



26503-85

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

**ЖИВОТНЫЕ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ**

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КЛОСТРИДИОЗОВ

ГОСТ 26503-85

Издание официальное



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ
Москва

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.

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики

кlostридиозов

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 кlostридиозов.

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

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

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

1. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР КЛОСТРИДИЙ

Сущность метода заключается в выделении возбудителей кlostридиозов 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 кlostридиальной 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 браздот — 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;

микроанаэроустат;

холодильник бытовой;

насос вакуумный;

потенциометр или рН-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 % дефибрированной 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 drobный посев полученных культур на 3—5 чашках Петри с мясо-пептонным печеночным агаром, в который добавляют 0,5 % глюкозы и 5 % стерильной дефибрированной крови барана к объему среды. Чашки помещают, не переворачивая, в микроанаэроостат или эксикатор, из которого

Таблица 1

Культурально-морфологические свойства возбудителей клостридиозов

Название возбудителя	Охр.- ка по Граму	Морфология микроба	Форма спор и их расположение	Оптimum размно- жения, °C, рН, мн	Характеристика роста на среде Кетта-Тароши	Характеристика колонии на лактозо-крайном агаре- Цейслера
1. <i>C. chauvoei</i>	+	Неравномерно окрашенные изолированные палочки, иногда соединенные по три, четыре вместе	От продолговатой до круглой, расположены центрально или субтерминально или субтерминально и 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 выноградного листа, окружены узкой зоной прозрачного гемолиза (IV форма)
2. <i>C. septicum</i>	+	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, вузалообразный налет с микроскопически изрезанными краями и часто с нежными отростками, колонии окружены зоной гемолиза (III форма)
3. <i>C. perfringens</i>	+	Толстые палочки со слегка закругленными концами, расположены одиночно	Овальные, расположены субтерминально или центрально. В мазках из свежего трупного и молочных культур спор не обнаруживают	40	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование	Округлые, гладкие, выпуклые серовато-зеленые колонии. Гемолитический, грязно-коричневого цвета, имеет две зоны. Среда бурно-коричневого цвета (I форма)

Продолжение табл. 1

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптимальная температура, °С	Характеристика роста на среде Катта-Тарощи	Характеристика колоний на газожидкостном агаре Цейслера
4. <i>C. l. oedematis</i>	+	Крупные полиморфные палочки с закругленными или обрубленными концами, расположены одиночно, редко парно 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 выдутым темным центром, гемолиз сильный, прозрачный, но может отсутствовать (II форма)
5. <i>C. l. sordellii</i>	+	Крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены чаще цепочками по 2—4 членика	Овальные, расположены субтерминально или центрально	8—15	Погутение бульона интенсивное внизу, умеренное газообразование; при старении культур — слизистый осадок	Неправильной формы, корневидные, складчатые, с серозной шероховатой поверхностью и изрезанными краями, гемолиз сильный, но может отсутствовать (II форма)
6. <i>C. l. histolyticum</i>	+	Стройные тонкие палочки с закругленными концами, расположены одиночно, парно, редко цепочками	Овальные, расположены субтерминально («Игольное ушко»)	8—15	Интенсивное погутение без газообразования	Мелкие, круглые, гладкие колонии с ровными краями, гемолиз отсутствует, иногда незначительный (VIII форма)

Продолжение табл. 1

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микроба	Форма спор и их расположение	Оптимум развития воз- духа, мм рт. ст.	Характеристика роста на среде Китта-Тароши	Характеристика колоний на глюкозо-хромном агаре Цейслера
7. <i>Cl. sporogenes</i>	+	Палочки с за- кругленными концами, распо- ложены одноч- но, иногда це- почками	Овальные, расположены субтерминально или центрально. Образование спор происходит очень быстро, в мазках из куль- тур почти у всех наблюдается обну- ривание спор	15—20	Рост обильный, кусочки печени обволакивают слизистым осад- ком, верх среды прозрачный, га- зообразование слабое. Культу- ра издает непри- ятный гнилост- ный запах	Вязкие с взрезанными краями, напоминаю- щие корневище, погру- жены в агар, поверх- ность матовая с желто- ватым центром, зона ге- молиза интенсивная резко ограниченная (VI форма)
8. <i>Cl. botulinum</i>	+	Толстые па- лочки с закруг- ленными конца- ми, расположены попарно, иногда в виде цепочек	Овальные, круглые, рас- положены субтерминаль- но, редко центрально	3—5	Рост медлен- ный, через 36— 48 ч появляе- тся интенсивная муть, которая постепенно осе- дает на дно, после чего буль- он просветляет- ся	Круглые, широко- вые или корневище- вые, нежные колонии, гемолиз прозрачный (II форма)
9. <i>Cl. tetani</i>	+	Тонкая палоч- ка со слегка закругленными концами	Круглые шарообразные, расположены субтерминаль- но, напомина- ют барабан- ные палочки	3—15	Равномерная муть с незначи- тельными газооб- разованием, че- рез 48—72 ч столбик просвет- ляется, издает запах жженого рога	Нежные колонии, центр слегка приподнят, от краев отходит непра- вильные отростки, гемо- лиз прозрачный (II или III форма)

удаляют воздух при помощи вакуум-насоса и выдерживают в термостате при температуре 37—38°C в течение 12—48 ч. Полученные отдельные колонии, которые по структуре напоминают колонии клостридий, определяют по формам роста по Цейсслеру и отбирают в жидкие питательные среды, которые инкубируют при температуре 37—38°C 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 см³.

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 клостридий	Патологоанатомические изменения
<i>Cl. perfringens</i> 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 инфильтрованы
<i>Cl. perfringens</i> тип В — возбудитель дизентерии агнит 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)
<i>Cl. chauvoei</i> 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 неизменным

Название (тип) возбудителя клостридий	Патологоанатомические изменения
C1. septicum возбудитель бродяга, 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 обнаруживаются значительное количество транссудата
C1. oedematiens возбудитель некротического гепатита, злокачественного отека	На месте инъекции наблюдается желатинозный, студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные.
C1. histolyticum возбудитель злокачественного отека	При заражении в мышцу бедра кожа красно-фиолетовая, напряжена, иногда лопается. Мышцы теряют свою структуру, расплавляются и превращаются в кашецеобразную массу с примесью сгустков крови. Мягкие ткани отделяются от костей и сосудов. Газ не образуется, гнилостного распада нет
C1. sordellii возбудитель злокачественного отека	На месте инъекции наблюдается желатинозный студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные
C1. sporogenes	Патогенен в ассоциации с другой микрофлорой
C1. botulinum возбудитель ботулизма	Патологоанатомические изменения не характерны
C1. tetani возбудитель столбняка	Патологоанатомические изменения не характерны

1.3.4. В качестве дополнительных тестов для идентификации культур C1. chauvoei и C1. septicum используют результаты исследования мазков-отпечатков с диафрагмальной поверхности печени морских свинок: при наличии C1. septicum обнаруживают удлиненные формы в виде нитей, C1. chauvoei — одиночные короткие палочки; заражение кроликов культурой C1. chauvoei не вызывает их гибели.

2. МЕТОД БИОХИМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Сущность метода заключается в определении 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 *C1. perfringens* антитоксические типов А, С, D, Е;

сыворотки *C1. botulinum* антитоксические типов А, В, С, Е и F.

3.3. Проведение исследований

3.3.1. *Обнаружение токсина C1. 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 см³ или внутривенного введения кролику массой 1,8—2,0 кг в дозе 1,0—1,5 см³. 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.

Ферментативные свойства патогенных кластридий

Вид микроорганизмов	Питательные среды									
	Желатин	Серозодород	Молоко	Глюкоза	Сахароза	Манинит	Глицерин	Салицин	Мальтоза	Галактоза
Кл. перфрингас <i>Cl. perfringens</i>	Разжижается на 3-5 сут	Не выделяет	Быстро свертывает	+	+	-	+/-	-	+	+
Кл. эдематис <i>Cl. edematis</i>	Разжижается на 2-4 сут	Не постоянно	Свертывает	+	-	-	-	-	+/-	-
Кл. септикус <i>Cl. septicum</i>	Разжижается на 2-4 сут	Не постоянно	Свертывает	+	-	-	-	+	+	-
Кл. Шово <i>Cl. chauvoei</i>	Разжижается на 2-4 сут	Не выделяет	Медленно свертывает	+	+	-	-	-	+	+
Кл. тетани <i>Cl. tetani</i>	Разжижается на 2-6 сут	Выделяет	Пептонизация	+/-	-	-	-	-	-	-
Кл. ботулини- ум <i>Cl. botulinum</i>	Разжижается на 2-4 сут	Выделяет	Пептонизация	+	+/-	-	-	+/-	+/-	-
Кл. хистолити- кум <i>Cl. histolyticum</i>	Разжижается на 2-4 сут	Не постоянно	Пептонизация	-	-	-	-	-	-	-
Кл. сорделлии <i>Cl. sordellii</i>	Разжижается на 2-4 сут	Не постоянно	Свертывает	+	-	-	-	-	+	-
Кл. спорогенес <i>Cl. sporogenes</i>	Разжижается на 2-4 сут	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 °C 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 эpsilon-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 отдельно. 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 °C, 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 см³, морских свинок подкожно в дозе 3—5 см³ (одной мыши 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, ослабление мускулатуры, западание брюшной стенки — «косиная 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 см³ или морской свинке в дозе 3,0—5,0 см³. 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°C, 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 бродзота 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 А, С, D, и Е.

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 А, В, С, D, Е 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 А, во вторую — типа С, в третью — типа D, в четвертую — типа Е (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 внутривенно 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 <i>Cl. perfringens</i>	Основной токсин	Антитоксические сыворотки типа				Контроль
		А	С	Д	Е	
А	Альфа	—	Н	Н	Н	+
С (В, F)	Бета	+	—	+	+	+
Д	Эпсилон	+	+	—	+	+
Е	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 А, В, С, Е 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 см³ 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. Егеева*

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,
Новопрессненский пер., 3.
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256. Зап. 1250