред, высевают по 1,0 см^3 из одного разведения или из различных разведений спермы 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 приготовленных по 7.8.1. Если в пробе необходимо определить коли-титр и общее количество бактерий, то высев можно производить одновременно одной пипеткой.

Пробирки с посевом выдерживают в термостате при температуре (43 ± 1) °С в течение 18—24 ч. В результате осмотра пробирок устанавливают бродильный титр.

При отсутствии изменения цвета/помутнения среды и газообразования реакцию считают отрицательной. При изменении цвета среды/помутнении и газообразовании (пузырек в газовке) реакцию считают положительной.

При наличии положительной реакции на бродильный титр проводят исследование на идентификацию кишечной палочки. Для этого из пробирок с измененным цветом/помутнением среды и газообра-

зованием производят посев на среду Эндо по 7.2.2.12 с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии.

Перед посевом дно чашки со средой Эндо делят на сектора для каждого разведения. Из каждой пробирки петлей высевают минимальное количество материала на отдельный сектор в виде густо пересекающихся штрихов. Чашки с посевами инкубируют 18—24 ч при температуре (37 ± 1,0) °С.

При отсутствии роста на среде Эндо колоний, типичных для бактерий группы кишечной палочки, сперму считают не загрязненной микроорганизмами этого вида.

При появлении на среде Эндо колоний, типичных для бактерий группы кишечной палочки (красных, нередко с металлическим блеском, розовых, бледно-розовых), а также бесцветных колоний, проводят их изучение.

Из изолированных колоний, характерных для бактерий группы кишечной палочки, приготавливают препараты, которые окрашивают по Граму и микроскопируют.

7.8.3.3 Окраска по методу Грама

При окраске используют растворы красок, приготовленные по 7.2.2.50. На мазок культуры, фиксированной на огне, помещают полоску фильтровальной бумаги и наливают карболовый генцианвиолет. Выдерживают 1—2 мин, после чего снимают фильтровальную бумажку, сливают краску, мазок промывают водой и наливают на него раствор Люголя. Через 1—2 мин раствор сливают и наливают этиловый спирт на 20—30 с. Затем мазок промывают водой и дополнительно окрашивают водным фуксином в течение 1—2 мин. Затем промывают водой, просушивают мазок фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой. Микробы, окрашенные по Граму в темно-фиолетовый цвет, — грамположительные; микробы, окрашенные в красный цвет, — грамотрицательные.

Кишечная палочка — мелкая грамотрицательная палочка с закругленными концами не образующая спор, может быть биполярно окрашена.

Из колоний, характерных для кишечной палочки ставят вторую бродильную пробу, производя высев в пробирки с одной из сред: Булира, Эйкмана (глюкозо-пептонная среда), типа Эйкмана (лактозо-пептонная среда) по 7.2.2.6—7.2.2.8 с последующим инкубированием при температуре (43 ± 1) °С в течение 18—24 ч. При наличии видимых признаков роста бактерий без газообразования — отрицательный результат. При изменении цвета среды/помутнении и газообразовании (газ в газовке) — результат положительный.

7.8.3.4 Обработка результатов

При посеве в три пробирки со средой, содержащей углеводы из одного и того же разведения спермы, коли-титр устанавливают по таблице 3.

Таблица 3 — Коли-титр при посеве одного и того же разведения спермы

Варианты опыта	Разведение спермы			Коли-титр, $см^3$
	0,1	0,1	0,1	
А	–	–	–	Св. 0,3
Б	+	–	–	0,3
В	+	+	–	Менее 0,3
Г	+	+	+	Менее 0,3
Примечание — «+» — кишечная палочка обнаружена; «–» — кишечная палочка не обнаружена.				

При посеве в три пробирки со средой, содержащей углеводы из разных разведений спермы, коли-титр устанавливают по таблице 4.

Таблица 4 — Коли-титр при посеве разных разведений спермы

Варианты опыта	Разведение спермы			Коли-титр, $см^3$
	0,1	0,01	0,001	
А	–	–	–	Св. 0,111
Б	+	–	–	0,1

Окончание таблицы 4

Варианты опыта	Разведение спермы			Коли-титр, $см^3$
	0,1	0,01	0,001	
В	+	+	–	0,01
Г	+	+	+	Менее 0,001
Примечание — «+» — кишечная палочка обнаружена; «–» — кишечная палочка не обнаружена.				

В зависимости от количества микроорганизмов в 1,0 $см^3$ неразбавленной спермы и коли-титра различают пять степеней чистоты спермы в соответствии с показателями, указанными в таблице 5.

Таблица 5 — Степени чистоты и санитарная оценка качества спермы

Степень чистоты спермы	Количество микробных тел в 1 $см^3$	Коли-титр, $см^3$	Санитарная оценка качества спермы
I	—	Св. 0,1 или 0,3	Стерильна
II	До 100	0,1 или 0,3	Незначительно загрязнена
III	До 2000	0,1 или 0,3	Слабо загрязнена
IV	До 5000	0,1 или 0,3	Средне загрязнена
V	Более 5000	0,01 или менее 0,3	Сильно загрязнена

7.8.4 Исследование на наличие колиформных бактерий родов *Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella*

7.8.4.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в выделении колиформных бактерий с последующим подтверждением по микроскопическим, биохимическим и культуральным признакам принадлежности выделенных типичных колоний к бактериям семейства *Enterobacteriaceae*, дифференциацией бактерий до рода и вида и определения патогенности выделенных культур в биологической пробе на белых мышах.

7.8.4.2 Проведение исследования

В пробирку, содержащую 5,0—7,0 $см^3$ одну из сред: Кода, Кесслер или МакКонки по 7.2.2.9—7.2.2.11, с помощью пипетки высевают 1,0 $см^3$ спермы, разведенной 1 : 10 0,9 %-ным стерильным раствором натрия хлорида. Посев инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

После инкубирования пробирки с посевами просматривают. Отсутствие изменения цвета, помутнения среды и газообразования свидетельствует об отсутствии в пробе спермы колиформных бактерий.

При изменении цвета среды (пожелтение, помутнение) и/или газообразовании (пузырек в газовке) производят посев на одну из дифференциально-диагностических сред для энтеробактерий: Эндо, Левина, Агар МакКонки по 7.2.2.12—7.2.2.1 с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии. Чашки с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1) °С. Через 18—24 ч чашки просматривают и оценивают колонии по характеру роста на принадлежность к родам *Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella.*

Две-три типичные колонии колиформных бактерий пересевают на скошенный мясо-пептонный агар по 7.2.2.2 и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

Из суточных культур бактерий со скошенного агара готовят мазки, окрашивают по Граму по 7.8.3.3 и микроскопируют. При наличии в мазках из культур однородных мелких грамотрицательных палочек, не образующих спор и капсул, изучают их ферментативные свойства и определяют их подвижность.

Ферментативные свойства изучают у двух-трех агаровых культур бактерий. Для этого агаровые культуры высевают на мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, на комбинированные среды Олькеницкого или Клиглера, цитратный агар Симмонса, ПЖА, среду Кларка по 7.2.2.2, 7.2.2.15—7.2.2.19. Засеянные пробирки инкубируют при температуре (37 ± 1) °С. Ферментативные свойства культур предварительно учитывают через 24 ч, окончательно — через 48 ч. Изучение ферментативных свойств выделенных культур можно проводить также с помощью коммерческих наборов для биохимической идентификации энтеробактерий, согласно инструкциям по применению производителя или нормативным

правовым актам, действующим на территории государства, принявшего настоящий стандарт. Родовую и видовую принадлежность культур устанавливают по ферментативным и биохимическим свойствам (см. таблицу 6).

При использовании комбинированной среды Олькеницкого или Клиглера учитывают изменения, вызываемые представителями разных родов колиформных бактерий в этой среде, после чего данную культуру изучают по другим необходимым биохимическим тестам.

Для определения индола используют 1—2 сут бульонную культуру и реактив Эрлиха по 7.2.2.47 или тест-полоски, пропитанные реактивом Ковача.

Для постановки реакции с метилротом и реакции Фогес-Проскауэра используют культуру, полученную на среде Кларка по 7.2.2.48, 7.2.2.49.

Подвижность колиформных бактерий определяют на среде ПЖА по 7.2.2.18. Диффузный рост после 18—24 ч инкубирования при температуре (37 ± 1) °С свидетельствует о подвижности микроорганизма.

Патогенные свойства определяют у культур бактерий, относящихся к родам *Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella* в биопробе на белых мышах.

Таблица 6 — Дифференциальные признаки колиформных бактерий по биохимическим свойствам

№ п/п	Тесты	Роды и виды бактерий						
		Escherichia coli	*Citrobacter*			*Enterobacter*		*Klebsiella pneumoniae*
			freundii	*diversus*	*amalonaticus*	*aerogenes*	*cloacae*	
Основные								
1	Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
2	Лактоза	+	+/–	+/–	+/–	+	+	+
3	Рост на агаре Симонса	–	+	+	+/–	+	+	+
4	Образование индола	+	–	+	+	–	–	+/–
5	Образование сероводорода	–	+	–	–	–	–	–
6	Расщепление мочевины	–	+/–	+	+/–	–	+	+
Дополнительные								
1	Реакция с метилротом	+	+	+	+	–	–	+/–
2	Реакция Фогес-Проскауэра	–	–	–	–	+	+	+/–
3	Подвижность	+/–	+	+	+	+	+	–

Примечание — «+» — ферментация сахара (КГ), образование индола и т. д.; «−» — отсутствие ферментации сахара, образования индола и т. д.; «+/−» — различные показатели у разных штаммов.

Для определения патогенных свойств бактерий используют две-три агаровые культуры выделенных микроорганизмов. С каждой из суточных агаровых культур одного вида бактерий готовят смывы стерильным физиологическим раствором, устанавливают взвесь бактерий в концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток/см^3 (10 МЕ по ОСО мутности), после чего их смешивают в равной пропорции. Приготовленной взвесью культур бактерий в дозе 0,5 см^3 заражают внутрибрюшинно трех белых мышей массой 14—16 г. Культуру признают патогенной в случае гибели двух и более мышей в течение 3-х сут после заражения. Наблюдение за зараженными белыми мышами продолжают в течение 5 сут.

Из крови сердца, печени, головного мозга павших белых мышей делают высевы на МПА, МПБ, Эндо, посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. При выделении чистой исходной культуры колиформных бактерий от павших белых мышей биопробу считают положительной.

