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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32198— 2013

Средства воспроизводства

СПЕРМА

Методы микробиологического анализа

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0–92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом животноводства Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии), Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ») и Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Научно-исследовательский институт племенного дела» (ФГБНУ «ВНИИплем»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации (ТК 148)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 июня 2013 г. № 57-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	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 06 сентября 2013 г. № 844-ст введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 года

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2014

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 и определения 3
4 Условия выполнения исследований и требования безопасности 3
4.1 Условия выполнения исследований 3
4.2 Требования безопасности 3
5 Оборудование, реактивы, культуральные среды, посуда и материалы 4
6 Отбор и подготовка проб 6
6.1 Общие требования 6
6.2 Отбор проб 6
6.3 Подготовка проб 6
7 Подготовка к исследованиям 6
7.1 Подготовка лабораторной посуды и материалов 6
7.2 Приготовление сред и реактивов 7
8 Методы испытаний 9
8.1 Определение общего количества микроорганизмов 9
8.2 Определение бактерий группы кишечной палочки 10
8.3 Исследование спермы на наличие синегнойной палочки 12
8.4 Исследование спермы на наличие анаэробной микрофлоры 12
8.5 Исследование спермы на наличие грибов 12
8.6 Исследование спермы на наличие золотистого стафилококка (Staphylococcus aureus) 12
8.7 Идентификация выделенных микроорганизмов 12
8.8 Изучение морфологических и культуральных свойств микроорганизмов 12
8.9 Определение патогенности выделенных микроорганизмов 13
Библиография 14

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

Методы микробиологического анализа

Product for reproduction.
Semen.
Microbiological analysis technique

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на свежеполученную неразбавленную, свежеполученную разбавленную и замороженную сперму сельскохозяйственных животных (далее — сперма) и устанавливает методы определения микробиологических показателей.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.0.004–90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.005–88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.008–76 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.011–89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ 427–75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 857–95 Кислота соляная синтетическая техническая. Технические условия

ГОСТ 975–88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 1341–97 Пергамент растительный. Технические условия

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 1820–2001 Спички. Технические условия

ГОСТ 2874–82 Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством

ГОСТ 3145–84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 3760–79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 4159–79 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4204–77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4220–75 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 4232–74 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233–77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 4919.1–77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов

ГОСТ 5100–85 Сода кальцинированная техническая. Технические условия

ГОСТ 5556–81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 6318–77 Натрий сернокислый технический. Технические условия

ГОСТ 6672–75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6824–96 Глицерин дистиллированный. Технические условия

ГОСТ ISO 7218–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ 9147–80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9245–79 Потенциометры постоянного тока измерительные. Общие технические условия

ГОСТ 9284–75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9412–93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 9871–75 Термометры стеклянные ртутные электроконтактные и терморегуляторы. Технические условия

ГОСТ ISO 11133-1–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории

ГОСТ ISO 11133-2–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13739–78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805–76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919–83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электро-шкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317–87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ ИСО/МЭК 17025–2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 17151–81 Посуда хозяйственная из листового алюминия. Общие технические условия

ГОСТ 17206–96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 17308–88 Шпагаты. Технические условия

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19126–2007 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия

ГОСТ 19808–86 Стекло медицинское. Марки

ГОСТ 20730–75 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия

ГОСТ 21239–93 Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21241–89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22300–76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия

ГОСТ 22649–83 Стерилизаторы воздушные медицинские. Общие технические условия

ГОСТ 23932–90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24104–2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25706–83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 27775–88 Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных. Термины и определения

ГОСТ 28085–2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности

ГОСТ 28498–90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29112–91 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия

ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 30266–95 Мыло хозяйственное твердое. Общие технические условия

ГОСТ 32222–2013 Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

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

3.1 **группа бактерий кишечной палочки:** Все разновидности бактерий, способные ферментировать глюкозу или маннит, с выделением кислоты и газа в жидкую среду в течение 24 ч инкубации при температуре 37,5 °С ± 0,5 °С.

3.2 **коли-титр:** Наименьший объем исследуемого материала, выраженный в $см^3$, в котором обнаружена одна кишечная палочка.

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

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

3.4 **бродильный титр:** Наименьшее количество продукта, выраженное в граммах (г) или кубических сантиметрах ($см^3$), в котором обнаружена хотя бы одна бактерия группы кишечной палочки.

3.5 **гемолитические свойства:** Способность гемолизировать эритроциты крови.

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

3.7 **биопроба:** Испытание какого-либо вещества (лекарственного препарата, синтетического органического вещества, гормона и т. п.) с целью определения его биологической активности по отношению к какому-либо организму или клетке в сравнении с объективным контролем.

4 Условия выполнения исследований и требования безопасности

4.1 Условия выполнения исследований

4.1.1 Общие требования проведения микробиологических исследований и работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности — по ГОСТ ISO 7218.

4.1.2 Общие требования к помещениям — по ГОСТ ISO 7218.

4.1.3 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ИСО/МЭК 17025.

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

4.2 Требования безопасности

4.2.1 Общие требования биологической безопасности — по ГОСТ 12.1.008.

