ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

# ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

## МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ АТИПИЧНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

## ГОСТ 27318—87
## (СТ СЭВ 5627—86)

Издание официальное

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 636:576.8.07:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

# ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

## Методы идентификации атипичных микобактерий

Agricultural animals.
Methods of identification of non-typical microbacteria

**ГОСТ 27318—87**

**(СТ СЭВ 5627—86)**

ОКСТУ 9809

Срок действия с 01.01.88
до 01.01.93

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

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

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

## 1. БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

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

1.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

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

осветитель;

горелку газовую или спиртовую;

стекла предметные;

часы песочные на 5 мин;

петли бактериологические;

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

пинцет;

бумагу фильтровальную;

Издание официальное Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1987

фенол по ГОСТ 6417—72;

спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67;

кислоту соляную концентрированную по ГОСТ 3118—77, х.ч. или ч.д.а;

натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, ч.д.а.;

калия гидроокись по ГОСТ 24363—80, ч.д.а.;

фуксин основной;

глицерин по ГОСТ 6259—75;

масло иммерсионное по ГОСТ 13739—78;

ксилол по ГОСТ 9410—78 или бензин авиационный;

фуксин Циля карболовый, раствор; готовят следующим образом: 1 г основного кристаллического фуксина растирают в ступке с 5 г кристаллической карболовой кислоты и 0,5 см³ этилового спирта. После растирания краски прибавляют при постоянном помешивании 90 см³ дистиллированной воды. Раствор краски через 24 ч фильтруют через бумажный фильтр.

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

метиленовую синь;

культуры микобактерий;

соляно-кислый спирт, раствор с массовой концентрацией соляной кислоты 3%; готовят следующим образом: 3 см³ концентрированной соляной кислоты добавляют к 97 см³ 96%-ного этилового спирта;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

1.3. Проведение испытаний

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

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

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

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

1.4. Оценка результатов

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

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

## 2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

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

2.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

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

горелку газовую или спиртовую;

петли бактериологические;

термостат с автоматическим регулированием температуры;

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

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

аппарат Коха для стерилизации питательных сред текучим паром;

pH-метр 340;

аппарат для встряхивания;

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

лупу с увеличением 3× и 5×;

штативы металлические для пробирок диаметром 16 мм;

пробирки бактериологические стеклянные по ГОСТ 1770—74;

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

палочки стеклянные;

пробки ватно-марлевые;

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

магний лимоннокислый, ч.д.а.;

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

магний сернокислый, ч.д.а.;

парафин по ГОСТ 23683—79;

*L*-аспарагин;

глицерин по ГОСТ 6259—75;

малахитовая зелень, раствор с массовой долей 2%;

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

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

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

бульон мясо-пептонный (МПБ);

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

Примечания:

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

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

2.3. Проведение испытания

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

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

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

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

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

2.4. Оценка результатов

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

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

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

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

## 3. БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД

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

3.2. **Тест — пигментообразование**

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

Исследованию подвергаются только медленно растущие культуры.

3.2.2. Средства испытаний

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

3.2.3. Проведение испытания

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

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

3.2.4. Оценка результатов

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

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

3.3. **Тест — редукция нитратов**

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

3.3.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

лопатку платиновую;

термостат с автоматическим регулированием температуры;

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

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

pH-метр 340;

пробирки бактериологические стеклянные по ГОСТ 1770—74;

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

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

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

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

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

3.3.3. Подготовка к испытанию

Готовят фосфатный буферный раствор следующим образом:

растворяют 9,47 г двухзамещенного фосфорно-кислого натрия в 1 дм$^3$ воды (раствор 1);

растворяют 9,05 г однозамещенного фосфорно-кислого калия в 1 дм$^3$ воды (раствор 2).

Для получения 100 см$^3$ фосфатного буфера к 61,1 см$^3$ раствора 1 добавляют 38,9 см$^3$ раствора 2 (pH 7,0). Полученный раствор разливают по 4 см$^3$ в пробирки и при 120°С автоклавируют в течение 15 мин. Раствор помещают в термостат при 37°С на 24 ч, после чего проверяют на стерильность.

3.3.4. Проведение испытания

В 1 см$^3$ фосфатного буфера суспензируют 10 мг (одна платиновая лопатка) испытуемой культуры и инкубируют при 37—38°С в течение 15—16 ч.

Образование нитрата проверяют добавлением 2 капель раствора парадиметиламинобензальдегида.