С целью подбора противомикробных препаратов для санации спермы определяют чувствительность выделенных культур к антибиотикам согласно документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

7.8.4.3 Обработка результатов

При выделении культур колиформных бактерий родов *Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella,* патогенных для белых мышей при внутрибрюшинном заражении, пробу спермы признают контаминированной патогенными штаммами заражаемой культуры.

При выделении культур колиформных бактерий родов *Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella* не вызывающих гибель белых мышей при внутрибрюшинном заражении, пробу спермы признают контаминированной непатогенными штаммами колиформных бактерий.

7.8.5 Исследование на наличие бактерий рода *Proteus*

7.8.5.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в посеве спермы по методу Шукевича, подтверждении принадлежности выделенных микроорганизмов к бактериям рода *Proteus* с последующей идентификацией бактерий до вида и определении патогенности выделенных культур в биологической пробе на белых мышах.

7.8.5.2 Проведение исследования

С помощью стерильной пипетки одну-две капли исследуемой спермы вносят в конденсационную воду пробирок со свежескошенным питательным агаром по 7.2.2.2, не касаясь поверхности среды. Пробирки с посевами инкубируют при температуре (37 ± 1,0) °С. Предварительный учет результатов проводят через (24 ± 2) ч, окончательный — через (48 ± 2) ч инкубирования. После инкубирования пробирки с посевами просматривают.

Бактерии рода *Proteus* из конденсационной жидкости растут вверх по всей поверхности среды с образованием ползучего вуалеобразного налета с голубым оттенком.

Для подтверждения принадлежности выделенных микроорганизмов с характерными культуральными свойствами к бактериям рода *Proteus* определяют их способность ферментировать глюкозу и сахарозу, дезаминировать фенилаланин, расщеплять мочевину, подвижность, отношение бактерий к окраске по Граму и их морфологию.

Окраска по Граму и микроскопирование.

Из выделенных культур готовят мазки, окрашивают по Граму по 7.8.3.3 и микроскопируют.

При микроскопировании бактерии рода *Proteus* представляют собой полиморфные грамотрицательные палочки, не образующие спор и капсул, подвижные (перетрихи).

Для определения ферментации глюкозы, лактозы, образования сероводорода и гидролиза мочевины культуры высевают на скошенный трехсахарный агар с мочевиной (по Олькеницкому) или Агар Клиглера и среду с мочевиной (по Преусу) по 7.2.2.15, 7.2.2.16, 7.2.2.21.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1,0) °С. Предварительный учет результатов проводят через (24 ± 2) ч, окончательный — через (48 ± 2) ч.

Бактерии рода *Proteus* ферментируют глюкозу с образованием кислоты и газа, лактозоотрицательные, некоторые виды образуют сероводород.

Определение дезаминирования фенилаланина.

Для определения дезаминирования фенилаланина суточную чистую культуру высевают в пробирку со скошенной средой для расщепления фенилаланина по 7.2.2.20. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1,0) °С в течение (48 ± 2) ч. Затем на поверхность агара с выросшей культурой наносят три-пять капель раствора 8—10 %-ного раствора треххлорного железа.

Появление интенсивной зеленой окраски среды свидетельствует о дезаминировании фенилаланина — положительная реакция. При отрицательной реакции цвет среды не меняется.

Бактерии рода *Proteus* дезаминируют фенилаланин.

Идентификация бактерий рода *Proteus* до вида.

Лактозоотрицательные культуры энтеробактерий, дезаминирующие фенилаланин, проявляющие характерные культуральные свойства (ползучий вуалеобразный рост), относят к бактериям рода *Proteus* и идентифицируют до вида.

Для определения утилизации цитрата суточную чистую культуру высевают в пробирку со скошенной средой Симмонса по 7.2.2.17. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1,0) °С в течение (24 ± 2) ч. Изменение цвета среды после темостатирования указывает на усвоение цитрата — положительная реакция. При отрицательной реакции цвет среды не меняется.

Для определения индола используют 1—2 сут бульонную культуру и реактив Эрлиха или тест-полоски, пропитанные реактивом Ковача по 7.2.2.47.

В таблице 7 приведены биохимические свойства различных видов бактерий рода *Proteus*.

Таблица 7 — Биохимические свойства видов бактерий рода *Proteus*

Вид бактерий	Подвижность	Глюкоза	Лактоза	Фенилаланин	Сероводород	Индол	Цитрат
Proteus vulgaris	+	+	–	+	+	+	±
Proteus mirabilis	+	+	–	+	+	–	+
Proteus myxofaciens	+	+	–	+	–	–	+
Proteus penneri	+	+	–	+	±	–	–
Примечание — «+» — ферментация сахара (КГ), образование индола, дезаминирование фенилаланина, утилизации цитрата и т. д.; «–» — отсутствие ферментации сахара, образования индола, утилизации цитрата и т. д.; «±» — различные показатели у разных штаммов.							

Изучение ферментативных свойств выделенных культур бактерий рода *Proteus* можно проводить также с помощью коммерческих наборов для биохимической идентификации энтеробактерий, согласно инструкциям по применению производителя или нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего настоящий стандарт.

Определение патогенных свойств культур бактерий рода *Proteus*.

Патогенные свойства определяют у культур бактерий, относящихся к родам *Proteus*, в биопробе на белых мышах.

Для определения патогенных свойств бактерий используют 18—24 ч агаровые культуры. Из культур одного вида бактерий готовят смывы 0,9 %-ным стерильным раствором хлорида натрия, устанавливают взвесь бактерий в концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток/см^3 (10 МЕ по ОСО мутности). Приготовленной взвесью культур бактерий в дозе 0,5 см^3 заражают внутрибрюшинно три белые мыши массой 14—16 г.

Культуру признают патогенной в случае гибели двух и более мышей в течение 3-х сут после заражения. Наблюдение за зараженными белыми мышами продолжают в течение 5 сут.

Из крови сердца, печени, головного мозга павших белых мышей делают высевы на МПА, МПБ, Эндо, посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. При выделении чистой исходной культуры бактерий рода *Proteus* биопробу считают положительной.

С целью подбора противомикробных препаратов для санации спермы определяют чувствительности выделенных культур к антибиотикам согласно документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

7.8.5.3 Обработка результатов

При выделении культур бактерий рода *Proteus,* патогенных для белых мышей при внутрибрюшинном заражении, пробу спермы признают контаминированной патогенными штаммами заражаемой культуры.

При выделении культур бактерий рода *Proteus,* не вызывающих гибель белых мышей при внутрибрюшинном заражении, пробу спермы признают контаминированной непатогенными штаммами бактерий рода *Proteus.*

7.8.6 Исследование на наличие синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*

7.8.6.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в выделении культур с последующим подтверждением по микроскопическим, биохимическим и культуральным признакам принадлежности к бактериям вида *Pseudomonas aeruginosa*; определении патогенности выделенных культур в биологической пробе на белых мышах.

К бактериям вида *Pseudomonas aeruginosa* относят аэробные не образующие спор грамотрицательные оксидазоположительные палочки, образующие пигмент пиоционин, вызывающие гемолиз эритроцитов.

7.8.6.2 Проведение исследования

Для выделения синегнойной палочки с помощью стерильной пипетки две-три капли спермы высевают на мясо-пептонный бульон с 1 %—2 % сахара (глюкозы, лактозы) по 7.2.2.3 и инкубируют посевы в течение 6—7 сут в термостате при температуре (37 ± 1,0) °С, проверяя рост каждые 1—2 сут. О наличии роста синегнойной палочки судят по изменению цвета бульона в зеленовато-голубой.

При наличии роста синегнойной палочки делают пересев с бульона на селективную среду ЦПХ-агар или ХайФлюоро агар по 7.2.2.22, 7.2.2.23 с целью получения изолированных колоний. Посевы инкубируют при (37 ± 1,0) °С в течение 24 ч (до 48 ч для ХайФлюоро агара).

На ЦПХ-агаре синегнойная палочка образует плоские колонии диаметром от 2 до 3 мм с окрашиванием среды в зеленый или сине-зеленый цвет.

На ХайФлюоро агаре синегнойная палочка при росте на среде разрушает флюорогенный субстрат, освобождая флюороген, который дает видимую флюоресценцию при ультрафиолетовом облучении.

Полученные на ЦПХ-агаре (ХайФлюоро агаре) две-три колонии пересевают на мясо-пептонный агар по 7.2.2.2, мясо-пептонный агар с 5 % дифибринированной крови барана по 7.2.2.4, мясо-пептонный бульон.

На мясо-пептонном агаре *Pseudomonas aeruginosa* дает круглые голубовато-серые колонии. Выделяемый клетками *Pseudomonas aeruginosa* триметиламин напоминает запах земляничного мыла, что является характерным признаком.

Определение присутствия оксидазы. Платиново-иридиевой петлей или стеклянной палочкой отбирают культуры, выросшие на поверхности мясо-пептонного агара и наносят штрихи на фильтровальную бумагу, смоченную реактивом для определения оксидазы, результат оценивают в течение 5 мин.

Для определения оксидазы допускается использование дисков или растворов отечественного и импортного (зарегистрированных в установленном порядке) промышленного производства. Для контроля качества дисков и растворов применяют музейные оксидазоположительные (*Pseudomonas aeruginosa*) и оксидазоотрицательные (*Escherichia coli*) культуры.

Бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* — оксидазоположительные.

На кровяном агаре *Pseudomonas aeruginosa* вызывает гемолиз эритроцитов.

При росте на мясо-пептонном бульоне *Pseudomonas aeruginosa* продуцирует водорастворимый пигмент пиоцианин, который постепенно окрашивает бульон в зеленовато-голубой цвет.

Определение пиоцианина: в пробирку с бульонной культурой, при появлении зеленого окрашивания после 18—24 ч инкубирования, добавляют 1,0 $см^3$ хлороформа и интенсивно встряхивают. Синее окрашивание капелек хлороформа свидетельствует о наличии пиоцианина и присутствии в среде *Pseudomonas aeruginosa*.

Окраска по Граму и микроскопирование.

Из выявленных культур готовят мазки, окрашивают по Граму по 7.8.3.3 и микроскопируют. При микроскопировании *Pseudomonas aeruginosa* представляют собой грамотрицательные палочки, располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками.