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

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

4.2.4 Средства защиты работающих — по ГОСТ 12.4.011, воздух рабочей зоны должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005.

5 Оборудование, реактивы, культуральные среды, посуда и материалы

5.1 При проведении микробиологических исследований спермы используют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, посуду и материалы:

- анализатор потенциометрический для контроля pH, обеспечивающий измерение с погрешностью до ± 0,01 ед. pH по ГОСТ 9245;
- баню водяную с терморегулятором, позволяющую поддерживать температуру от 20 °С до 100 °С с отклонением 1 °С от заданной;
- весы с максимальным пределом взвешивания 1000 г (типа ВЛР-1) и с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 10 мг по ГОСТ 24104;
- весы с максимальным пределом взвешивания 160 г (типа ВЛКТ-160) и с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 5 мг по ГОСТ 24104;
- встряхиватель;
- гомогенизатор или смеситель лабораторный;
- дистиллятор электрический;
- шкаф ламинарный;
- микроскоп световой биологический с бинокулярной насадкой с увеличением 40 — 1000^{x};
- прибор нагревательный для варки сред из сухих препаратов, кипячения мембранных фильтров, расплавления питательного агара;
- плитку электрическую по ГОСТ 14919;
- прибор для счета колоний микроорганизмов типа СКМ-1;
- стерилизаторы паровые медицинские;
- термометры ртутные электроконтактные ТПК по ГОСТ 9871;
- термометры жидкостные стеклянные с диапазоном измерения температуры от 0 °С до 50 °С и от 50 °С до 100 °С по ГОСТ 28498;
- стерилизатор электрический суховоздушный типа АТ, позволяющий поддерживать температуру от 20 °С до 50 °С с отклонением до 0,5 °С от заданной по ГОСТ 22649;
- термостат биологический, обеспечивающий поддержание температуры в водяной бане 39 °С ± 1°С ;
- холодильник портативный или термоконтейнер с емкостями для горячей воды или льда;
- холодильник электрический бытовой любого класса (SN, N, ST/T), позволяющий поддерживать температуру не более 5 °С по ГОСТ 16317;
- шкаф сушильный, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С;
- камера Вольфгюгеля для подсчета колоний, представляющая собой стеклянную пластинку, разделенную на 144 квадрата, каждый из которых имеет площадь 1 $см^3$;
- колбы широкогорлые специальные для стерилизации и хранения питательных сред из термостойкого стекла вместимостью 500 $см^3$ с герметично завинчивающимися крышками;
- кастрюли разной вместимостью по ГОСТ 17151;
- пипетки градуированные по ГОСТ 29227;
- посуду лабораторную стеклянную (стаканы, воронки, стеклянные палочки, чашки Петри, цилиндры, колбы, чашки лабораторные, спиртовки, пробирки) по ГОСТ 23932 и ГОСТ 25336;
- посуду мерную лабораторную стеклянную (цилиндры с носиком, мензурки, колбы, пробирки и пр.) различной вместимости по ГОСТ 1770;
- промывалки;
- флаконы вместимостью 100–200 $см^3$;
- чашки, стаканы фарфоровые, ступки и пестики фарфоровые разных размеров по ГОСТ 9147;
- бумагу пергаментную по ГОСТ 1341;
- бумагу индикаторную;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556;
- груши резиновые разных размеров;
- карандаши по стеклу (стеклографы);
- маркеры по стеклу;
- тушь черную;
- лампу ультрафиолетовую;
- линейки измерительные металлические по ГОСТ 427;

- лупы складные карманные по ГОСТ 25706;
- марлю по ГОСТ 9412;
- ножницы анатомические по ГОСТ 19126;
- ножницы хирургические по ГОСТ 21239;
- перчатки резиновые;
- петли бактериологические;
- пинцеты, скальпели анатомические по ГОСТ 21241;
- прибор для окраски предметных стекол или ванночку эмалированную с мостиком;
- пробки (силиконовые, ватно-марлевые, резиновые) конусные, выдерживающие стерилизацию сухим жаром;
- спички по ГОСТ 1820;
- стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672;
- стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284;
- стекло медицинское по ГОСТ 19808;
- фильтры мембранные со средним размером диаметра пор 0,5 мкм и планктонные с размером диаметра пор 3–5 мкм, диска — 35 мм;
- фильтры обеззоленные;
- часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145;
- шпагат по ГОСТ 17308;
- шпатели пластмассовые и металлические по ГОСТ 19126;
- штатив для пробирок.

5.2 При проведении микробиологических анализов спермы используют следующие реактивы:

- глюкозу медицинскую по ГОСТ 975;
- лактозу;
- маннит;
- соду кальцинированную по ГОСТ 5100;
- кислоту соляную по ГОСТ 857;
- кислоту серную по ГОСТ 4204;
- калий двухромовокислый по ГОСТ 4220;
- аммиак водный (нашатырный спирт) по ГОСТ 3760;
- эфир диэтиловый медицинский по ГОСТ 22300;
- спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300;
- калий йодистый по ГОСТ 4232;
- йод по ГОСТ 4159;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- воду питьевую по ГОСТ 2874;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- фуксин;
- мыло хозяйственное по ГОСТ 30266;
- масло иммерсионное по ГОСТ 13739;
- кристаллвиолетта;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
- глицерин дистиллированный по ГОСТ 6824;
- натрий сернокислый технический по ГОСТ 6318;
- нейтральный красный (нейтральрот) по ГОСТ 4919.1.

