

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КЛОСТРИДИОЗОВ

ГОСТ 26503—85

Издание официальное

Цена 5 коп.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

gost.e-ecolog.ru

РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР

ИСПОЛНИТЕЛИ

Л. В. Кириллов, Л. И. Сторожев, Н. В. Зайцев

ВНЕСЕН Министерством сельского хозяйства СССР

Член Коллегии **А. Д. Третьяков**

УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 29 марта 1985 г. № 945.

УДК 636:576.8.07:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ
Методы лабораторной диагностики клостридиозов
Agricultural animals. Methods for laboratory diagnostics of clostridium

ГОСТ 26503—85

(СТ СЭВ 3456—81)

ОКСТУ 9809

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 29 марта 1985 г. № 945 срок действия установлен

с 01.01.86
до 01.01.91

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на все виды сельскохозяйственных животных, пушных зверей и птицу и устанавливает методы лабораторной диагностики клостридиозов.

Стандарт обязателен для республиканских, областных (краевых) ветеринарных лабораторий и ветеринарных научно-исследовательских учреждений.

Методы биохимической идентификации клостридий и определение типов токсинов Cl. botulinum проводят в научно-исследовательских учреждениях.

Стандарт соответствует СТ СЭВ 3456—81, кроме теста иммунофлуоресценции и лицетин-вителлинового метода описания антигенной структуры клостридий и питательных сред, не применяемых в нашей стране.

1. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР КЛОСТРИДИЙ

Сущность метода заключается в выделении возбудителей клостридиозов животных путем посева проб патологического материала в жидкие питательные среды и постановке биологической пробы.

1.1. Метод отбора проб

1.1.1. Для диагностических исследований при подозрении на инфекционные болезни клостридиальной этиологии направляют в

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

★

© Издательство стандартов, 1985

лабораторию свежие трупы ягнят, поросят, птиц и пушных зверей в целом виде. От трупов телят и взрослых животных отбирают кусочки паренхиматозных органов (печень, селезенка, почки), кровь из сердца, неоткрытую трубчатую кость.

При подозрении на инфекционную энтеротоксемию животных и анаэробную дизентерию ягнят дополнительно берут отрезок тонкого отдела кишечника с содержимым, концы которого перевязывают шпагатом; при подозрении на ботулизм отбирают пробы кормов, содержимого желудка и кровь от больных животных, при подозрении на столбняк — раневой экссудат и кусочки ткани из глубины раны; при подозрении на эмфизематозный карбункул — кусочки пораженных мышц и отечный экссудат; при подозрении на некротический гепатит — кусочки печени с некротическими участками; при подозрении на брадзот — измененные участки сычуга и инфильтрат подкожной клетчатки; при подозрении на злокачественный отек — тканевой экссудат, кусочки пораженных мышц. и тканей, а при поражении половых органов — истечение из влагалища и кусочки органов.

1.1.2. Содержимое желудка и кишечника направляют в лабораторию после консервирования хлороформом (одна капля на 10 см³ патологического материала). Допускается пересылать неконсервированный патологический материал, а также консервированный в стерильном 30—40 %-ном растворе глицерина.

1.1.3. Отобранные пробы должны быть доставлены в лабораторию не позднее 4 ч с момента гибели животного, а консервированные — в течение 1—2 сут.

1.2. Аппаратура, материалы и реактивы

Для проведения исследования применяют:

микроскоп биологический;

микроскоп стереоскопический;

термостат с температурой нагрева 37—38 °С;

микроанаэростат;

холодильник бытовой;

насос вакуумный;

потенциометр или pH-метр;

центрифугу с частотой вращения 5 тыс. об/мин;

пипетки стеклянные мерные вместимостью от 1 до 10 см³ по ГОСТ 20292—74;

чашки Петри по ГОСТ 23932—79;

пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

раствор генциан-виолета или кристалл-виолета карболовый;

раствор Люголя;

лакмус 1 %-ный раствор;

фуксин карболовый Циля;

кислоту карболовую (фенол) кристаллическую по ГОСТ 6417—72;