Определение патогенных свойств культур *Pseudomonas aeruginosa*.

Патогенные свойства определяют у культур *Pseudomonas aeruginosa* в биопробе на белых мышах.

Для определения патогенных свойств бактерий используют агаровые культуры. Из культур одного вида бактерий готовят смывы 0,9 %-ным стерильным раствором хлорида натрия, устанавливают взвесь бактерий в концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток/$см^3$ (10 МЕ по ОСО мутности). Приготовленной взвесью культур бактерий в дозе 0,5 $см^3$ заражают внутрибрюшинно три белые мыши массой 14—16 г.

Культуру признают патогенной в случае гибели двух и более мышей в течение 3-х сут после заражения. Наблюдение за зараженными белыми мышами продолжают в течение 5 сут.

Из крови сердца, печени, головного мозга павших белых мышей делают высевы на МПА, МПБ, посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч. При выделении чистой исходной культуры бактерий синегнойной палочки биопробу считают положительной.

С целью подбора противомикробных препаратов для санации спермы определяют чувствительности выделенных культур к антибиотикам согласно документам, действующим на территории государства, принявшей стандарт.

7.8.6.3 Обработка результатов

При выделении культур бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*, патогенных для белых мышей при внутрибрюшинном заражении, пробу спермы признают контаминированной патогенными штаммами заражаемой культуры.

При выделении культур бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*, не вызывающих гибель белых мышей при внутрибрюшинном заражении, пробу спермы признают контаминированной непатогенными штаммами бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa.*

7.8.7 Исследование на наличие золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*)

7.8.7.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в посеве спермы на селективно-диагностические среды, подтверждении по микроскопии, биохимическим признакам принадлежности выделенных типичных и (или) атипичных колоний к *Staphylococcus aureus*.

7.8.7.2 Проведение исследования

С помощью стерильной пипетки 1,0 $см^3$ спермы, разведенной в соотношении 1 : 10 0,9 %-ным раствором натрия хлорида, вносят в солевой бульон по 7.2.2.5 или бульон Жиолитти-Кантони по 7.2.2.24. Пробирку с посевом выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1,0) °С в течение 24—48 ч.

Предположительное присутствие стафилококков на солевом бульоне определяется по помутнению среды; на бульоне Жиолитти-Кантони по почернению среды (обычно у дна пробирки).

Для получения изолированных колоний стерильной петлей делают пересевы культур на поверхность чашки Петри с одной из агаризованных селективно-диагностических сред: Байрд-Паркера, Фогеля–Джонсона, Среды № 10 для идентификации *Staphylococcus aureus*, желточно-солевого агара, молочно-солевого агара по 7.2.2.26—7.2.2.30. Пересевы проводят также из пробирок, в которых нет видимых признаков роста. Чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1,0) °С в течение 24—48 ч. После термостатирования посевы просматривают и отмечают рост характерных колоний (см. таблицу 8).

Для подтверждения принадлежности выделенных культур стафилококков к виду *Staphylococcus aureus* у выросших и отобранных микроорганизмов определяют отношение к окраске по Граму, способность образовывать каталазу, способность коагулировать плазму крови кролика, вызывать гемолиз эритроцитов барана на 5 %-ном кровяном агаре.

Окраска по Граму и микроскопирование.

Из выявленных культур готовят мазки, окрашивают по Граму по 7.8.3.3 и микроскопируют.

При микроскопировании стафилококки окрашиваются по Граму положительно, имеют шарообразную форму и располагаются скоплениями, чаще всего напоминающими гроздья винограда.

С селективной агаровой среды две-три характерные колонии пересевают на скошенный мясо-пептонный агар, мясо-пептонный агар с 5 % дифибринированной крови барана по 7.2.2.2, 7.2.2.4. Посевы выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1,0) °С в течение 18—24 ч.

Таблица 8 — Характеристика роста *Staphylococcus aureus* на селективно-диагностических средах

Селективная среда	Характеристика колоний *Staphylococcus aureus*
Агаризованная среда Байрд-Паркера	Черные блестящие колонии, окруженные прозрачными зонами, размером от 2 до 5 мм
Агар Фогеля-Джонсона	Колонии черного цвета, окруженные желтой зоной, размером от 1,5 до 3,0 мм
Среда № 10 для идентификации *Staphylococcus aureus*	Колонии выпуклые, золотисто-желтого цвета, окруженные желтыми зонами размером от 2,0 до 4,0 мм
Желточно-солевой агар	Колонии имеют форму плоских дисков диаметром 2—4 мм белого, желтого, кремового, лимонного, золотистого цвета с ровными краями; вокруг колоний образуется радужное кольцо и зона помутнения среды
Молочно-солевой агар	Слегка выпуклые непрозрачные круглые колонии, окрашенные от белого до оранжевого цвета, диаметром 2—4 мм

На мясо-пептонном агаре стафилококки образуют непрозрачные, круглые 2—4 мм в диаметре) ровные колонии, окрашенные в цвет липохромного пигмента (кремовый, желтый, оранжевый).

Тест на каталазу.

На предметное стекло наносят одну-две капли 3 %-ной перекиси водорода по 7.2.2.46. С мясо-пептонного агара отбирают колонию с помощью стерильной стеклянной или пластиковой палочки (но только не металлической иглой) и осторожно эмульгируют в перекиси. Появление пузырьков сразу же свидетельствует о выделении бактериями каталазы.

Постановка реакции плазмокоагуляции.

Лиофилизированную плазму кроличью цитратную разводят физиологическим раствором согласно инструкции изготовителя. В пробирку с 0,5 $см^3$ разведенной кроличьей плазмы вносят петлю суточной агаровой культуры. Внесенную культуру тщательно размешивают. Одну пробирку с плазмой оставляют незасеянной, а в другую засевают контрольный штамм *Staphylococcus aureus* (коагулазоположительный стафилококк). Пробирки помещают в термостат и инкубируют при температуре (37 ± 1,0) °С в течение 3—6 ч. Если через 6 ч коагуляции плазмы не произошло, то оставляют эти пробирки до 24 ч. Если через 24 ч плазма не свернулась, то испытуемую культуру стафилококка относят к коагулазоотрицательной.

При определении коагулазной активности реакцию считают отрицательной в тех случаях, когда в плазме не образуются отдельные нити или сгустки, или в тех случаях, когда в плазме появились отдельные нити (реакцию плазмокоагуляции оценивают на + (один плюс).

Реакцию считают положительной, если:

+ + + + — сгусток плотный;

+ + + — сгусток, имеющий небольшой отсек;

+ + — сгусток в виде взвешенного мешочка.

Все три варианта являются положительным результатом.

Бактерии вида Staphylococcus *aureus* — коагулазоположительные.

Определение гемолитической активности.

На мясо-пептонном агаре с 5 % дифибринированной крови барана определяют наличие зоны гемолиза в виде полного (β-гемолиз) просветления вокруг выросших колоний. *Staphylococcus aureus* на мясо-пептонном агаре с 5 % дифибринированной крови барана вызывает β-гемолиз эритроцитов при инкубации при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

С целью подбора противомикробных препаратов для санации спермы определяют чувствительности выделенных культур к антибиотикам согласно документам, действующим на территории государства, принявшей стандарт.

7.8.7.3 Обработка результатов

При выделении культур *Staphylococcus aureus* пробу спермы признают контаминированной микроорганизмами данного вида.

7.8.8 Исследование на наличие бактерий рода *Clostridium*

7.8.8.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в посеве спермы в среду Китта-Тароцци с последующей идентификацией выделенных культур по морфологическим, культуральным, биохимическим признакам и патологическим изменениям у зараженных лабораторных животных.

7.8.8.2 Проведение исследования

Для выделения анаэробных бактерий (клостридий) по одной-две капли спермы засевают в две пробирки со средой Китта-Тароцци по 7.2.2.31. Среду Китта-Тароцци предварительно регенерируют прогревом в кипящей водяной бане в течение 30 мин, после чего быстро охлаждают до 45 °С—50 °С. После посева спермы одну из пробирок выдерживают в водяной бане при температуре 80 °С в течение 20 мин для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры.

Засеянные пробирки помещают в термостат при температуре (37 ± 1,0) °С на 24—48 ч.

При отсутствии роста через 48 ч посевы инкубируют до 10 сут с ежедневным контролем роста.

При обнаружении роста на среде Китта-Тароцци учитывают интенсивность роста, характер осадка, а также наличие и степень газообразования и проводят микроскопическое исследование.

Окраска по Граму и микроскопирование.

Из среды Китта—Тароцци готовят мазки, окрашивают по Граму по 7.8.3.3 и микроскопируют.

При микроскопировании клостридии представляют собой крупные (2—10 × 0,5—2,0 мкм) спорообразующие грамположительные палочки. Споры располагаются терминально или субтерминально. Морфологические особенности клостридий см. приложение А.

Для обнаружения наличия капсул проводят окраску мазков по Ольту; при микроскопии устанавливают наличие капсул у *Clostridium perfringens* (в мазках из органов).

При обнаружении в мазке микроорганизмов, сходных по морфологическим свойствам с клостридиями, проверяют их культуральные и биохимические свойства.

Делают посев полученной культуры на кровяной агар Цейсслера, среду Вильсона-Блера (для дифференциации *Clostridium perfringens* от других клостридий), молоко, желатин; при необходимости делают посевы на среды с углеводами по 7.2.2.32—7.2.2.36. Чашки помещают, не переворачивая в микроанаэростат или эксикатор, из которого удаляют воздух. Чашки и пробирки с посевами выдерживают в термостате при (37 ± 1,0) °С в течение 12—48 ч, после чего просматривают рост в чашках и пробирках и отбирают культуры, которые классифицируют по морфологическим и биохимическим свойствам (см. приложение Б).

Изучение ферментативных свойств выделенных культур бактерий рода *Clostridium* можно проводить также с помощью коммерческих наборов для биохимической идентификации анаэробных бактерий, согласно инструкциям по применению производителя или нормативным правовым актам, действующих на территории государства, принявшего настоящий стандарт.

Определение патогенных свойств культур анаэробов (клостридий).

При необходимости проверки вирулентности выделенных штаммов, суточную культуру, выращенную на среде Китта—Тароцци, вводят подкожно в области брюшных мышц двум морским свинкам массой 350—400 г в дозе 0,5—1,0 $см^3$.