5.3 При проведении микробиологических анализов используют следующие культуральные среды:

- среда Кит-Тароцци;
- среды питательные плотные (для ветеринарных целей) по ГОСТ 29112;
- пептон сухой ферментативный (для бактериологических целей) по ГОСТ 13805;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206;
- агар питательный сухой;
- бульон мясо-пептонный по ГОСТ 20730.

5.4 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и вспомогательного оборудования с техническими характеристиками, а также материалов, реактивов, культуральных сред по качеству не ниже вышеуказанных.

6 Отбор и подготовка проб

6.1 Общие требования

Для проведения исследований используют свежеполученную неразбавленную и разбавленную сперму, хранившуюся не более 6 ч при температуре 2 °С — 5 °С, и замороженную сперму, хранившуюся не более 30 мин после оттаивания.

6.2 Отбор проб

Отбор проб проводят по ГОСТ 32222.

6.3 Подготовка проб

Разведения спермы для посевов готовят следующим образом: к 4,5 или 9,0 $см^3$ стерильного 0,9 %-ного раствора хлористого натрия добавляют соответственно 0,5 или 1,0 $см^3$ спермы свежеполученной неразбавленной, свежеполученной разбавленной или замороженной после оттаивания. Тщательно перемешивают и готовят десятикратные разведения от 1:10 до 1:1000.

При разведении спермы можно пользоваться одной стерильной пипеткой. Раствор набирают резиновой грушей или полиэтиленовым баллончиком и тщательно (не менее трех раз) промывают пипетку раствором из той пробирки, в которую перенесли суспензию. Если эти требования не могут быть выполнены, то для каждого разведения берут новую стерильную пипетку.

Следует учитывать, что приготовление разведений с использованием одной пипетки может привести в отдельных случаях к завышению показателей вследствие адсорбции микроорганизмов на стенках пипетки. В результате адсорбированные микроорганизмы могут попадать в пробирку с более высоким разведением.

7 Подготовка к исследованиям

7.1 Подготовка лабораторной посуды и материалов

7.1.1 Приготовление хромовой смеси для мытья посуды

Хромовую смесь готовят одним из следующих способов.

Способ 1. К 3000 $см^3$ концентрированной серной кислоты добавляют 50 г измельченного двухромовокислого калия. Смесь взбалтывают и оставляют до растворения двухромовокислого калия. Через сутки раствор темно-оранжевого цвета может быть применен для мытья посуды. Изменение темно-оранжевого цвета смеси на темно-зеленый указывает на ее непригодность.

Способ 2. В 1000 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 10 г неочищенного измельченного двухромовокислого калия и, перемешивая жидкость, небольшими порциями вливают 1000 $см^3$ концентрированной серной кислоты.

7.1.2 Новую лабораторную посуду кипятят в течение 15 мин в дистиллированной воде, подкисленной соляной кислотой, или выдерживают в течение трех — четырех часов в 10 %-ном растворе соляной кислоты, а затем промывают водопроводной водой и моют с помощью ерша в растворе, содержащем в 1000 $см^3$ дистиллированной воды 30 г стирального порошка и 50 $см^3$ нашатырного спирта, или в растворе, содержащем в 1000 $см^3$ дистиллированной воды 80 г хозяйственного мыла, нарезанного на мелкие кусочки, и 40 г кальцинированной соды.

Раствор с хозяйственным мылом кипятят до полного растворения мыла. Лабораторную посуду тщательно промывают водопроводной, а затем дистиллированной водой, высушивают и стерилизуют.

7.1.3 Лабораторную посуду, бывшую в употреблении и сильно загрязненную, моют 2 % — 3 %-ным раствором двууглекислой соды или 1,0 % — 1,5 %-ным раствором кальцинированной соды, оставляют на 24 ч в хромовой смеси по 7.1.1, тщательно промывают водопроводной, а затем дистиллированной водой и подвергают стерилизации.

7.1.4 Предметные и покровные стекла обезжиривают погружением их не менее 24 ч в смесь, состоящую из равных частей этилового спирта и диэтилового эфира.

Чистоту стекла вымытой и высушенной посуды контролируют нанесением на его поверхность капли воды. При достаточном обезжиривании капля расплывается равномерно.

7.1.5 Перед стерилизацией лабораторную посуду (чашки, пипетки, пробирки и т. п.) завертывают в бумагу или укладывают в металлические пеналы. В верхний конец пипетки вкладывают кусочек ваты.

7.1.6 Вымытую лабораторную посуду после высушивания стерилизуют в автоклаве при давлении 0,1 МПа в течение 20 мин или в сушильном шкафу при температуре 160 °С — 180 °С в течение двух часов.