агар микробиологический по ГОСТ 17206—84 или
агар пищевой по ГОСТ 16280—70;
пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805—76;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67;
зелень малахитовую 1 %-ный раствор;
кровь барана стерильную;
желатин пищевой по ГОСТ 11293—78;
глицерин по ГОСТ 6259—75;
Д-глюкозу по ГОСТ 6038—79;
сахарозу по ГОСТ 5833—75;
маннит;
салицин;
мальтозу;
галактозу;
среды питательные для культивирования анаэробов:
бульон мясо-пептонный печеночный под вазелиновым маслом (среда Китта-Тароцци);
агар мясо-пептонный печеночный с добавлением 0,5 % глюкозы и 5 % дефибринированной стерильной крови барана;
среды питательные для культивирования аэробов:
бульон мясо-пептонный по ГОСТ 20730—75;
агар мясо-пептонный;
воду 2 %-ную пептонную с добавлением одного из используемых углеводов или многоатомных спиртов.

1.3. Проведение исследования

1.3.1. Из отобранных проб патологического материала делают мазки-отпечатки, которые окрашивают по Граму. Присутствие многочисленных грамположительных палочек и спор позволяет предположить наличие возбудителей клостридиозов (см. табл. 1).

1.3.2. Из отобранных проб патологического материала делают посевы в жидкую питательную среду, используемую для культивирования анаэробных микроорганизмов, а также в МПБ и на МПА. Перед посевом пробирки и флаконы с МППБ выдерживают в кипящей водяной бане в течение 15—20 мин для удаления растворенного в среде воздуха, а затем охлаждают их путем постепенного добавления холодной воды в водяную баню. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37—38 °С в течение 24—48 ч, а при подозрении на столбняк и ботулизм посевы делают в два флакона, один из которых прогревают при 80 °С в течение 1 ч и инкубируют в течение 2—5 сут.

При появлении характерных признаков роста (помутнение среды, газообразование) делают дробный посев полученных культур на 3—5 чашках Петри с мясо-пептонным печеночным агаром, в который добавляют 0,5 % глюкозы и 5 % стерильной дефибринированной крови барана к объему среды. Чашки помещают, не переворачивая, в микроанаэростат или эксикатор, из которого

Таблица 1

Культурально-морфологические свойства возбудителей клостридиозов

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптимум разряжения воздуха, мм рт. ст.	Характеристика роста на среде Китта-Тароцци	Характеристика колонии на глюкозо-кровяном агаре Цейсслера
1. Cl. chauvoei	+	Неравномерно окрашенные изолированные палочки, иногда соединенные по три, четыре вместе	От продолговатой до круглой, расположены центрально или субтерминально или лежат свободно	5—10	Равномерное слабое помутнение и газообразование, через 24 ч бульон просветляется	Круглые плоские приподнятые с ровными краями, напоминающие перламутровую пуговицу или форму виноградного листа, окружены узкой зоной прозрачного гемолиза (IV форма)
2. Cl. septicum	+	Изолированные палочки с закругленными концами, в мазках-отпечатках с серозных оболочек—нити	Овальные, расположены субтерминально или центрально	8—15	Интенсивное помутнение, обильное газообразование	Нежный бесцветный, вуалеобразный налет с микроскопически изрезанными краями и часто с нежными отростками, колонии окружены зоной гемолиза (III форма)
3. Cl. perfringens	+	Толстые палочки со слегка закругленными концами, расположены одиночно	Овальные, расположены субтерминально или центрально. В мазках из свежего трупа и молодых культур спор не обнаруживают	40	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование	Округлые, гладкие, выпуклые серовато-зеленые колонии. Гемолиз сильный, грязно-коричневого цвета, имеет две зоны. Среда буро-коричневого цвета (I форма)