При наличии вирулентных штаммов клостридий морские свинки погибают через 16—48 ч (в зависимости от вида возбудителя).

При вскрытии у павших морских свинок обнаруживают патологоанатомические изменения (см. приложение В).

Из трупа морской свинки делают посевы из места введения материала, крови сердца и печени в среду Китта—Тароцци, МПБ и на МПА, мазки-отпечатки из тех же органов, а также с диафрагмальной поверхности печени. При наличии *Clostridium septicum* в мазках с поверхности печени обнаруживают длинные нити. *Clostridium perfringens* в мазках из органов имеет капсулу. Посевы инкубируют в анаэробных условиях при (37 ± 1,0) °С в течение 12—48 ч.

Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 8 сут.

7.8.8.3 Обработка результатов

При выделении видов бактерий рода *Clostridium* пробу спермы признают контаминированной бактериями данного вида.

7.8.9 Исследование на наличие возбудителя кампилобактериоза собак, вызванного *Campylobacter fetus subspecies fetus*

7.8.9.1 Сущность метода

Сущность метода исследования на наличие возбудителя кампилобактериоза собак, вызванного *Campylobacter fetus subspecies fetus,* заключается в выделении из спермы чистых культур рода *Campylobacter* с последующей дифференциацией выделенных штаммов до вида (подвида).

При исследовании на наличие возбудителя кампилобактериоза собак, вызванного *Campylobacter fetus subspecies fetus*, допускается использовать валидированные методы или нормативные правовые акты, действующие на территории государства, принявшего настоящий стандарт.

Кампилобактерии являются микроаэрофилами — оптимальной газовой средой служит смесь из 5 %—7 % кислорода, 10 % углекислого газа, 83 %—85 % азота.

Примечание — Необходимые микроарофильные условия достигаются при использовании анаэростата и газогенерирующих пакетов (газпаки) промышленного производства; в качестве альтернативы, можно инкубировать в пробирках с плотно закупоренными резиновыми пробками или запайку ватных пробок парафином.

7.8.9.2 Проведение исследования

Исследуемый эякулят высевают в пять пробирок с ПЖА для выделения кампилобактерий по 7.2.2.37 следующим образом.

Стерильной пастеровской пипеткой отбирают сперму до расширенной части, конец пипетки обжигают и опускают вдоль одной стенки в пробирку с питательной средой до дна, набирают среду, чтобы она соединилась с материалом, и осторожно выдувают. Затем пипетку слегка поднимают, отводят к другой стенке пробирки, набирают среду до расширенной части пипетки и переносят в следующую пробирку. Пробирки после посева запаивают парафином или плотно закрывают резиновыми пробками, или помещают в анаэростат обеспечивая оптимум газовой среды.

При загрязнении спермы посторонней микрофлорой рекомендуется делать посевы в пять пастеровских пипеток с ПЖА (кампилобактер). Для этого стерильной пастеровской пипеткой отбирают сперму до расширенной части, конец пипетки обжигают и опускают в пробирку с ПЖА (кампилобактериоз) до дна и осторожно выдувают. Берут стерильную пастеровскую пипетку и набирают в нее 1,5 $см^3$ стерильной ПЖА (кампилобактер), затем переносят ее на дно пробирки с ПЖА (кампилобактер), содержащей эякулят, и осторожно подсасывают до расширенной части пипетки. Конец пастеровской пипетки запаивают над пламенеем горелки, верх пипетки запаивают парафином. После посева пастеровские пипетки в горизонтальном положении ставят в пустые пробирки, на дне которых содержится кусочек ваты (вниз тонкой частью).

Посевы инкубируют при (37 ± 1,0) °С в течение 6—10 сут с просмотром через каждые трое сут.

На ПЖА (кампилобактер) культура бактерий рода *Campylobacter* растет под поверхностью среды в виде серовато-голубоватого резко ограниченного диска толщиной от 1 до 4 мм.

При наличии роста, характерного для кампилобактерий, проводят микроскопию.

Мазки окрашивают по Граму по 7.8.3.3 и фуксином Циля в разведении 1 : 5 в течение 1—2 мин.

Кампилобактерии представляют собой тонкие изогнутые палочки в форме запятой, подковы или серпа, нередко имеют форму буквы S или напоминают контуры крыльев летящей чайки; длиной 0,5—5,0 мкм и шириной 0,2—0,8 мкм. Спор и капсул не образуют. Встречаются и спириллообразные и коккообразные формы бактерий, количество которых увеличивается в старых культурах. По Граму кампилобактерии окрашиваются отрицательно.

При обнаружении в мазках посторонненей микрофлоры проводят очистку культур следующими методами:

а) рассев загрязненной культуры на чашки Петри с плотной средой МППА с добавлением 10 % дефибринированной крови барана по 7.2.2.43 с последующим отсевом отдельных колоний возбудителя на ПЖА (кампилобактер) в пробирках;

б) посев культуры в пастеровские пипетки под слой полужидкой питательной среды;

в) посев культур на ПЖА (кампилобактер) «с подсосом».

В случае обильного роста посторонней микрофлоры, не позволяющего оценить наличие кампилобактерий, исследование прекращают и повторно запрашивают материал.

При нескольких пересевах на ПЖА (кампилобактер) отдельные культуры могут диссоциировать. Такие культуры перед типированием необходимо пересевать на МППА с добавлением 10 % дефибринированной крови барана для отбора неизмененных колоний.

Выделенные чистые культуры бактерий подвергаются идентификации по признакам, определяющим род *Campylobacter,* и дифференцируются до вида (подвида).

Культуры с характерным для кампилобактерий ростом на ПЖА (кампилобактер) и результатом микроскопии пересевают на МППА с добавлением 10 % дефибринированной крови барана по 7.2.2.43 и инкубируют при (37 ± 1,0) °С в микроаэрофильных условиях в течении 24—72 ч. На МППА с добавлением 10 % дефибринированной крови барана культуры кампилобактерий растут в виде мелких, росинчатых, голубовато-серых колоний или в виде сплошного налета, располагающегося неправильными круглыми или овальными участками, полосами по штрихам посева; не обладают гемолитической активностью.

Типичные колонии проверяют на каталазную активность: материал исследуемой 3-х суточной агаровой культуры суспендируют на поверхности предметного стекла в капле 3 %-ного раствора перекиси водорода по 7.2.2.46; спустя 3—5 с в взвеси каталазапозитивной культуры происходит интенсивное газообразование. В качестве положительного контроля следует использовать суточную культуру *Escherichia coli,* отрицательного — *Enterococcus faecalis.*

У выделенных колоний бактерий рода *Campylobacter* проверяют способность к сероводородообразованию, устанавливают наличие роста в присутствии 1 % глицина (гликокола), 3,5 % хлористого натрия, 0,4 % желчи, роста при температуре 25 °С и 42 , характер роста при увеличении процента агара в питательной среде — по 7.2.2.38—7.2.2.41. Для этого с МППА делают пересев характерных для кампилобактерий колоний на ПЖА (кампилобактер) с добавками.

Выделенные бактерии относят к *Campylobacter fetus subspecies fetus* при наличии культурально-биохимических свойств, представленных в таблице 9.

Таблица 9 — Культурально-биохимические свойства *Campylobacter fetus subspecies fetus*

Вид и тип	Культурально-биохимические свойства								
	Каталаза (с 3-суточной культурой)	Рост на ПЖА в микроаэрофильных условиях в течение 24—72 ч при температуре		Образование H_2S на ПЖА при 37 °С в микроаэрофильных условиях в течение 5 сут	Рост на ПЖА при 37 °С в микроаэрофильных условиях в течение 24—72 ч				
		25 °С	42 °С		с 0,15 % агара	с 0,5 % агара (уколом)	с 0,4 % желчи	с 1,0 % глицина	с 3,5 % NaCl
Campylobacter fetus subspecies fetus	+	+	–	–	Кольцо под поверхностью	Вверху	+	+	–
Примечание — «+» — наличие роста или положительная реакция; «–» — отсутствие роста или отрицательная реакция.									

Сероводород определяют с помощью фильтровальной бумаги, пропитанной насыщенным раствором основного уксуснокислого свинца по 7.2.2.42. Полоски бумаги помещают в пробирки с засеянной культурой на ПЖА (кампилобактер) на 1—1,5 см от поверхности среды. Результат учитывают ежедневно в течение 5 сут термостатирования. Почернение кончика бумаги — положительная реакция.

Их проверяют на каталазную активность, сероводородообразование, оценивают рост на ПЖА (кампилобактер) в присутствии 1 % глицина (гликокола), 3,5 % хлористого натра, 0,4 % желчи, рост при температуре 25 °С и 42 °С.

7.8.9.3 Метод выделения и идентификации Campylobacter fetus subspecies fetus с помощью селективных сред

0,2—0,5 $см^3$ спермы инокулируют в селективный бульон Болтона по 7.2.2.44. Посевы инкубируют при (37 ± 1,0) °С в микроаэрофильных условиях в течение 40—48 ч. Микробиологической петлей производят пересев бульонных культур на поверхность селективного агара Престон по 7.2.2.45. Чашки с посевами инкубируют при (37 ± 1,0) °С в микроаэрофильных условиях в течение 40—48 ч. На агаре типичные колонии бактерий рода *Campylobacter* образуют колонии сероватого цвета, плоские, с неровным краем или выпуклые и округлые.

Две-три типичные колонии пересевают на МППА с 10 % дефибрированной крови барана по 7.2.2.43, инкубируют при (37 ± 1,0) °С в микроаэрофильных условиях в течение 40—48 ч. Оценивают рост на МППА с добавлением 10 % дефибринированной крови барана; исследование морфологических свойств, определение каталазной активности проводят по 7.8.9.2.

Межвидовую дифференциацию проводят с помощью коммерческих наборов для биохимической идентификации бактерий рода *Campylobacte*r, согласно инструкциям по применению производителя или нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего настоящий стандарт.

7.8.9.4 Обработка результатов

При выделении культур *Campylobacter fetus subspecies fetus* пробу спермы признают контаминированной микроорганизмами данного вида.

7.8.10 Исследование на наличие дрожжеподобных микроскопических грибов рода *Candida*

7.8.10.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в первичном выделении дрожжеподобных микроскопических грибов рода *Candida*, их идентификации и определении патогенных свойств (для *Candida albicans, Candida tropicalis* определение патогенных свойств не проводят).