7.2 Приготовление сред и реактивов

Питательные среды приготавливают и стерилизуют в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 11133-1 и ГОСТ ISO 11133-2.

7.2.1 Приготовление мясо-пептонного бульона (МПБ)

Парное говяжье (или конское) мясо, освобожденное от жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, взвешивают и заливают двойным количеством водопроводной воды, отмечают первоначальный объем смеси и оставляют при температуре 4 °С — 6 °С на 12–24 ч или выдерживают в термостате при температуре 50 °С в течение одного часа. Затем кипятят в течение 30 — 60 мин. Мясную воду охлаждают (жир застывает и легко удаляется), фильтруют через ватно-марлевый или двойной бумажный фильтр до полной прозрачности и доводят до первоначального объема дистиллированной водой.

К одному литру мясной воды добавляют 10 г сухого пептона и 0,5 г хлористого натрия. Устанавливают pH 7,2–7,4, добавляя насыщенный раствор двууглекислой соды или 10 %-ный раствор едкого натра. Раствор кипятят в течение 30 мин, доливают дистиллированной водой до первоначального объема, фильтруют через двойной бумажный фильтр и окончательно устанавливают pH 7,2–7,4. Затем разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин при температуре 120 °С и давлении 1,0 — 1,5 атм. Если после стерилизации в МПБ выпадает осадок, то его фильтруют вторично и снова стерилизуют.

Срок хранения МПБ во флаконах или пробирках с соблюдением правил асептики в темном месте при температуре 20 °С — 25 °С — не более 14 дней.

7.2.2 Приготовление мясо-пептонного агара (МПА)

К одному литру мясо-пептонного бульона по 7.2.1 добавляют 20 г предварительно измельченного, замоченного и хорошо промытого дистиллированной водой агара и кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного его растворения. При помутнении среды ее просветляют. МПА в горячем состоянии фильтруют через вату, разливают во флаконы или колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 0,7–1,0 атм в течение 10–20 мин. К расплавленному МПА добавляют стерильный концентрированный (40 %-ный и более) раствор глюкозы до конечной концентрации в среде 1 % и дополнительно стерилизуют текучим паром в течение 30 мин при температуре 105 °С–110 °С и давлении 0,7 — 1,0 атм. Полученную среду проверяют на стерильность.

Допускается применение готового сухого питательного агара, из которого готовят МПА в соответствии с указаниями, прилагаемыми к препарату, добавляя 1 %-ный раствор глюкозы. Каждую новую серию сухого питательного агара проверяют на качество (ростовые свойства) путем посева разных бактериальных культур. Их рост контролируют, высевая те же культуры на МПА, который приготавливают в лабораторных условиях. Если рост на среде из сухого питательного агара неудовлетворительный (колоний в посеве вырастает менее на 15 % и более по сравнению с контролем), то к такой среде добавляют в количестве 1/4 — 1/3 части от первоначально взятого объема МПБ по 7.2.1 и снова контролируют качество среды.

Срок хранения МПА во флаконах или пробирках с соблюдением правил асептики в темном месте при температуре 20 °С — 25 °С — не более 14 дней.

7.2.3 Приготовление среды Эндо

К 100 $см^3$ 2 %-ного МПА по 7.2.2 с pH 7,4–7,6, расплавленного и охлажденного до температуры 70 °С, добавляют 1 г глюкозы, растворенной в 5 $см^3$ стерильной дистиллированной воды, прогретой в водяной бане при температуре 90 °С в течение 5 мин.

В отдельных пробирках готовят 10 %-ный спиртовой раствор основного фуксина и 10 %-ный водный раствор сернистокислого натрия.

К 0,5 $см^3$ отфильтрованного спиртового раствора основного фуксина добавляют 10 %-ный водный раствор сернистокислого натрия до получения бледно-розового окрашивания. Приготовленную смесь приливают к 100 $см^3$ расплавленного МПА с глюкозой, хорошо перемешивают и разливают по чашкам.

Среду готовят в день применения. Допускается применение сухой готовой среды Эндо.

7.2.4 Приготовление среды Булира

К 1 $дм^3$ МПБ по 7.2.1 с pH 7,0–7,4 добавляют 2,5 г маннита и насыщенный раствор нейтральрота до окрашивания в вишнево-красный цвет. Затем разливают по 7 $см^3$ в пробирки с поплавками и стерилизуют в автоклаве при температуре 115 °С — 120 °С и давлении 0,7 атм в течение 30 мин. Вишнево-красный цвет в пробирках должен остаться без изменений.

Срок хранения среды в защищенном от света месте при температуре 5 °С — 8°С — не более 20 дней.

7.2.5 Приготовление среды Китт Тароцци

Для приготовления среды Китт-Тароцци берут 37 % мясной воды, 25 % печеночной воды, 0,5 г NaCl, пептон по ГОСТ 13805 и разбавляют дистиллированной водой до 100 $см^3$. Полученный стерильный раствор разливают по 100 $см^3$ в стерильные пробирки, на дне которых находятся два — три кусочка печени размером 0,5–1,0 см, сверху наслаивают стерильное вазелиновое масло слоем толщиной 1,0–1,5 см.