Продолжение табл. 1

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптимум разряжения воздуха, мм рт. ст.	Характеристика роста на среде Китта-Тароцци	Характеристика колоний на глюкозо-кровяном агаре Цейслера
4. Cl. oedematiens	+	Крупные полиморфные палочки с закругленными или обрубленными концами, расположены одиночно, редко попарно или цепочками из 3—4 члеников	Овальные, расположенные субтерминально или центрально	3—5	Рост более интенсивный внизу, через 18—24 ч бульон просветляется, на дне выпадает хлопьевидный осадок, газообразование слабое	Шероховатые, корневидные, складчатые с изрезанными краями и выпуклым темным центром, гемолиз сильный, прозрачный, но может отсутствовать (II форма)
5. Cl. sordellii	+	Крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены чаще цепочками по 2—4 членика	Овальные, расположены субтерминально или центрально	8—15	Помутнение более интенсивное внизу, умеренное газообразование; при старении культур — слизистый осадок	Неправильной формы, корневидные, складчатые, с сероватой шероховатой поверхностью и изрезанными краями, гемолиз сильный, но может отсутствовать (II форма)
6. Cl. histolyticum	+	Стройные тонкие палочки с закругленными концами, расположены одиночно, попарно, редко цепочками	Овальные, расположены субтерминально («Игольное ушко»)	8—15	Интенсивное помутнение без газообразования	Мелкие, круглые, гладкие колонии с ровными краями, гемолиз отсутствует, иногда незначительный (VIII форма)

Продолжение табл. 1

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптимум разряжения воздуха, мм рт. ст	Характеристика роста на среде Китта-Тароцци	Характеристика колоний на глюкозо-кровяном агаре Цейсслера
7. Cl sporogenes	+	Палочки с закругленными концами, расположены одиночно, иногда цепочками	Овальные, расположены субтерминально или центрально. Образование спор происходит очень быстро, в мазках из культур почти у всех палочек обнаруживают споры	15—20	Рост обильный, кусочки печени обволакивают слизистым осадком, верх среды прозрачный, газообразование слабое. Культура издает неприятный гнилостный запах	Вязкие с изрезанными краями, напоминающие корневище, погружены в агар, поверхность матовая с желтоватым центром, зона гемолиза интенсивная резко ограниченная (VI форма)
8. Cl. botulinum	+	Толстые палочки с закругленными концами, расположены попарно, иногда в виде цепочек	Овальные, круглые, расположены субтерминально, редко центрально	3—5	Рост медленный, через 36—48 ч появляется интенсивная муть, которая постепенно оседает на дно, после чего бульон просветляется	Круглые, шероховатые или корневидные нежно-серые колонии, гемолиз прозрачный (II форма)
9. Cl. tetani	+	Тонкая палочка со слегка закругленными концами	Круглые шарообразные, расположены субтерминально, напоминают барабанные палочки	3—15	Равномерная муть с незначительным газообразованием, через 48—72 ч столбик просветляется, издает запах жженого рога	Нежные колонии, центр слегка приподнят, от краев отходят неправильные отростки, гемолиз прозрачный (II или III форма)

удаляют воздух при помощи вакуум-насоса и выдерживают в термостате при температуре 37—38 °С в течение 12—48 ч. Полученные отдельные колонии, которые по структуре напоминают колонии клостридий, определяют по формам роста по Цейсслеру и отвивают в жидкие питательные среды, которые инкубируют при температуре 37—38 °С в течение 24—48 ч.

При получении второй генерации посев делают также и на среды, предназначенные для культивирования аэробной микрофлоры (МПБ, МПА). Для дальнейшей работы отбирают культуры, которые не дают роста в контрольных посевах (МПБ, МПА).

Для ускорения работы допускается посев проб патологического материала на твердые питательные среды в чашках Петри. Дальнейший отбор выросших колоний делают так же, как и при пересеве с жидкой питательной среды.

1.3.3. Патологический материал очищают путем пассажа через морскую свинку. Для этого измельченный в ступке материал или первичный посев материала в жидкой питательной среде вводят подкожно в области брюшных мышц или внутримышечно морской свинке массой 350—450 г в объеме 0,5—1,0 $см^3$.

Животных, павших в течение 72 ч, вскрывают, учитывают патологоанатомическую картину (см. табл. 2), а из места введения крови, взятой из сердца и печени, делают посевы в жидкие и на твердые питательные среды, а также мазки-отпечатки с мест посева и диафрагмальной поверхности печени.

Таблица 2

Патологоанатомическая картина у морских свинок

Название (тип) возбудителя клостридиозов	Патологоанатомические изменения
Cl. perfringens тип А — возбудитель злокачественного отека, редко энтеротоксемии тип Д — возбудитель энтеротоксемии	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
Cl. perfringens тип В — возбудитель дизентерии ягнят тип С — возбудитель энтеротоксемии	Кожа на месте инъекции легко отделяется, но не отслаивается. Мускулатура сухая, красного цвета различных оттенков. Кишечник вздут, геморрагически воспален, иногда образуются язвы (тип В)
Cl. chauvoei возбудитель эмфизематозного карбункула	На коже наблюдают серозно-геморрагический выпот. Кожа с трудом отделяется от измененных мышц. Мышцы груди и брюшного пресса влажны, темно-красного цвета. Кишечник остается неизмененным

Продолжение табл. 2

Название (тип) возбудителя клостридиозов	Патологоанатомические изменения
Cl. septicum возбудитель брадзота, злокачественного отека	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
Cl. oedematiens возбудитель некротического гепатита, злокачественного отека	На месте инъекции наблюдается желатинозный, студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные.
Cl. histolyticum возбудитель злокачественного отека	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
Cl. sordellii возбудитель злокачественного отека	На месте инъекции наблюдается желатинозный студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные
Cl. sporogenes	Патогенен в ассоциации с другой микрофлорой
Cl. botulinum возбудитель ботулизма	Патологоанатомические изменения не характерны
Cl. tetani возбудитель столбняка	Патологоанатомические изменения не характерны

1.3.4. В качестве дополнительных тестов для идентификации культур Cl. chauvoei и Cl. septicum используют результаты исследования мазков-отпечатков с диафрагмальной поверхности печени морских свинок: при наличии Cl. septicum обнаруживают удлиненные формы в виде нитей, Cl. chauvoei — одиночные короткие палочки; заражение кроликов культурой Cl. chauvoei не вызывает их гибели.

2. МЕТОД БИОХИМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Сущность метода заключается в определнии вида клостридий на основе изучения их ферментативных свойств.

2.1. Метод отбора проб

2.1.1. Для проведения исследования используют чистые культуры анаэробных микроорганизмов, выделенные из патологического материала путем отбора характерных колоний, по п. 1.3.

2.2. Аппаратура, материалы и реактивы

2.2.1. Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, приведенные в п. 1.2 с дополнением:

цельное молоко;

набор полужидких питательных сред с добавлением соответствующих углеводов или многоатомных спиртов.

2.3. Проведение исследования

2.3.1. Культуры 12—24 ч роста засевают в пробирки с желатином, мясо-пептонным бульоном, молоком, с набором питательных сред с добавлением углеводов или многоатомных спиртов.

2.3.2. Результаты исследования оценивают ежедневно в течение 7 сут в соответствии с требованиями, приведенными в табл. 3.

3. МЕТОД БИОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Сущность метода заключается в обнаружении возбудителей и их токсинов в патологическом материале. Данный метод используется так же для определения токсигенных и вирулентных свойств выделенных культур клостридий.

3.1. Метод отбора проб

3.1.1. Отбор и подготовка проб проводится в соответствии с пп. 1.1.1; 1.1.2; 1.1.3.

3.2. Аппаратура, материалы и реактивы

3.2.1. Для проведения исследований применяют аппаратуру, материалы и реактивы, приведенные в п. 1.2 с дополнением:

сыворотки Cl. perfringens антитоксические типов A, C, D, E;

сыворотки Cl. botulinum антитоксические типов A, B, C, E и F.

3.3. Проведение исследований

3.3.1. *Обнаружение токсина Cl. perfringens в содержимом кишечника*

3.3.1.1. В зависимости от консистенции материала содержимое кишечника разводят физиологическим раствором 1:1 или 1:2. Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр и центрифугируют 20 мин при 3—5 тыс. об/мин. Полученную надосадочную жидкость проверяют на токсичность путем внутривенного или внутрибрюшинного введения двум белым мышам массой 16—18 г в дозе 0,5 $см^3$ или внутривенного введения кролику массой 1,8—2,0 кг в дозе 1,0—1,5 $см^3$. При наличии токсина животные погибают в течение 12 ч, а в случае гибели в более поздние сроки (до 24 ч) проводят бактериологическое исследование с целью исключения сопутствующих инфекций.

Таблица 3

Ферментативные свойства патогенных клостридий

Вид микроорганизмов	Питательные среды									
	Желатин	Сероводород	Молоко	Глюкоза	Сахароза	Маннит	Глицерин	Салацин	Мальтоза	Галактоза
Кл. перфрингенс Cl. perfringens	Разжижает на 3—5 сут	Не выделяет	Быстро свертывает	+	+	—	+/—	—	+	+
Кл. эдематиенс Cl. oedematiens	Разжижает на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	+	—	—	—	—	+/—	—
Кл. септикум Cl. septicum	Разжижает на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	+	—	—	—	+	+	—
Кл. Шово Cl. chauvoei	Разжижает на 2—6 сут	Не выделяет	Медленно свертывает	+	+	—	—	—	+	+
Кл. тетани Cl. tetani	Разжижает на 2—4 сут	Выделяет	Пептонизация	+/—	—	—	—	—	—	—
Кл. ботулинием Cl. botulinum	Разжижает на 2—4 сут	Выделяет	Пептонизация	+	+/—	—	—	+/—	+/—	—
Кл. хистолитикум Cl. histolyticum	Разжижает	Не постоянно	Пептонизация	—	—	—	—	—	—	—
Кл. сорделлии Cl. sordellii	Разжижает	Не постоянно	Свертывает	+	—	—	—	—	+	—
Кл. спорогенес Cl. sporogenes	Разжижает	Выделяет	Пептонизация	—	—	—	—	—	—	—

\+ — полная ферментация;
+/— — непостоянная или частичная ферментация;
— — ферментация отсутствует.

3.3.2. *Определение токсичности выделенных культур*

При определении токсичности Cl. perfringens используют популяции микроорганизмов, выращенных в течение 8—16 ч в МППБ с добавлением 0,5 % глюкозы к объему среды.

При определении токсичности культур типов D и E их подвергают активации добавлением 0,5 % панкреатина или 0,25 % трипсина при pH 8,0—8,2, который устанавливают путем подщелачивания 10 %-ным раствором NaOH. Смесь культуры с ферментом выдерживают при температуре 37—38 °С в течение 1—2 ч. После активации токсичность культур типов D и E значительно увеличивается, а токсичность культур типа C резко снижается. Токсичность культур типа B может сохраниться на прежнем уровне за счет активации эпсилон-токсина. Определение токсичности проводят на белых мышах в соответствии с п. 3.3.1.

3.3.3. *Обнаружение токсина Cl. botulinum в патологическом материале*

Пробы корма, содержимое желудка, кусочки печени и другой материал исследуют раздельно. Для этого пробу массой 25—30 г растирают в ступке со стерильным песком и заливают равным или двойным количеством физиологического раствора. Полученную взвесь выдерживают 2 ч при температуре 20—22 °С, после чего центрифугируют 30 мин при 3 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость делят на две части и одну прогревают в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Каждым фильтратом (гретым и негретым) заражают по две белых мыши массой 16—18 г каждая или двух морских свинок массой 300—350 г каждая. Белых мышей заражают внутривенно или внутрибрюшинно в дозе 0,5—0,8 $см^3$, морских свинок подкожно в дозе 3—5 $см^3$ (одной свинке гретый фильтрат, другой — негретый). Кровь больных животных вводят сразу после взятия внутрибрюшинно двум белым мышам или подкожно морской свинке в дозах, указанных выше.

При наличии ботулинического токсина животные, зараженные некипяченым материалом, погибают через 2—5 сут с характерной клиникой ботулизма (шаткая походка, учащенное дыхание, расслабление мускулатуры, западание брюшной стенки — «осиная талия»). Животные, которым вводили кипяченый материал, остаются здоровыми.

3.3.4. *Определение токсичности выделенных культур Cl. botulinum*

При определении токсичности культур Cl. botulinum используют популяции микроорганизмов, выращенные на МППБ с добавлением 0,5 % глюкозы, в течение 5—7 сут. Микробные клетки отделяют фильтрованием или центрифугированием. Фильтрат или центрифугат вводят внутрибрюшинно двум белым мышам в дозе 0,5—1,0 $см^3$ или морской свинке в дозе 3,0—5,0 $см^3$. При наличии

токсина животные погибают на 2—5 сут с характерной клиникой ботулизма.

3.3.5. *Обнаружение токсина Cl.tetani в патологическом материале*

Суспензию материала вводят подкожно в лапку двум белым мышам или двум морским свинкам в дозе 0,5—1,0 см³. При наличии токсина у животных в течение 3—5 сут развивается характерная клиника столбняка.

3.3.6. *Определение токсичности Cl. tetani*

Токсичность штампов Cl. tetani устанавливают на белых мышах массой 16—18 г каждая или на морских свинках. Фильтрат 10—12-суточной культуральной жидкости вводят в лапку подкожно двум белым мышам или двум морским свинкам в дозе 0,5—1,0 см³. При наличии токсина у животных в течение 3—5 сут развивается характерная клиника столбняка.

3.3.7. *Обнаружение токсина Cl. oedematiens в патологическом материале при подозрении на некротический гепатит*

Кусочки печени с некротическими очагами в количестве 25—30 г измельчают в ступке и заливают равным количеством физиологического раствора. Полученную взвесь выдерживают 2 ч при температуре 20—22 °С, после чего центрифугируют 20 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость вводят внутрибрюшинно или подкожно двум белым мышам в дозе 0,5—1,0 см³. При наличии токсина животные погибают в течение 24—72 ч.

3.3.8. *Определение токсичности выделенных культур Cl. oedematiens*

Токсичность культур устанавливают на двух белых мышах, которым внутривенно или внутрибрюшинно вводят фильтрат двухсуточных исследуемых культур. При наличии токсина гибель белых мышей наступает через 24—72 ч.

3.3.9. *Обнаружение Cl.chauvoei в патологическом материале*

Кусочки пораженных мышц измельчают и растирают в ступке с песком и небольшим количеством мясо-пептонного бульона, в равномерную взвесь. Полученную взвесь в разведении 1:5—1:10 вводят подкожно в области брюшных мышц двум морским свинкам массой 350—400 г в дозе 0,5—1,0 см³. При наличии Cl. chauvoei животные погибают в течение 24—96 ч.

Мышечный экссудат вводят таким же способом в дозе 0,5—1,0 см³. У павших свинок отмечают характерную для эмфизематозного карбункула патологоанатомическую картину (см. п. 1.3.3).

3.3.10. *Определение патогенности культур Cl. chauvoei*

Патогенность культур Cl.chauvoei устанавливают путем подкожного заражения двух морских свинок массой 350—400 г каждая, которым вводят 18—24 ч культуру возбудителя эмкара в дозе 0,5—1,0 см³. Животные погибают в течение 24—48 ч с характер-

ной для эмфизематозного карбункула патологоанатомической картиной (см. п. 1.3.3).

3.3.11. *Обнаружение Cl. septicum и других возбудителей злокачественного отека и брадзота в патологическом материале*

Кусочки пораженных тканей или другой патологический материал (паренхиматозные органы, часть стенки сычуга и др.) измельчают и растирают в ступке с песком и небольшим количеством мясо-пептонного бульона. Полученную гомогенную взвесь вводят подкожно в область брюшных мышц двум морским свинкам в дозе 0,5—1,0 см³. При наличии в материале Cl. septicum и других возбудителей животные погибают через 18—36 ч с характерной патологоанатомической картиной (см. п. 1.3.3).

3.3.12. *Определение патогенности культур Cl. septicum*

Патогенность культур Cl. septicum устанавливают путем заражения двух морских свинок массой 350—400 г каждая, которым культуру суточного инкубирования в среде Китта-Тароцци вводят подкожно в область брюшных мышц в дозе 0,5—1,0 см³. Животные погибают через 18—24 ч с характерной патологоанатомической картиной (см. п. 1.3.3).

4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИПОВ ЛЕТАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ Cl. perfringens и Cl. botulinum

4.1. Типы основных летальных токсинов Cl. perfringens и Cl. botulinum устанавливают в реакции нейтрализации их типовыми антитоксическими сыворотками.

4.2. Постановка реакции нейтрализации с диагностическими антитоксическими сыворотками Cl. perfringens типов A, C, D, и E.

Реакцию нейтрализации используют для определения типа основных летальных токсинов Cl. perfringens в содержимом кишечника павших животных и в фильтратах или центрифугатах культур микроорганизмов указанного вида типов A, B, C, D, E и F.

Реакцию ставят на белых мышах или морских свинках, или кроликах. При постановке реакции на мышах результаты оцениваются по гибели или выживанию животных, обработанных смесью сывороток и токсина. При использовании морских свинок или кроликов определяют наличие или отсутствие дерманекротического действия смесей сывороток и токсина на месте их внутрикожного введения. Для этого у животных удаляют шерсть на боку (ближе к сагитальной линии) и на следующий день в это место вводят смеси сывороток и токсина.

4.2.1. Для определения типа основного токсина исследуемый материал разливают по 1,0 см³ в пять пробирок и добавляют по 1,0 см³ сыворотки каждого типа: в первую пробирку сыворотку типа A, во вторую — типа C, в третью — типа D, в четвертую — типа E (активность сывороток каждого типа предварительно дово-

дят стерильным физиологическим раствором до 10 АЕ), в пятую добавляют 1 см³ физиологического раствора (контроль). Смесь сывороток и исследуемого материала после выдерживания при 37—38 °С в течение 30 мин вводят по 0,5 см³ внутривенно или внутрибрюшинно двум белым мышам или внутрикожно по 0,2 см³ морской свинке или кролику. Одновременно в тех же дозах вводят испытуемую культуру без сыворотки (контроль). Для каждой смеси используют отдельный шприц. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч.

4.2.2. Результаты реакции нейтрализации учитывают при гибели контрольных белых мышей или образовании некроза в контроле у морской свинки (кролика).

Животные, получившие смесь токсина с гомологичной сывороткой, остаются живыми, а у морских свинок и кроликов некроз не развивается. Оценку результатов проводят в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Определение типа основного токсина Cl. perfringens

Тип культур Cl. perfringens	Основной токсин	Антитоксические сыворотки типа				Контроль
		A	C	D	E	
A	Альфа	—	Н	Н	Н	+
C(B, F)	Бета	+	—	+	+	+
D	Эпсилон	+	+	—	+	+
E	Йота	+	+	+	—	+

\+ — белые мыши пали, у морских свинок и кроликов некрозы на месте введения.

— — белые мыши живы, у морских свинок и кроликов некрозы отсутствуют.

Н — результаты не учитывают.

4.3. Тип летального токсина Cl. botulinum определяют в реакции нейтрализации антитоксическими сыворотками типов A, B, C, E и F.

Реакцию ставят по схеме: исследуемый материал по 2,4 см³ разливают в шесть пробирок, в пять из которых добавляют по 0,6 см³ типовых сывороток: в первую — типа А, во вторую — типа — В и т. д., в шестую пробирку такой же объем физиологического раствора. Смесь сывороток с исследуемым материалом выдерживают в течение 30 мин при температуре 35—37 °С и по

0,8—1,0 $см^3$ вводят подкожно двум белым мышам. Результаты реакции нейтрализации учитывают в течение 4 сут. Животные, которым исследуемый материал ввели в смеси с гомологичной сывороткой, остаются живыми, а остальные погибают с клиническими признаками ботулизма.

Редактор *Н В. Бобкова*
Технический редактор *В Н. Прусакова*
Корректор *Е. И. Евтеева*

Сдано в набор 17.04 85 Подп к печ. 26.06.85 1,0 усл. п. л. 1,25 усл кр отт 1,04 уч -изд, л.
Тираж 12000 Цена 5 коп

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123840, Москва, ГСП,
Новопресненский пер., 3.
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256. Зак. 1250

gost.e-ecolog.ru