Микологическое исследование спермы на наличие в ней *Candida albicans, Candida tropicalis, Candida stellatoidea, Candida pseudotropicalis, Candida krusei, Candida parakrusei, Candida guilliermondi, Candida parapsilosis* проводят по следующей схеме: первичное выделение грибов, идентификация и определение патогенных свойств (кроме *Candida albicans, Candida tropicalis*).

7.8.10.2 Проведение исследования

Свежеполученную неразбавленную сперму в соотношении 1 : 10 с 0,9 %-ным раствором натрия хлорида по 7.2.2.1 высевают в объеме 0,5 $см^3$ на чашку Петри с питательной средой Сабуро по 7.2.3.4.

Свежеполученную разбавленную и замороженную сперму высевают без предварительного разбавления или разбавляют в зависимости от дозы расфасованной спермы 1 : 1—1 : 4 и высевают 0,5 $см^3$ на чашку Петри с питательной средой Сабуро по 7.2.3.4.

Параллельно ставят контроль загрязненности воздуха методом седиментации, используя одну чашку Петри с питательной средой.

Чашки инкубируют при температуре (37 ± 1) °С до 3 сут.

Выделенную культуру пересевают на бульон Сабуро и культивируют при (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

Для предварительной дифференциации выделенных дрожжеподобных грибов рода *Candida* по культуральным признакам используют среды: кукурузный агар, кровяной агар, одну из сред агар Литмана, Пагано-Левин-Трейо с агаром, CHROMagar *Candida*, агар Сусло по 7.2.3.1, 7.2.3.2, 7.2.3.5—7.2.3.7 с последующей инкубацией при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. По характеру роста на питательных средах проводят предварительную родовую дифференциацию (см. приложение Г).

Для видовой дифференциации выделенных дрожжеподобных грибов рода *Candida* по биохимической активности проводят посев на пептонную воду, содержащую 2 % углеводов, по 7.2.3.3. Биохимические свойства грибов рода Candida представлены в таблице 10.

Таблица 10 — Биохимические свойства грибов рода *Candida*

Культура	Углеводы			
	Глюкоза	Мальтоза	Сахароза	Лактоза
Candida albicans	К+/Г+	К+/Г+	К+/Г–	К–/Г–
Candida tropicalis	К+/Г+	К+/Г+	К+/Г+	К–/Г–
Candida pseudotropicalis	К+/Г+	К–/Г–	К+/Г+	К+/Г+
Candida krusei	К+/Г+	К–/Г–	К–/Г–	К–/Г–
Candida paraicrusei	К+/Г±	К–/Г–	К–/Г–	К–/Г–
Candida stellatoidea	К+/Г+	К+/Г+	К+/Г+	К–/Г–
Candida guillermondi	К–/Г–	К–/Г–	К–/Г–	К–/Г–
Примечание — «К+» — ферментация углевода; «К−» — отсутствие ферментации углевода; «Г+» — образование газа; «Г−» — отсутствие образования газа; «Г±» — результат вариабелен у 50 % культур.				

Микроскопическое исследование. Окрашивают препараты простым методом

1 %-ным спиртовым раствором метиленового синего 1—3 мин, 1 %-ным водным раствором фуксина 0,5—1 мин. Используют также метод окраски по Граму, по Цилю-Нильсену, по Романовскому-Гимзе, окраска препаратов 1 %-ным спиртовым раствором генциан фиолетового в течение 2—3 мин (удобно заранее пропитать этим раствором полоски фильтровальной бумаги, которые затем накладывают на препарат в каплю воды). При микроскопическом исследовании выявляют клетки типичной морфологии (овальные, круглые), в некоторых случаях с почкой (всегда одной), псевдомицелий, иногда хламидоспоры.

7.8.10.3 Определение патогенных свойств культур грибов рода *Candida*

Выращенную в течение 24—48 ч на агаровой среде культуру гриба смывают стерильным физиологическим раствором и готовят суспензию с концентрацией 300—500 тыс клеток в 1,0 $см^3$. Приготовленной суспензией заражают двух кроликов массой до 2,0 кг внутривенно в дозе 1,0 $см^3$.

Вирулентные штаммы *Candida* вызывают гибель кроликов в период от 3 до 10 сут. В этот период у животных наблюдают депрессию, повышение температуры, исхудание, иногда паралич.

На вскрытии обнаруживают поражения прежде всего почек в виде множественных серовато-белых гранулем в корковом слое, а также печени, селезенки, сердца. Если зараженные кролики не гибнут через 10 сут, их убивают и при обнаружении гранулем в почках штамм относят к слабовирулентным (гибель у животных такие штаммы могут вызывать лишь на 20—30 сут после заражения).

В мазках, приготовленных из пораженных очагов павших или убитых животных, обнаруживают дрожжевидные клетки, иногда псевдомицелий.

7.8.10.4 Обработка результатов

При выделении культур *Candida stellatoidea, Candida pseudotropicalis, Candida krusei, Candida parakrusei, Candida guilliermondi, Candida parapsilosis,* пробу спермы признают контаминированной дрожжеподобными микроскопическими грибами. При выделении культур *Candida albicans, Candida tropicalis,*, а также при гибели лабораторных животных, зараженных *Candida stellatoidea, Candida pseudotropicalis, Candida krusei, Candida parakrusei, Candida guilliermondi, Candida parapsilosis*, пробу спермы признают контаминированной вирулентными штаммами дрожжеподобных микроскопических грибов.

7.8.11 Исследование на наличие грибов рода *Aspergillus, Absidia, Mucor, Rhizopus*

7.8.11.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в первичном выделении грибов, их идентификации и определении патогенных свойств (для *Aspergillus fumigatus, Absidia corimbifera, Absidia ramosa* определение патогенных свойств не проводят).

Микологическое исследование спермы на наличие в ней грибов *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus versicolor, Absidia corimbifera, Absidia ramosa, Mucor pusillus, Mucor racemosus, Rhizopus nigricans, Rnizopus cohnii* проводят по следующей схеме: первичное выделение грибов, идентификация и определение их патогенных свойств (кроме *Aspergillus fumigatus, Absidia corimbifera, Absidia ramosa*).

7.8.11.2 Проведение исследования

Свежеполученную неразбавленную сперму в соотношении 1 : 10 с 0,9 %-ным раствором натрия хлорида высевают в объеме по 0,5 $см^3$ на чашки Петри с питательной средой Сабуро и средой Чапека. Для выделения грибов родов *Aspergillus* можно использовать коммерческие среды: солодовый агар, микологический агар Киммига, агар с бенгальским розовым и хлортетрациклином, агар Чапека с дрожжевым экстрактом по 7.2.3.4, 7.2.3.8, 7.2.3.9, 7.2.3.10—7.2.3.12.

Свежеполученную разбавленную и замороженную сперму высевают без предварительного разбавления, или разбавляют, в зависимости от дозы расфасованной спермы, 1 : 1—1 : 4 и высевают 0,5 $см^3$ на чашку с питательной средой Сабуро.

При посеве спермы проводят контроль зараженности грибами воздуха в боксе, для чего чашку со средой оставляют открытой в течение 3 мин.

Чашки инкубируют при (24 ± 1) °С в течение 8 сут. Рост большинства грибов становится заметным через 3 сут.

Для подавления сопутствующей микрофлоры в питательные среды, используемые для первичного выделения грибов, после стерилизации можно добавлять антибиотики: пенициллин — 50 ЕД и стрептомицин 100 ЕД на 1,0 $см^3$ среды, имеющей температуру (45 ± 1) °С.

Родовую (а иногда и видовую) принадлежность грибов устанавливают в первичном посеве. При росте грибов, относящихся к роду *Aspergillus,* семейству *Mucoracea* выделяют чистые культуры для дальнейшей идентификации (установления вида) и, при необходимости, определения патогенных свойств.

С целью определения видовой принадлежности грибов, относящихся к роду *Aspergillus,* кроме сред Сабуро и Чапека, можно использовать коммерческие хромогенные среды для дифференциации аспергилл.

После окончания культивирования проводят макро- и микроскопическое исследования.

Макроскопическое исследование: при определении признаков грибов рассматривают колонии на месте их роста, учитывают цвет, форму, консистенцию колонии, характер роста, форму растущего края, наличие или отсутствие пигмента, цвет его, степень развития воздушного мицелия.

Микроскопическое исследование проводят после приготовления препарата. Для изучения *Aspergillus* и *Mucoraceae* частицы мицелия, взятые иглой из разных частей колонии — на старых (ближе к центру) и молодых (у края), помещают на предметное стекло в каплю жидкости, состоящей из равных частей воды, спирта и глицерина, осторожно снимают их другой иглой, накрывают покровным стеклом и рассматривают сначала при малом увеличении микроскопа (объектив 8×, 10×), затем — при большом (объектив 40×).

Родовую и видовую принадлежность выделенных культур грибов определяют по культурально-морфологическим свойствам, характерным для каждого рода (вида) (см. приложение Д).

7.8.11.3 Определение патогенности *Aspergillus* и *Mucoreceae*

Выращенную в течение 6—8 сут на агаровой среде культуру гриба смывают стерильным физиологическим раствором. Смыв центрифугируют в градуированных пробирках при 1000 об./мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок разводят до 1,0 $см^3$ стерильным физиологическим раствором. Количество клеток гриба в суспензии подсчитывают в счетной камере Горяева на 1,0 $см^3$. Для приготовления взвеси с плотностью, которая необходима для заражения подопытных животных, пользуются методом последовательного разведения.

Для приготовления споровой суспензии *Aspergillus fumigatus* желательно добавлять небольшое количество (1—2 капли) твина-80 (эфир олеиновой кислоты и сорбита).

Патогенность выделенных грибов определяют на двух кроликах, массой до 2,0 кг. Для заражения используют 1,0 $см^3$ суспензии, содержащей 1×10^6 спор, внутривенно. При изучении мукоровых грибов можно пользоваться суспензией, содержащей большее число спор, а также частицы гиф мицелия.

Смерть животного обычно наступает через 4—5 сут, иногда значительно позднее. Если в течение 10 сут животное не погибает, его убивают. При патолого-анатомическом вскрытии наиболее тяжелые поражения обнаруживают в легких и почках. Легкие гиперемированы, отечные, с хорошо заметными, особенно на разрезе, множественными серовато-беловатыми небольшими узелками (гранулемами). Почки увеличены, бугристые, гранулемы обычно хорошо заметны.