Срок хранения среды в защищенном от света месте при температуре 2 °С — 25°С — не более двух лет.

7.2.6 Питательная среда для выращивания St. aureus

Берут 10,0 г сухого ферментативного пептона, 5,0 г хлористого натрия, 2,5 г двузамещенного фосфата калия, 2,5 г глюкозы и растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения среды в сухом защищенном от света месте при температуре 10 °С — 25 °С — не более четырех лет.

7.2.7 Питательная среда для идентификации St. aureus

Берут 10,0 г сухого ферментативного пептона, 75,0 г хлористого натрия, 10,0 г маннита, 0,025 г фенолового красного, 15,0 г микробиологического агара и растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения среды при температуре 2 °С — 4 °С — не более трех недель.

7.2.8 Приготовление изотонического (физиологического) раствора хлористого натрия

В 1 $дм^3$ дистиллированной воды растворяют 9,0 г хлористого натрия. Раствор разливают в пробирки по 5 или 10 $см^3$, учитывая, что после стерилизации объем в пробирках должен составлять соответственно 4,5 или 9,0 $см^3$. Стерилизуют раствор при температуре 120 °С и давлении 1,0–1,5 атм в течение 30 мин. Стерильный физиологический раствор разливают в стерильные флаконы.

Срок хранения раствора в стеклянных флаконах, укупоренных ватно-марлевыми пробками, — не более 14 дней, резиновыми пробками, завальцованными алюминиевыми колпачками при температуре 20 °С — 25 °С, — не более шести месяцев.

7.2.9 Приготовление реактивов для окраски по Граму

7.2.9.1 Кристаллвиолет-карболовый раствор (реактив 1)

1 г кристаллгенцианвиолета или кристаллметилвиолета растирают в фарфоровой ступке с 2 г карболовой кристаллической кислоты и несколькими (тремя — пятью) каплями глицерина. Во время растирания небольшими порциями прибавляют 10 $см^3$ 96 %-ного спирта ректификата. После тщательного растирания приливают при постоянном помешивании 100 $см^3$ дистиллированной воды. Раствор оставляют на сутки и фильтруют через бумажный фильтр.

Срок хранения кристаллвиолет-карболового раствора в темном прохладном месте при температуре 2 °С — 5 °С — не более двух месяцев.

7.2.9.2 Раствор Люголя (реактив 2)

2 г йодистого калия растворяют в 5–10 $см^3$ дистиллированной воды, прибавляют 1 г кристаллического йода, раствор оставляют на несколько часов до полного растворения йода и после этого доливают дистиллированной водой до 300 $см^3$.

Срок хранения раствора в сухом защищенном от света месте при температуре 8 °С — 15 °С — не более 30 дней.

7.2.9.3 Спирто-водный раствор фуксина (реактив 3)

Для приготовления реактива 3 растворяют 1 $см^3$ насыщенного раствора фуксина (основного фуксина — 8–9 г, спирта этилового — 100 $см^3$) в 10 $см^3$ дистиллированной воды.

Срок хранения в сухом защищенном от света месте при температуре 10 °С — 35 °С — не более одного года.

7.2.10 Приготовление реактивов для окраски по Граму в модификации Калины

7.2.10.1 Раствор кристаллвиолета 0,5 %-ный спиртовый (реактив 4)

Для приготовления реактива 4 берут 0,5 г кристаллвиолета и растворяют в 100 см^3 этилового спирта.

Срок хранения в сухом защищенном от света месте при при комнатной температуре — не более 30 дней.

7.2.10.2 Раствор для окрашивания микроорганизмов (реактив 5)

К 70 см^3 0,5 %-ного спиртового раствора йодистого калия добавляют 10 см^3 5 %-ного спиртового раствора основного фуксина, 10 см^3 10 %-ного спиртового раствора йода и 10 см^3 ацетона. Растворение йодистого калия лучше проводить, подогревая раствор в водяной бане при температуре 45 °С — 50 °С.

Срок хранения во флаконах темного стекла при комнатной температуре — не более одного года.

8 Методы испытаний

8.1 Определение общего количества микроорганизмов

8.1.1 Проведение исследования

Сперму высевают в таком количестве, чтобы на чашках вырастало не более 500 колоний (КОЕ) микроорганизмов.

Посев материала проводят из двух разведений спермы — 1:10 и 1:1000, приготовленных по 6.3, на четыре чашки от каждого разведения с использованием двуслойного агарового метода.

Посев спермы на поверхность МПА проводят на заранее разлитую среду в бактериологические чашки. Толщина среды на дне чашки должна быть не менее 3 мм. Перед посевом бактериологические чашки с разлитым агаром выдерживают в термостате при температуре (37,5 ± 0,5) °С в течение 24 ч (проверка на стерильность).

При посеве на поверхность МПА суспензию спермы равномерно распределяют по всей поверхности агара путем покачивания чашки или стерильным шпателем.

После посева чашки со слегка приоткрытыми крышками ставят в термостат для подсыхания. Затем чашки закрывают, переворачивают крышками вниз, и выдерживают в термостате в течение 48–72 ч при температуре (37,5 ± 0,5) °С.