3.3.5. Оценка результатов

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

3.4. **Тест — активность каталазы**

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

3.4.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

линейку измерительную;

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

петлю бактериологическую;

пробирки бактериологические стеклянные по ГОСТ 1770—74;

культуры микобактерий;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

3.4.3. Проведение испытания

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

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

3.4.4. Оценка результатов

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

3.5. **Тест — аккумуляция железа**

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

3.5.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

термостат с автоматическим регулированием температуры;

петлю бактериологическую;

железо лимонно-аммиачное;

культуры микобактерий;

среду Левенштейна-Йенсена по п. 2.2.

3.5.3. Проведение испытания

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

3.5.4. Оценка результатов

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

3.6. **Тест — амидазная активность**

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

3.5.4. Оценка результатов

Для проведения испытаний применяют:

автоклав;

культуры микобактерий;

петлю бактериологическую;

пробирки бактериологические стеклянные по ГОСТ 1770—74;

аппарат Коха;

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

фильтр Зейтца;

марганец сернокислый по ГОСТ 429—76, ч.д.а.;

фенол по ГОСТ 6417—72;

натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, ч.д.а., раствор с массовой долей 0,5%;

гипохлорит кальция, ч.д.а., раствор с массовой долей 1%;

кальций углекислый по ГОСТ 4530—76, ч.д.а., раствор с массовой долей 20%;

реактив Русселя, состоящий из трех компонентов (раствора сульфата марганца, фенолового раствора и раствора гипохлорита кальция). Компоненты готовят следующим образом:

раствор сульфата марганца — 66,9 мг сульфата марганца растворяют в 100 см³ воды;

фенольный раствор — 12,5 г фенола в 5 см³ воды взбалтывают и приливают 25 см³ раствора гидроокиси натрия с массовой долей 0,5%, взбалтывают до полного растворения фенола и доводят объем водой до 50 см³;

раствор гипохлорита — к 300 см³ нагретой до 90°С воды прибавляют 25 г гипохлорита кальция, взбалтывают и прибавляют 135 см³ раствора углекислого кальция с массовой долей 20%. Доводят до кипения на несколько минут, чтобы дать аммиаку улетучиться. Полученный раствор охлаждают и доводят объем водой до 500 см³.

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

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

3.6.3. Проведение испытания

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

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

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

а) 0,2 см³ сернокислого марганца;

б) 2,0 см³ раствора фенола;

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

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

3.6.4. Оценка результатов

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

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

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

3.7.1. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

термостат с автоматическим регулированием температуры;

горелку газовую или спиртовую;

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

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

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

бактериологические петли;

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

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

3.7.2. Проведение испытания

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

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

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

3.7.3. Оценка результатов

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

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

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

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

4.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

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

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

осветитель;

горелку газовую или спиртовую;

часы песочные по 5 мин;

шприцы вместимостью 1—2 см³;

иглы инъекционные;

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;

флаконы стеклянные вместимостью 10 см³;

петли бактериологические;

бумагу фильтровальную;

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

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

4.3. Подготовка к испытанию

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

4.4. Проведение испытания

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

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

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

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

4.5. Оценка результатов

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

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

## 5. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

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

5.2. Средства испытаний

Для проведения испытаний применяют:

пластинки плексиглазовые с лунками;

штативы;

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

pH-метр 340;

раствор буферный фосфатный, pH 7,1;

гипериммунные кроличьи сыворотки комплекса avium-intracellulare различных сероваров;

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

антигены — живые культуры микобактерий;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

5.3. Подготовка к испытанию

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

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

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

5.4. Проведение испытания

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

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

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

Учет реакции проводят через 4 и 20 ч.

5.5. Оценка результатов

Результаты реакции оценивают в крестах:

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

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

2 креста — агглютинационные частицы находятся в жидкости;

1 крест — имеются следы агглютинации;

контроль — агглютинация отсутствует.

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

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

*ПРИЛОЖЕНИЕ*
*Обязательное*

Таблица 1

**Основные свойства видов или комплексов микобактерий**

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

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

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

Таблица 2

**Схема изучения микобактерий**

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

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

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

**1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Госагропромом СССР**

**ИСПОЛНИТЕЛИ**

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

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

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

**4. СТАНДАРТ ПОЛНОСТЬЮ СООТВЕТСТВУЕТ СТ СЭВ 5627—86**

**5. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

**6. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

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

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

Сдано в наб 25.06.87 Подп. к печ. 03.09.87 1,0 усл. п. л. 1,13 усл. кр.-отт. 1,05 уч.-изд. л. Тир. 4000 Цена 5 коп.

'а» Издательство стандартов, 123840, Москва ГСП, Новопресненский пер., 3
ипп. «Московский печатник» Москва, Лялин пер., 6. Зак. 883

gost.e-ecolog.ru