7.8.11.4 Обработка результатов

При выделении культур *Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus versicolor, Mucor pusillus, Mucor racemosus, Rhizopus nigricans, Rnizopus cohnii* пробу спермы признают контаминированной грибами.

При выделении культур *Aspergillus fumigatus, Absidia corimbifera, Absidia ramose*, а также при гибели лабораторных животных, зараженных *Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus versicolor, Mucor pusillus, Mucor racemosus, Rhizopus nigricans, Rnizopus cohnii,* пробу спермы признают контаминированной вирулентными штаммами грибов.

7.9 Методы молекулярно-генетических исследований. Выявление микроорганизмов рода *Mycoplasma*

Выявление микроорганизмов рода Mycoplasma из спермы допускается проводить с помощью готовых коммерческих тест-систем согласно инструкции по применению производителя или нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего настоящий стандарт[1)]

7.10 Оформление протокола испытания

В протоколе испытания необходимо указать метод испытания и полученные результаты. В нем должны быть также упомянуты все процедуры, не указанные в настоящем стандарте, или рассматриваемые как дополнительные, а также сведения о любых случаях, вероятно повлиявших на результаты.

В протокол испытаний должна быть включена вся информация, необходимая для точной идентификации образца.

8 Транспортирование и хранение

8.1 Сперма свежеполученная неразбавленная

Сперма не подлежит хранению и используется в течение 30 мин после получения.

8.2 Сперма свежеполученная разбавленная

8.2.1 Сперму транспортируют в термоконтейнерах различных типов при температуре от 5 °С до 25 °С (в зависимости от состава разбавителя).

8.2.2 Сперму хранят при температуре от 5 °С до 25 °С (в зависимости от состава разбавителя), аккуратно перемешивают плавными покачивающими движениями не менее двух раз в сутки.

8.2.3 Срок хранения спермы от 3 до 10 сут в зависимости от состава разбавителя.

Допускается использование разбавителей, соответствующих нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

8.3 Сперма замороженная

8.3.1 Сперму транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевозок грузов, действующими на данном виде транспорта.

8.3.2 Сперму хранят и транспортируют в сосудах Дьюара различного объема, заполненных жидким азотом по ГОСТ 9293, температурой минус 196 °С.

8.3.3 Срок хранения спермы при соблюдении условий хранения неограничен.

[1)] В Российской Федерации применяется тест-система «Мик-Ком». Информация приведена для удобства пользователей стандартом и не является рекламой.

Приложение А
(справочное)

Морфологические особенности бактерий рода *Clostridium*

Таблица А.1

Виды клостридий	Размер палочек (длина × ширина)	Морфология микробов	Расположение спор	Наличие капсулы	Подвижность
Clostridium perfringens	4—8 × 0,8—1,5 мкм	Грамположительные толстые палочки со слегка закругленными концами, расположены одиночно	Центральное, субтерминальное; в молодых культурах отсутствуют	+	Неподвижны
Clostridium histolyticum	3—5 × 0,5—0,8 мкм	Грамположительные стройные тонкие палочки с закругленными концами, расположены одиночно, попарно, редко цепочками	Субтерминальное «Игольное ушко»	–	Перитрих
Clostridium septicum	2—10 × 0,8—2,0 мкм	Грамположительные изолированные палочки с закругленными концами, в мазках-отпечатках с серозных оболочек-нитей	Центральное, субтерминальное	–	Перитрих
Clostridium oedematiens	5—10 × 0,8—1,0 мкм	Грамположительные крупные полиморфные палочки с закругленными или обрубленными концами, расположены одиночно, редко попарно или цепочками из трех-четырех члеников	Центральное, субтерминальное	–	Перитрих
Clostridium sporogenes	3—7 × 0,8—1,1 мкм	Грамположительные палочки с закругленными концами, расположены одиночно, иногда цепочками	Центральное, субтерминальное; в молодых культурах почти у всех палочек	–	Перитрих
Clostridium sordellii	2—4 × 1,0—1,5 мкм	Грамположительные крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены чаще цепочками по два—четыре членика	Центральное, субтерминальное	–	Перитрих

Приложение Б
(справочное)

Культуральные и биохимические признаки бактерий рода *Clostridium*

Таблица Б.1

Виды клостридий	Рост на среде Китта-Тароцци	Оптимум разряжения воздуха, мм рт. ст.	Форма колоний на кровяном агаре	Рост в молоке	Рост в желатине	Ферментация углеводов					
						Глюкоза	Сахароза	Маннит	Глицерин	Мальтоза	Галактоза
Clostridium perfringens	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование через 4—5 ч	40	Круглые колонии зеленоватого цвета, гемолиз сильный, грязно-коричневого цвета	Бурное свертывание молока, образование губкообразного сгустка	Медленное разжижение желатина 3—5 сут	+	+	–	+/-	+	+
Clostridium histolyticum	Интенсивное помутнение без газообразования	8—15	Мелкие гладкие колонии (росинки) без гемолиза	Свертывание молока	Сильное помутнение	–	–	–	–	–	–
Clostridium septicum	Интенсивное помутнение среды, обильное газообразование	8—15	Нежные кружевные колонии с зоной гемолиза	Свертывание молока	Медленное разжижение желатина	+	–	–	–	+	+
Clostridium oedematiens	Нежное помутнение среды, рост более интенсивный внизу, через 18—24 ч бульон просветляется, на дне выпадает хлопьевидный осадок, газообразование слабое	3—5	Шероховатые, корневидные, складчатые с изрезанными краями и выпуклым темным центром, гемолиз сильный, прозрачный, но может отсутствовать (II форма)	Свертывание молока	Разжижает на 2—4 сут	+	–	–	–	+/–	–
Clostridium sordellii	Помутнение более интенсивное внизу, умеренное газообразование; при старении культур — слизистый осадок	8—15	Неправильной формы, корневидные, складчатые, с сероватой шероховатой поверхностью и изрезанными краями, гемолиз сильный, но может отсутствовать (II форма)	Свертывание молока	Разжижает	+	–	–	–	+	–

Окончание таблицы Б.1

Виды клостридий	Рост на среде Китта-Тароцци	Оптимум разряжения воздуха, мм рт. ст.	Форма колоний на кровяном агаре	Рост в молоке	Рост в желатине	Ферментация углеводов					
						Глюкоза	Сахароза	Маннит	Глицерин	Мальтоза	Галактоза
Clostridium sporogenes	Рост обильный, кусочки печени обволакивают слизистым осадком, верх среды прозрачный, газообразование слабое. Культура издает неприятный гнилостный запах	15—20	Вязкие с изрезанными краями, напоминающие корневище, погружены в агар, поверхность матовая с желтоватым центром, зона гемолиза интенсивная, резко ограниченная (VI форма)	Пептонизация	Разжижает	–	–	–	–	–	–

Приложение В
(справочное)

Патологоанатомические изменения у лабораторных животных, вызванные бактериями рода *Clostridium*

Таблица В.1

Название возбудителя	Сроки гибели морских свинок, ч	Патологоанатомическая картина у морских свинок, зараженных клостридиями
Clostridium septicum	14—28	Кожа легко отделяется от мышц. Мышцы и подкожная клетчатка светло-красного или розового цвета, в подкожной клетчатке большое количество пузырьков газа. Кишечник вздут, наполнен разжиженными массами, содержащими пузырьки газа, сосуды инъецированы. В грудной полости и сердечной сорочке обнаруживают значительное количество транссудата
Clostridium oedematiens	12—36	На месте инъекции наблюдается желатинозный, студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные
Clostridium sordellii	12—30	На месте инъекции наблюдается желатинозный, студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные
Clostridium perfringens, типы A и D	36—48	Кожа на месте инъекции часто отслаивается от мускулатуры, образуя мешок. Мышцы имеют вид вареного мяса, серовато-грязного цвета (более выражено при заражении типом А). Кишечник вздут, сосуды инъецированы
Clostridium perfringens, типы B и C	36—48	Кожа на месте инъекции легко отделяется, но не отслаивается. Мускулатура сухая, красного цвета различных оттенков. Кишечник вздут, геморрагически воспален, иногда образуются язвы (тип В)
Clostridium histolyticum	18—48	При подкожном заражении большей частью наблюдают выздоровление морских свинок. При заражении в мышцу бедра кожа красно-фиолетовая, напряжена, иногда лопается. Мышцы теряют свою структуру, расплавляются и превращаются в кашицеобразную массу с примесью сгустков крови. Мягкие ткани отделяются от костей и сосудов. Газ не образуется, гнилостного распада нет
Clostridium sordellii		На месте инъекции наблюдается желатинозный студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные
Clostridium sporogenes		Патогенен в ассоциации с другой микрофлорой

Приложение Г
(справочное)

Культурально-морфологические признаки грибов рода *Candida*

Таблица Г.1

Наименование вида	Агар Сабуро	Сусловый агар	Кровяной агар	Агар Литмана	CHROM agar Candida	Среда Пагано-Левин-Трейо с агаром	Бульон Сабуро	Кукурузный агар
Цвет и морфология колоний на питательной среде								Микроскопическое строение
Candida albicans	Кремовые, гладкие, влажные, с возрастом морщинистые или с редкими бороздками	Белые, кремовые, мягкие, гладкие, блестящие с ровными краями, глубоко врастают в субстрат, 2—3 см в диаметре	Тускло-серый рост по всей поверхности среды	Конусовидные, блестящие, вначале гладкие; окраска темно-синяя в старых культурах	Зеленый	Кремовые до слабо-розовых	Глубинный рост	Псевдомицелий хорошо развит, бластоспоры; хламидоспоры крупные, круглые, двухконтурные, находятся на боковых и концевых точках по краям колонии
Candida tropicalis	Кремовые, гладкие, влажные, с возрастом морщинистые или с редкими бороздками	Серо-белые, круглые с зубчатыми краями, матовые, слабо врастают в субстрат, 3,5—4,5 см в диаметре	Обильные, серые, окруженные мицелиальной бахромой	Плоские бледно-синие	От темно-синего до сине-серого, темный венчик на агаре	Темно-красные	Небольшая поверхностная пленка, пузырьки пены	Псевдомицелий хорошо развит, ветвистый, бластоспор и псевдоконидии обильные, хламидоспоры отсутствуют
Candida pseudo-tropicalis	Рост нехарактерный	Серые, матовые, сметанообразной консистенции, слегка приподнятые, 2—3,5 см в диаметре	Мелкие, нехарактерные	Плоские бледно-синие	—	Розовые	Поверхностной пленки нет	Псевдомицелий слабо развит, бластоспор мало, хломидоспоры отсутствуют
Candida ksrusei	Гладкие, сухие	Белые или серые, гладкие, суховатые, матовые плоские, с неровными выямчатыми краями; врастание в глубь среды отсутствует	Мелкие, различной формы, плоские или высокие	Плоские бледно-синие	Бледно-розовый, пурпурный (шершавая поверхность, широкие белые края)	Белые	Широкая поверхностная пленка	Псевдомицелий хорошо развит, бластоспоры удлиненные, хламидоспоры отсутствуют

Окончание таблицы Г.1

Наименование вида	Агар Сабуро	Сусловый агар	Кровяной агар	Агар Литмана	CHROM agar Candida	Среда Пагано-Левин-Трейо с агаром	Бульон Сабуро	Кукурузный агар
Цвет и морфология колоний на питательной среде								Микроскопическое строение
Candida parakrusei	Гладкие	Белые с гладкими краями и поверхностной исчерченностью по периферии, выпуклые; врастание в глубь среды отсутствует; 2—3 см в диаметре	Мелкие, зеленовато-белые	Плоские бледно-синие	—	Бледно-розовые	Поверхностного роста нет	Псевдомицелий хорошо развит, бластоспор мало, хламидоспоры отсутствуют
Candida stellatoidea	Кремовые, гладкие	Белые, желтоватые, мягкие, сметанообразные, складчатые (звездчатые), борозды довольно глубокие	Звездчатой формы	Наличие отростков, суживающихся к концу	—	Бледно-красные	Поверхностного роста нет	Псевдомицелий хорошо развит, большие шарообразные бластоспоры, хламидоспоры обильные
Candida guilliermondi	Кремовые	Белые, плоские, влажные, гладкие, с короткими отпрысками в субстрат	Тускло-серый рост по всей поверхности среды	Плоские	Бледно-розовый, пурпурный	Темно-красные	Поверхностного роста нет	Псевдомицелий умеренно развит, бластоспоры мелкие, хламидоспоры отсутствуют
Candida parapsilosis	—	Белые, кремовые до желтоватых, блестящие, мягкие, гладкие (иногда слабоскладчатые) колонии с ровными краями	—	—	Белый, бледно-розовый	—	—	Псевдомицелий хорошо развит, тонкий и ветвистый, бластоспоры

Примечание — На кукурузном агаре рост культур при температуре (24 ± 1) °С наблюдается через 24—48 ч.

Приложение Д
(справочное)

Культурально-морфологические свойства грибов отдельных видов

Таблица Д.1

№ п/п	Вид	Культурально-морфологические свойства
Род *Aspergillus* Мицелий у видов рода *Aspergillus* бесцветный или светлоокрашенный, с перегородками, у некоторых видов (*Aspergillus flavus, Aspergillus niger*) образует шаровидные склероции из толстостенных клеток. Цвет колонии определяется массой конидий, развивающихся на конидиеносцах. Конидиеносцы на концах имеют вздутие (верхушечный пузырь) различной формы, на поверхности которого располагаются цилиндрические клетки-стеригмы в один или два яруса, несущие цепочки конидий. Вздутие конидиеносца, стеригмы и цепочки конидий составляют головку аспергилла. Головка называется радиальной в случае, если стеригмы расположены радиально на поверхности всего вздутия и цепочки конидий радиально расходящиеся. Нерадиальная головка имеет прижатые кверху стеригмы, направленные параллельно оси конидиеносца, и сближенные в плотную колонку цепочки конидий		
1	*Aspergillus fumigatus*	Колонии широко разрастающиеся, бархатистые, редко пушисто-войлочные от развития воздушного мицелия, сначала голубовато-зеленые, затем зеленые, с возрастом темнеющие. Обратная сторона колонии бесцветная или окрашена в желто-коричневые тона. Конидиеносцы гладкие, короткие, до 300 мкм длиной и 5—8 мкм толщиной, часто более или менее зеленые. Головки нерадиальные — в верхней части колбообразного вздутия до 20—30 мкм в диаметре развиваются одноярусные стеригмы 6—8 (длина) × 2—3 (толщина) мкм, расположенные не строго параллельно оси конидиеносца. Конидии шиповатые, округлые, обычно 2,5—3 мкм в диаметре, цепочки их склеены в колонку
2	*Aspergillus flavus*	Колонии широко разрастающиеся, зеленые, часто с оттенком желтой, лимонной окраски, с возрастом обычно темно-желто-зеленые; на обратной стороне бесцветные, или розовато-тускло-желтоватые. Многие штаммы образуют склероции, хорошо видимые невооруженным глазом в виде шаровидных твердых образований, сначала белые, затем коричневые. Конидиеносцы 400—1000 × 5—15 мкм, с бесцветной шероховатой оболочкой, образуют на верхушке у молодых культур продолговатые, позже полукруглые или круглые вздутия 10—40 мкм в диаметре. Головки радиальные. Стеригмы или одноярусные 10—15 × 3—5 мкм (главным образом на маленьких вздутиях) или двухъярусные (на больших вздутиях), в последнем случае стеригмы I яруса — 7—10 × 3—4 мкм, II яруса — 7—10 × 2,5—3,5 мкм. Конидии яйцевидные или шаровидные, 3—6 мкм в диаметре, от бесцветных до желто-зеленых, иногда почти гладкие, но большей частью с шероховатой оболочкой
3	*Aspergillus niger*	Колонии быстро растущие, бурые, черновато-коричневые или угольно-черные, на обратной стороне бесцветные или желтоватые, иногда образуют твердые белые, с возрастом становящиеся коричневыми, склероции. Конидиеносцы 200—400× ×7—10 мкм, иногда значительно крупнее, с толстостенной гладкой оболочкой, обычно желтые, а ближе к вершине коричневые. Головки радиальные, крупные. Вздутие шаровидное, 20—50 мкм, иногда до 100 мкм в диаметре, стеригмы одно- и двухъярусные. Стеригмы первого яруса 10—15 × 6—8 мкм, тесно скученные, второго яруса 6—10 × 2—3 мкм, более или менее коричневые или почти черные. Конидии иногда гладкие, но чаще шероховатые или шиповатые, коричневые или бурые

Продолжение таблицы Д.1

№ п/п	Вид	Культурально-морфологические свойства
4	*Aspergillus terreus*	Колонии широко разрастающиеся, бархатистые, плоские, гладкие, или с неглубокими радиальными бороздами, орехово-бурые, на обратной стороне палевые, желтые или темно-бурые. Конидиеносцы более или менее извилистые, гладкие, бесцветные, 50—150—(250) × 5—8 мкм, у вершины с полушаровидным вздутием 10—16 мкм в диаметре. Головки нерадиальные. Стеригмы двухъярусные. Стеригмы первого яруса 7—9 × 2—2,5 мкм, второго яруса 5—7 × 2—2,5 мкм. Конидии шаровидные или слегка эллиптические, гладкие, 2,5 × 2,2 мкм; в цепочках, соединенных в длинную колонку
5	*Aspergillus versicolor*	Колонии медленно растущие, компактные, у некоторых штаммов бархатистые, у других пушистые или же штамм имеет тот и другой признак; вначале белые, затем приобретают желтые оттенки, оранжево-желтые, дымчато-зеленые или телесного цвета; зеленые тона могут отсутствовать. Обратная сторона и субстрат от желтого и оранжевого цвета до розового, пурпурно-красного или красного. Конидиеносцы 500—700 × 5—10 мкм, с гладкой бесцветной оболочкой. Головки радиальные. Вздутие бутыльчатое или почти шаровидное, 12—20 мкм в диаметре, в верхней, большей своей части, образует радиально расположенные двухъярусные стеригмы, стеригмы первого яруса 3—10 × 3—5 мкм, второго яруса 5—10 × 1,5—2 мкм. Конидии шаровидные, обычно слегка шероховатые, 2,5—3 мкм в диаметре, в свободно расходящихся цепочках
6	*Aspergillus nidulans*	Колонии широко разрастающиеся, гладкие, бархатистые, темно-зеленые или желтовато-зеленые на обратной стороне пурпурно-красные, красно-коричневые или с возрастом темно-коричневые. Конидиеносцы более или менее извилистые, гладкие, с коричневой оболочкой, 50—100(200) × 3—5 мкм. Головки нерадиальные. Вздутие куполовидное, 7—15 мкм в диаметре; двухъярусные стеригмы покрывают верхнюю часть вздутия, направлены параллельно оси конидиеносца, стеригмы первого яруса 5—8 × 2—3 мкм, второго — 5—6 × 2—2,5 мкм. Конидии шаровидные, 3—3,5 мкм в диаметре, гладкие или шероховатые, в массе зеленые, в цепочках, склеенных в колонки. Помимо конидиального имеет сумчатое спороношение, возникшее в результате полового процесса и представленное сумками с аскоспорами, развивающимися внутри плодовых тел — клейстотециев (клейстокарпиев). Клейстотеции шаровидные, 100—200 мкм в диаметре, хорошо различимы невооруженным глазом вначале в центре колонии, затем и по ее периферии, имеют желтоватую или коричневую окраску за счет окружающих их покровных клеток, образованных конечными клетками вегетативных гиф, шаровидных до 25 мкм в диаметре, с очень толстой оболочкой до 4—5 мкм. Стенка клейстотециев тонкая, красноватая. Сумки, заполняющие клейстотеции, многочисленные, состоят из восьми аскоспор. Аскоспоры чечевицеобразные, пурпурно-красные, гладкие, с двумя экваториальными гребешковидными образованиями, 3,8—4,5 × 3,5—4 мкм
Семейство *Mucoraceae* Мицелий хорошо развит, представлен одиночными, разветвленными гифами с далеко отстоящими друг от друга поперечными перегородками или, чаще, без перегородок, главным образом поверхностный. Иногда мицелий прикрепляется к субстрату с помощью корешкообразных разветвленных выростов-ризоидов. В этом случае он часто развивается в виде дугообразно изогнутых воздушных гиф-столонов. Некоторые виды образуют хламидоспоры — клетки с утолщенной оболочкой, одиночные или собранные цепочкой, могут возникать на протяжении гиф (интеркалярные) или на их концах (терминальные). Бесполое воспроизведение мукоровых грибов эндогенное. Органы бесполого размножения представлены спорангиями, развивающимися на концах простых или разветвленных спорангиеносцев и содержащими многочисленные одноклеточные спорангиоспоры. Характерным образованием внутри спорангии является колонка (столбик) шаровидной, грушевидной и др. формы. У некоторых видов спорангиеносец у основания спорангия расширяется в апофизу. Оболочка спорангия или полностью растворяется в воде, или сохраняется у основания колонки в виде воротничка. Половой процесс происходит путем соединения двух специальных клеток (гаметангиев) и образования зигоспоры. Семейство *Mucoraceae* объединяет 12 родов, среди них *Mucor, Rhizopus, Absidia*		

Продолжение таблицы Д.1

№ п/п	Вид	Культурально-морфологические свойства
Род *Mucor* Спорангиеносцы простые или разветвленные (моноподиально, симподиально, мутовчато), неокрашенные или бледноокрашенные, отходят одиночно от гиф мицелия. Спорангии шаровидные, без апофизы; оболочка растворяется в воде или разрывается и остается у основания колонки в виде воротничка. Столбик различной формы. Ризоиды и столоны обычно отсутствуют		
1	*Mucor racemosus*	Колонии быстрорастущие, без воздушного вегетативного мицелия, пушистые, 0,8—1,5 см высотой, трудно смачиваемые водой, легко разрывающиеся при незначительном прикосновении. Спорангиеносцы отходят от субстрата, кистевидноразветвленные, до 1,5 см длины и 8—20 мкм толщины. Спорангии шаровидные, 40—100—(140) мкм в диаметре, вначале желтоватые, затем темно-коричневые, просвечивающие. Колонка коричневатая или темно-коричневая, обратно-грушевидная, иногда эллиптически-шаровидная, 20—60—(70) × 15—50—(60) мкм. Споры эллиптически-шаровидные, эллиптические, (4)—5—8—(12) × 4—6—(8) мкм или шаровидные (4)—5—8—(20) мкм в диаметре, бесцветные, в массе бледно-сероватые. Имеются многочисленные хламидоспоры 10—20 × 10—15 мкм, одиночные или в коротких цепочках. Ризоиды и столоны отсутствуют
2	*Mucor pusillus.*	Колонии быстрорастущие, 0,2—0,4 см высоты, обычно без воздушного вегетативного мицелия, бархатистые, вначале темно-серые, затем коричневато или рыжевато-темно-серые, с обратной стороны коричневатые. Имеются немногочисленные простые или слабо разветвленные, большей частью неокрашенные ризоиды. Столоны слабо выраженные, также немногочисленные. Споронгиеносцы прямостоящие, отходят от субстрата, прямые, до 0,4 см высоты, 10—25 мкм в диаметре, с (1)2—5(7) мкм короткими веточками в верхней части. Спорангии шаровидные, 20—70(80) мкм в диаметре, вначале неокрашенные, затем серые или свинцово-серые. Колонка яйцевидная или обратно-грушевидная, 20—50 × 20—45 мкм, коричневато- или серовато-металлического цвета. Споры шаровидные, гладкие, (2,5) —3,5—4,5 (5) мкм в диаметре
Род *Rhizopus.* Колонии с развитым воздушным мицелием в виде дугообразно изогнутых столонов, прикрепляющихся к субстрату с помощью ризоидов. Спорангиеносцы темноокрашенные, простые или, реже, разветвленные, отходят пучком по 1—5—(7) мкм от шейки ризоида (т. е. в месте прикрепления столона к субстрату), от столонов или являются продолжением последних. Столоны и ризоиды светлоокрашенные. Спорангии шаровидные или приплюснутые, бурые, черно- или серо-бурые. Колонка светлоокрашенная, от шаровидной до цилиндрической или обратно-грушевидной формы, с воронковидной или блюдцевидной окрашенной апофизой. Споры шаровидные, эллиптические или неправильной формы, часто угловатые и продольно исчерченные. У большинства видов имеются хламидоспоры		
1	*Rhizopus nigricans*	Колонии быстрорастущие войлочные и рыхловойлочные 1—1,5 см высотой, вначале оливково-зеленые или оливково-темно-зеленые, затем оливково- или буровато-серые, обычно наползающие на боковые стенки и крышку чашки Петри. Столоны хорошо выражены. Розоиды темно-коричневые, разветвленные, хорошо развитые. Спорангиеносцы обычно прямые, неразветвленные, бурые или темно-бурые, 500—3000—(4000) × 10—35 мкм; отходят пучком по 2—3—5 мкм, реже I от шейки ризоида. Спорангии (50)—80—250(350) мкм в диаметре, черноватые. Колонка шаровидная или приплюснуто-шаровидная, крупная — (40)—50—120—(150) мкм в диаметре, бледно-бурая. Апофиза блюдцевидная. Споры эллиптически-шаровидные или неправильной формы, сильно угловатые, с продольной исчерченностью, серые или бледно-коричневато-серые, 4—12—(16) × 4—10—(12) мкм. Хломидоспоры отсутствуют

Окончание таблицы Д.1

№ п/п	Вид	Культурально-морфологические свойства
2	*Rhizopus cohnii*	Колонии быстрорастущие, рыхловойлочные или пушисто-рыхло-войлочные, со слабо или хорошо развитым воздушным вегетативным мицелием, 0,2—0,6—(1) см высоты, сначала серые или темно-серые, затем становятся свинцово- или синевато-темно-серыми. Ризоиды слабо выражены, неразветвленные или коротко и слабо разветвленные, коричневатые. Столоны слабо выраженные. Спорангиеносцы темно-коричневые или бледно-буроватые, простые или с раздвоенной или мутовчато разветвленной верхушкой, отходят по 1—3—(5) мкм от шейки ризоида или столоновидных гиф; длина их 75—500—(700) мкм, толщина (6)—10—20 мкм. Спорангии 40—120—(140) мкм в диаметре. Колонка чаще эллиптически-цилиндрическая или обратногрушевидная, 20—70—(100) × 20—60—(80) мкм, вначале синевато-серая, затем коричневатая. Апофиза блюдцевидная. Споры шаровидные, гладкие, бледно-голубоватые, в массе синевато-черные, 4—6—(7) мкм в диаметре. Имеются довольно многочисленные хламидоспоры
Род *Absidia* Колонии с развитым воздушным мицелием, обычно пушистые и светлоокрашенные. Ризоиды обычно имеются, неокрашенные, простые (стержневидные) или разветвленные, столоны выражены в различной степени. Спорангиеносцы простые или с 1—2—(3) боковыми веточками, отходят мутовкой или одиночно большей частью от вершины дуги столона. Спорангии (без учета апофизы) шаровидные или слегка яйцевидные, мелкие. Колонка полушаровидная, коротконическая, реже сосочковидная; гладкая или с коническим выступом, булавовидным придатком или с зубчиками; иногда впячивается в полость апофизы. Апофиза воронковидная, реже бокаловидная, придает спорангию обратногрушевидную форму. Споры мелкие, различной формы. Могут иметь хламидоспоры и жировые клетки — крупные шаровидные или другой формы клетки, обычно наполненные каплями жира		
1	*Absidia corymbifera*	Колонии пушистые, превышают 0,3 см высоты, вначале неокрашенные или бледно-пепельного цвета, затем становящиеся пепельными или пепельными с бледно-зеленоватым оттенком, обратная сторона часто желтая или золотисто-желтая. Столоны слабо выраженные. Спорангиеносцы отходят одиночно от столоновидных гиф или являются продолжением последних, до 400—(600) мкм длины. Апофиза воронковидная. Споры гладкие, эллиптически-шаровидные и эллиптические, 3,5—6—(7) х 3,5—5,5—(6,5) мкм. В субстрате и над субстратом образуются жировые клетки различной формы, чаще крестообразные или неправильношаровидные, до 150—(200) мкм в диаметре, бледно-серые или неокрашенные. Хламидоспоры отсутствуют
2	*Absidia ramosa*	Колонии пушистые или войлочно-пушистые, 0,7—1,5 см высоты, вначале неокрашенные или бледно-серые, затем становящиеся серыми, синевато-серыми, оливково-серыми, иногда с желтоватой или золотисто-желтоватой обратной стороной. Столоны слабо выраженные, неокрашенные или бледно-оливковые. Ризоиды разветвленные. Спорангиеносцы отходят одиночно от столоновидных гиф или являются продолжением последних; прямые или слегка изогнутые, (6)—100—400—(600) × 4—10—(14) мкм; неразветвленные или с мутовкой веточек до 200 мкм длины ниже верхушечного спорангия. Спорангии шаровидные (без учета апофизы) или слегка яйцевидные, 10—80—(120) мкм в диаметре, серые или темно-серые. Колонка полушаровидная, эллиптически-шаровидная, иногда слегка коническая, 10—50—(60) × 6—40(50) мкм, буровато-серая или коричневатая, гладкая или реже 1—3—(5) мкм мелкими зубчиками, иногда впячивается в полость апофизы. Апофиза воронковидная, темно-серая или буровато-серая. Споры неокрашенные, короткоцилиндрические, более или менее усеченные на концах, или эллиптически-цилиндрические, 3,5—6—(8) × 2—4—(5) мкм. Жировые клетки немногочисленные, образуются в субстрате, шаровидные или неправильношаровидные, до 100 мкм в диаметре. Хламидоспоры отсутствуют

Библиография

[1] Единые ветеринарные (ветеринарно-санитарные) требования, предъявляемые к товарам, подлежащим ветеринарному контролю (надзору) (утверждены Решением Комиссии Таможенного союза от 18 июня 2010 г. № 317)[1)]

[2] Ветеринарно-санитарный Кодекс МЭБ. Париж, 2015

[1)] Действуют на территории Таможенного союза.

УДК 636/639—619:611.013.11-7:006.354 МКС 11.220

Ключевые слова: сперма кобелей, требования и нормы, методы исследований, органолептические свойства, физические свойства, биологические свойства, морфология, сперматозоиды, прямолинейно-поступательное движение, выживаемость спермиев, аномальная морфология, патогенные микроорганизмы, условно-патогенная микрофлора, микроскопические грибы, дрожжи

Редактор *Е.Ю. Митрофанова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 25.04.2024. Подписано в печать 07.05.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 6,98. Уч.-изд. л. 5,58.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru