

26503-85



**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ  
СОЮЗА ССР**

**ЖИВОТНЫЕ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ**

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КЛОСТРИДИОЗОВ**

**ГОСТ 26503-85**

**Издание официальное**

Цена 5 коп.



**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР ПО СТАНДАРТАМ**

**Москва**

**РАЗРАБОТАН Министерством сельского хозяйства СССР**

**ИСПОЛНИТЕЛИ**

Л. В. Кирялод, 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 бродячку — 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 см<sup>3</sup> 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;
- микроанэрозат;
- холодильник бытовой;
- насос вакуумный;
- потенциометр или рН-метр;
- центрифугу с частотой вращения 5 тыс. об/мин;
- пипетки стеклянные мерные вместимостью от 1 до 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292—74;
- чашки Петри по ГОСТ 23932—79;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 25336—82;
- раствор генциан-виолета или кристалла-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 дробный 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 микроанаэроустат или эксикатор, из которого

Таблица 1

## Культурально-морфологические свойства возбудителей клостридиозов

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптimum развития в среде жидк. или тверд. ср. ст.	Характеристика роста на среде Каста-Тарошин	Характеристика колонии на глюкозо-красном агаре Цейсслера
1. <i>C1. chauvoei</i>	+	Неравномерно окрашенные изогнутые палочки, иногда соединенные по два, четыре вместе	От продолговатой до круглой, расположены центрально или субтерминально или лежат свободно	5—10	Равномерное слабое помутнение и газообразование, через 24 ч бульон прозеленяется	Круглые плоские приподнятые с ровными краями, напоминающие перламутровую пуговицу или форму выгравированного листа, окружены узкой зоной прозрачного гемолиза (IV форма)
2. <i>C1. verticium</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, вуалеобразный налет с микроскопически изрезанными краями и часто с нежными отростками, колонии окружены зоной гемолиза (III форма)
3. <i>C1. perfringens</i>	+	Толстые палочки со слегка закругленными концами, расположены одиночно	Спальные, расположены субтерминально или центрально. В мазках из свежего трупов и молозива культур спор не обнаруживаются	40	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование	Округлые, гладкие, выпуклые серовато-зеленые колонии. Гемолиз сильный, 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	Оптimum развития в флорозе, мм рт. ст.	Характеристика роста на среде Катта-Тарощи	Характеристика колоний на глюкозо-красном агаре Шейфера
4. <i>C. l. oedematis</i>	+	Крупные палочковидные морфологии 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, коричневые, складчатые с изрезанными краями и выпуклым темным центром, гемолиз сильный, прозрачный, но может отсутствовать (II форма)
5. <i>C. l. sortellii</i>	+	Крупные палочковидные морфологии 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, коричневые, складчатые, с сероватой 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, попарно, редко цепочками	Овальные, расположены субтерминально («Игольное ушко»)	8—15	Интенсивное помутнение без газообразования	Мелкие, круглые, гладкие колонии с ровными краями, гемолиз отсутствует, иногда noticeable (VIII форма)

Продолжение табл. 1

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микроба	Форма спор и их расположение	Оптimum развития или температура, °С	Характеристика роста в среде Китта-Тароцци	Характеристика колоний на глюкозо-агарном агаре Цейссера
7. <i>C. srogo- genes</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 палочек обнару- живаются споры	15—20	Рост обильный, кусочки печени обволакивают слизистым осад- ком, верх среды прозрачный, га- зообразование слабое. Культу- ра издает неприят- ный гнилост- ный запах	Вязкие с изрезанными краями, напоминаю- щие коровяк, погру- жены в агар, поверх- ность матовая с желто- ватым центром, зона ге- молиза интенсивная резко ограниченная (VI форма)
8. <i>C. botuli- pum</i>	+	Толстые па- лочка с закруг- ленными конца- ми, расположены парно, иногда в виде цепочек	Овальные, круглые, рас- положены субтерминаль- но, редко центрально	3—5	Рост мелли- вый, через 36— —48 ч появляется сы интенсивная муль, которая постепенно осе- дает на дно, после чего буль- он просветляет- ся	Круглые, широкова- тые или корневидные нежно-серые колонии, гемолиз прозрачный (II форма)
9. <i>C. tetani</i>	+	Тонкая палоч- ка со слегка закругленными концами	Круглые шарообразные, расположены субтерминаль- но, напомина- ют барабан- ные палочки	3—15	Равномерная муль с незначи- тельным газооб- разованием, че- рез 48—72 ч столбик просвет- ляется, издает запах жженого рога	Нежные колонии, центр слегка приподнят, от краев отходят непра- вильные отростки, гемо- лиз 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 отбирают 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<sup>3</sup>.

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
<p><i>Cl. perfringens</i> тип А — возбудитель злокачественного отека, редко энтеротоксемии тип Д — возбудитель энтеротоксемии</p>	<p>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</p>
<p><i>Cl. perfringens</i> тип В — возбудитель дизентерии ягнят тип С — возбудитель энтеротоксемии</p>	<p>Кожа на месте инъекции легко отделяется, но не отслаивается. Мускулатура сухая, красного цвета различных оттенков. Кишечник вздут, геморрагически воспален, иногда образуются язвы (тип В)</p>
<p><i>Cl. chauvoei</i> возбудитель эмфизематозного карбункула</p>	<p>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</p>

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

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 определении вида кlostридий 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 А, С, D, Е;

сыворотки *Cl. botulinum* антитоксические типов А, В, С, Е 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<sup>3</sup> или внутривенного введения кролику массой 1,8—2,0 кг в дозе 1,0—1,5 см<sup>3</sup>. 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 кластридий

Вид макроорганизмов	Патогенные среды									
	Желатин	Сывороточный	Молоко	Глицерин	Салицин	Мальтоза	Галактоза	Желатин	Сахароза	Глюкоза
Кл. перфрингенс	Разжижается на 3—5 сут	Не выделяет	Быстро свертывает	+/-	-	+	+	-	+	+
Сl. perfringens	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	+/-	-	-	-
Кл. эдематис	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	+	-	+	-	+	+
Сl. oedematis	Разжижается на 2—4 сут	Не выделяет	Медленно свертывает	-	-	+	+	-	+	+
Кл. Шово	Разжижается на 2—6 сут	Выделяет	Пептонизация	-	-	-	-	-	-	-
Сl. chauvoei	Разжижается на 2—4 сут	Выделяет	Пептонизация	-	-	+	+	-	+	+
Кл. тетани	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Пептонизация	-	-	-	-	-	-	-
Сl. tetani	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Пептонизация	-	-	-	-	-	-	-
Кл. ботулини-ум	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	-	-	-	-
Сl. botulinum	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	-	-	-	-
Кл. хистолитикум	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	-	-	-	-
Сl. histolyticum	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	-	-	-	-
Кл. сорделлии	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	-	-	-	-
Сl. sorbellii	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	-	-	-	-
Кл. спорогенес	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	-	-	-	-
Сl. sporogenes	Разжижается на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	-	-	-	-	-	-	-

+ — 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 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 °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 белые 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<sup>3</sup>, морских свинок подкожно в дозе 3—5 см<sup>3</sup> (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 — «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 см<sup>3</sup> или морской свинке в дозе 3,0—5,0 см<sup>3</sup>. 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 см<sup>3</sup>. 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 мышак 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 см<sup>3</sup>. 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 см<sup>3</sup>. 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 мышак, 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 см<sup>3</sup>. При наличии *Cl. chauvoei* животные погибают в течение 24—96 ч.

Мышечный экссудат вводят таким же способом в дозе 0,5—1,0 см<sup>3</sup>. 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 см<sup>3</sup>. 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 бродяга 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 см<sup>3</sup>. 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 см<sup>3</sup>. 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 фильтрах 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 см<sup>3</sup> в пять пробирок и добавляют по 1,0 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> физиологического раствора (контроль). Смесь сывороток и исследуемого материала после выдерживания при 37—38 °С в течение 30 мин вводят по 0,5 см<sup>3</sup> внутривенно или внутрибрюшинно двум белым мышам или внутривенно по 0,2 см<sup>3</sup> морской свинке или кролику. Одновременно в тех же дозах вводят испытываемую 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 образования некроза в контроле у морской свинки (кролика).

Животные, получившие смесь токсемна 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 токсемна *Cl. perfringens*

Тип культур <i>Cl. perfringens</i>	Основной токсемн	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 токсемна *Cl. botulinum* определяют в реакции нейтрализации антитоксическими сыворотками типов А, В, С, Е и F.

Реакцию ставят по схеме: исследуемый материал по 2,4 см<sup>3</sup> разливают в шесть пробирок, в пять из которых добавляют по 0,6 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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. Н. Евтеева*

«Сдано в набор 17.04.85 Подп. к печ. 26.05.85 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. Зав. 1250