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 их подсчитывают на всей площади чашки и отмечают на ней восковым карандашом или чернилами. При сравнительно большом росте микроорганизмов 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 ограничиваться подсчетом на ½ или ¼ площади чашки.

При большом количестве выросших колоний (более 500) пользуются камерой Вольфгюгеля. Для подсчета чашку кладут под стеклянную пластинку и подсчитывают при ярком боковом освещении. При сравнительно равномерном распределении колоний их подсчитывают в десяти квадратах, расположенных в разных участках чашки. Число колоний суммируют.

8.1.2 Обработка результатов

Количество микроорганизмов в 1 см^3 неразбавленной спермы C при небольшом количестве выросших колоний вычисляют по формуле

$$C = \frac{N D}{V S}, \quad (1)$$

где N — количество насчитанных колоний, шт.;

D — разведение спермы;

V — объем суспензии, взятой для посева, см^3;

S — относительный размер площади чашки, на которой был проведен подсчет колоний, см^3

Площадь всей чашки, на которой проводят подсчет колоний микроорганизмов, принимают за 1, площадь половины чашки — 0,5; четверти — 0,25.

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое результатов четырех определений. Допускаемые расхождения между результатами определений не должны превышать 20%.

Пример

Высеяно 0,5 см^3 спермы, разбавленной в соотношении 1 : 10. Подсчет колоний проведен на ¼ площади чашки, насчитано 20 колоний. Следовательно, количество микроорганизмов вычисляют следующим образом

$$C = \frac{20 \cdot 10}{0,5 \cdot 0,25} = 1666 .$$

Таким образом, в 1 см^3 спермы содержится 1666 микроорганизмов (КОЕ).

Количество микроорганизмов в 1 см^3 неразбавленной спермы C при большом количестве выросших колоний вычисляют по формуле

$$C = \frac{N \pi R^2 D}{n V}, \qquad (2)$$

где N — количество колоний, насчитанных в 10 квадратах;

πR^2 — площадь чашки, см^2;

D — разведение спермы;

n — число квадратов, взятых для подсчета посева, см^3;

V — объем суспензии спермы, взятой для посева, см^3.

Пример

При высеве 0,5 см^3 спермы, разведенной в соотношении 1 : 10, в каждом из квадратов насчитано колоний: 8, 10, 12, 11, 7, 14, 8, 12, 18 и 14. Всего 114. Следовательно, количество микроорганизмов вычисляют следующим образом

$$C = \frac{114 \cdot 3,14 \cdot 5^2 \cdot 10}{0,5 \cdot 10} = 17898 .$$

Таким образом, в 1 см^3 спермы содержится 17898 микроорганизмов (КОЕ).

8.2 Определение бактерий группы кишечной палочки

8.2.1 Количество бактерий группы 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. Например, установлен коли-титр, равный 0,01 см^3 (разведение 1 : 100). Следовательно, коли-индекс будет равен: 1 : 0,01 = 100, т. е. в 1 см^3 содержится 100 кишечных палочек.

Для перевода коли-индекса в коли-титр необходимо единицу разделить на число, выражающее коли-индекс. Например, коли-индекс равен 100. В этом случае коли-титр равен: 1 : 100 = 0,01.

8.2.2 Проведение исследования

Коли-титр определяют методом бродильных проб при посеве на среду Булира. Сущность метода заключается в сбраживании микробами маннита, которое сопровождается выделением газа и изменением цвета среды.

В три пробирки, содержащие 5–7 см^3 среды Булира, высевают по 1 см^3 из одного разведения или из различных разведений спермы (1:10, 1:100, 1:1000). Сперму разводят физиологическим раствором.

Пробирки с посевом выдерживают в термостате при температуре (37,5 ± 0,5) °С в течение 18–24 ч. В результате осмотра пробирок устанавливают бродильный титр.

8.2.3 Обработка результатов

При отсутствии помутнения среды и газообразования реакцию считают отрицательной. Изменение цвета среды (пожелтение, помутнение) и газообразование (пузырек в газовке) указывают на размножение в среде бактерий группы кишечной палочки, в этом случае реакцию считают положительной.

При положительной реакции на бродильный титр проводят исследование на идентификацию кишечной палочки. Для этого из пробирок с измененным цветом среды и газообразованием производят посев на среду Эндо с таким расчетом, чтобы получить отдельные колонии.

Перед посевом дно чашки со средой Эндо делят на четыре сектора. Из каждой пробирки петлей высевают минимальное количество материала на отдельный сектор. Чашки с посевами крышками вниз помещают в термостат при температуре (37,5 ± 0,5) °С на 18–24 ч.

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 идентификацию по 8.2.4.

8.2.4 Окраска препаратов

Из изолированных колоний, характерных для бактерий группы кишечной палочки, приготавливают препараты, которые окрашивают или по методу Грама, или по методу Грама в модификации Калины и микроскопируют.

8.2.4.1 Окраска по методу Грама

Мазок культуры, помещенный на предметное стекло, фиксируют над пламенем горелки и накладывают кусочек фильтрованной бумаги, наливают реактив 1 по 7.2.9.1 и выдерживают в течение 1–2 мин. Краску сливают, бумагу снимают и, не промывая препарата водой, наливают раствор Люголя (реактив 2 по 7.2.9.2). Выдерживают в течение 1–2 мин до почернения препарата. Сливают раствор Люголя и прополаскивают препарат в 96 %-ном спирте в течение 0,5–1,0 мин, пока не перестанет отходить краситель. Промывают тщательно дистиллированной водой, а затем дополнительно окрашивают в течение 2 мин спирто-водным раствором фуксина (реактив 3) по 7.2.9.3. Промывают водой, высушивают и микроскопируют.

8.2.4.2 Окраска по Граму в модификации Калины

На чистое, хорошо обезжиренное предметное стекло наносят петлей небольшое количество агаровой культуры, но не размешивают. Приготавливая препарат из бульонной культуры, на стекло наносят только ее каплю. Затем в каплю агаровой или бульонной культуры вносят петлей каплю реактива 4 по 7.2.10.1, смешивают и распределяют на площади приблизительно 1 $см^2$, подсушивают при комнатной температуре и фиксируют, проводя медленно один раз через пламя горелки. На одном стекле можно готовить несколько мазков, отделяя их линиями, проведенными с обратной стороны стекла.

После остывания стекла на препарат наносят реактив 5 по 7.2.10.2 таким образом, чтобы реактив покрыл всю поверхность стекла. Окрашивают в течение 0,5–1,0 мин, краску сливают, мазок помещают на 1–2 с в 30 %-ный этиловый спирт, затем препарат ополаскивают дистиллированной водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

Микроорганизмы, красящиеся по Граму (грамположительные), окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, не красящиеся по Граму (бактерии грамотрицательные — группы кишечной палочки) — в красный цвет.

В зависимости от количества микроорганизмов в 1 $см^3$ неразбавленной спермы и коли-титра различают пять степеней чистоты спермы в соответствии с показателями, указанными в таблице 2.

Таблица 2

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	Стерильная
II	До 100	0,1 или 0,3	Незначительно загрязненная
III	До 2000	0,1 или 0,3	Слабо загрязненная
IV	До 5000	0,1 или 0,3	Средне загрязненная
V	Более 5000	0,01 или менее 0,3	Сильно загрязненная

8.3 Исследование спермы на наличие синегнойной палочки

Для выделения синегнойной палочки сперму высевают на МПБ с добавлением 1–2 г глюкозы или лактозы на 100 г МПБ. Инкубируют посевы в течение шести — семи суток в термостате при температуре (37,5 ± 0,5) °С, проверяя рост каждые один — два дня. При росте бактерии продуцируют водорастворимый пигмент пиоцианин, который постепенно окрашивает бульон в зеленовато-голубой цвет. На МПА он дает круглые голубовато-серые колонии. При микроскопии — грамотрицательная палочка.

Основной признак культуры синегнойной палочки — положительная хлороформная проба: к 18-и часовой культуре добавляют 1,0 $см^3$ хлороформа. Культуру, давшую положительную реакцию (окраска хлороформа в синий цвет), относят к синегнойной палочке.

8.4 Исследование спермы на наличие анаэробной микрофлоры

Для исследования на наличие анаэробной микрофлоры одну — две капли спермы засевают в две пробирки со средой Китт Тароцци по 7.2.5. Одну из пробирок после посева материала подогревают на водяной бане при температуре 80 °С в течение 20 мин для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры. Затем засеянные пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С на 10 сут. Учитывают интенсивность роста, характер осадка, а также наличие и степень газообразования. Дальнейшую идентификацию проводят по ГОСТ 28085.

8.5 Исследование спермы на наличие грибов

Для исследования на наличие грибов чашки с высевами спермы на МПА после подсчета количества микроорганизмов по 8.1 оставляют при комнатной температуре на 8–10 сут в месте, удаленном от прямых солнечных лучей. По истечении этого срока чашки с посевами проверяют на наличие в них роста грибов. Идентификацию выросших грибов проводят по [1].

8.6 Исследование спермы на наличие золотистого стафилококка (Staphylococcus aureus)

1 $см^3$ каждого разведения спермы (от 1 : 10 до 1 : 100) переносят в пробирку с питательной средой для выращивания *St. aureus* по 7.2.6.

Среду для выращивания *St. aureus* с посевным материалом инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение 24–48 ч. При наличии роста делают пересев петлей на среду для идентификации *St. aureus*.

Посевы инкубируют при температуре от 30 °С до 35 °С в течение 24–48 ч. Наличие на среде золотисто-желтых колоний грамположительных кокков, окруженных желтыми зонами, свидетельствует о ферментации маннита. Чистую культуру стафилококка исследуют на наличие фермента плазмокоагулазы. Если обнаружены грамположительные кокки, которые ферментируют маннит и дают положительную реакцию плазмокоагуляции, сперма контаминирована *St. aureus*.

8.7 Идентификация выделенных микроорганизмов

8.7.1 Чашки с первичными посевами после учета числа выросших в них микроорганизмов используют для выделения чистых культур (изолятов) с последующей их идентификацией.

8.7.2 Изучают визуально морфологию колоний микроорганизмов, выросших на чашках с питательными средами: размер, форму, внешний вид, поверхности колоний, цвет.

8.7.3 Из колоний, выросших на питательной среде, готовят мазки, окрашивают их по Граму, микроскопируют и дифференцируют микроорганизмы в зависимости от окраски на грамположительные и грамотрицательные.

8.8 Изучение морфологических и культуральных свойств микроорганизмов

Для изучения культуральных и ферментативных свойств, по совокупности которых определяют видовую принадлежность исследуемого микроорганизма, проводят выделение чистой культуры.

Для выделения чистой культуры изолированную колонию одного вида или ее часть стерильной бактериологической петлей над пламенем горелки переносят в пробирки с МПБ и на поверхность скошенного МПА штрихом. Посевы инкубируют при температуре (37,5 ± 0,5) °С в течение 24 — 48 ч.

В посевах на МПА отмечают наличие пигмента и другие морфологические особенности микроорганизмов. В посевах на МПБ отмечают рост бактерий с равномерным помутнением среды, придон-

ный рост с образованием осадка на дне (скудным или обильным, крошковидным или хлопьевидным), образование пигмента, наличие на поверхности бульона пленки или пристеночного кольца.

При изучении ферментативных свойств микроорганизмов определяют наличие ферментов протеолитических, сахаролитических и других специфических свойств для данной группы бактерий. Для этого исследуемую культуру микроорганизмов высевают на специальные дифференциально-диагности-ческие среды.

8.9 Определение патогенности выделенных микроорганизмов

Патогенность выделенных микроорганизмов определяют по гемолитическим, плазмокоагулирующим свойствам и биопробе.

8.9.1 Определение патогенности выделенных микроорганизмов по гемолитическим свойствам

Гемолитические свойства определяют на чашках Петри с кровяным агаром. Для этого изолированную культуру микроорганизма высевают на поверхность МПА, содержащего 5 % крови. Посевы инкубируют при температуре (37,5 ± 0,5) °С в течение 48 ч. При наличии вокруг выросших колоний зон гемолиза à или ß — реакцию считают положительной.

8.9.2 Определение патогенности выделенных микроорганизмов по плазмокоагулирующим свойствам

Реакцию плазмокоагуляции проводят с использованием свежеполученной или сухой стандартной плазмы кролика.

В пробирку вносят 2 $см^3$ 5%-ного раствора лимоннокислого натрия и 8 $см^3$ свежеполученной крови кролика. Цитратную кровь оставляют на 18 — 20 ч в холодильнике при температуре 4 °С — 6 °С, затем подвергают центрифугированию при 3000 об/мин в течение 15 мин. Сыворотку крови над осадком эритроцитов отбирают стерильной пипеткой, разбавляют физиологическим раствором в соотношении 1:4 и используют для исследования или лиофилизируют для в дальнейшей работе.

Для постановки реакции берут 0,5 $см^3$ плазмы, разведенной в соотношении 1:5, которую переносят в стерильную пробирку и добавляют 18–20- часовую культуру изолята (культуру берут бактериологической петлей). Пробирки помещают в термостат при температуре (37,5 ± 0,5) °С и проверяют наличие свертывания плазмы через 1, 2, 5, 18 и 24 ч.

Патогенные микроорганизмы продуцируют фермент плазмокоагулазу, который свертывает плазму. Реакция считается положительной независимо от времени коагуляции плазмы и вязкости сгустка.

8.9.3 Определение патогенности выделенных микроорганизмов по биопробе

Патогенность выделенных из спермы микроорганизмов определяют на лабораторных животных (кролики, морские свинки, хомяки, белые крысы и белые мыши), чаще всего на белых мышах. Для этого используют свежевыделенные 18 — 24-часовые культуры бактерий. Выращенную на соответствующих средах культуру разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и т. д. и вводят животным внутрибрюшинно в количестве 0,5 или 1,0 $см^3$. Для каждого разведения берут не менее четырех животных. Наблюдение за животными проводят в течение 7–10 дней.

При отсутствии гибели животных в опытных группах, выделенные культуры микроорганизмов считают непатогенными. В случае гибели хотя бы одного животного в группе исследование проводят на удвоенном количестве животных. Если и при повторном исследовании происходит гибель животных, то выделенные из спермы микроорганизмы считают патогенными.

Библиография

[1] Методика микологического исследования и оценки спермы, применяемой при искусственном осеменении сельскохозяйственных животных, утвержденная ГУВ МСХ СССР 02.01.1978 г.

УДК 619:619-013.11:576.8.093.4 (083.74) МКС 67.120.30

Ключевые слова: средства воспроизводства животных, сперма свежеполученная, разбавленная и замороженная, питательные среды, методы контроля, выделение и идентификация микроорганизмов, определение патогенности микроорганизмов

Подписано в печать 02.10.2014. Формат 60х84⅛.
Усл. печ. л. 2,33. Тираж 33 экз. Зак. 4531

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,
123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru