



**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. 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 лицетин-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 бразот — 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;

микроанаэростат;

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 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 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 микроанаэростат или эксикатор, из которого

## Культурально-морфологические свойства возбудителей клостридиозов

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптимальная температура, мм рт. ст.	Характеристика роста на среде Китта-Тароцци	Характеристика колонии на лиукозо-красном агаре Цейсслера
1. <i>C1. chauvoei</i>	+	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. <i>C1. 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, 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	Овальные, расположены субтерминально или центрально. В мазках из свежего трутля и молодых 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 буро-коричневого цвета (I форма)

Продолжение табл. 1

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптimum разряжения воздуха, мм рт. ст.	Характеристика роста на среде Китта-Тароцци	Характеристика колоний на глюкозо-кровоном агаре Цейслера
4. <i>C1. oedematiens</i>	+	Крупные палочкообразные 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. <i>C1. sorgdellii</i>	+	Крупные палочкообразные 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. <i>C1. 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 незначительный (VIII форма)

Продолжение табл. 1

Название возбудителя	Окраска по Граму	Морфология микробов	Форма спор и их расположение	Оптimum разрядения воздуха, мм рт. ст.	Характеристика роста на среде Китта-Тароцци	Характеристика колоний на глюкозо-кровяном агаре Цейсслера
7. <i>C1 sporogenes</i>	+	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 обнаруживаются споры	15—20	Рост обильный, кусочки печени обволакивают слизистым осадком, верх среды прозрачный, газобразование 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. <i>C1. botulinum</i>	+	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. <i>C1. tetani</i>	+	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<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 клостридий	Патологоанатомические изменения
C1. septicum возбудитель бразота, 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 кашицеобразную 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 *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.

## Ферментативные свойства патогенных клостридий

Вид микроорганизмов	Питательные среды									
	Желатин	Сероводород	Молоко	Глюкоза	Сахароза	Маннит	Глицерин	Салацин	Мальтоза	Галактоза
Кл. перфрингенс <i>Cl. perfringens</i>	Разжижает на 3—5 сут	Не выделяет	Быстро свертывает	+	+	—	+/-	—	+	+
Кл. эдематигенс <i>Cl. oedematiens</i>	Разжижает на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	+	—	—	—	—	+/-	—
Кл. септикум <i>Cl. septicum</i>	Разжижает на 2—4 сут	Не постоянно	Свертывает	+	—	—	—	+	+	—
Кл. Шово <i>Cl. chauvoei</i>	Разжижает на 2—6 сут	Не выделяет	Медленно свертывает	+	+	—	—	—	+	+
Кл. тетани <i>Cl. tetani</i>	Разжижает на 2—4 сут	Выделяет	Пептонизация	+/-	—	—	—	—	—	—
Кл. ботулини-ум <i>Cl. botulinum</i>	Разжижает на 2—4 сут	Выделяет	Пептонизация	+	+/-	—	—	+/-	+/-	—
Кл. хистолитикум <i>Cl. histolyticum</i>	Разжижает	Не постоянно	Пептонизация	—	—	—	—	—	—	—
Кл. сорделлии <i>Cl. sordellii</i>	Разжижает	Не постоянно	Свертывает	+	—	—	—	—	+	—
Кл. спорогенес <i>Cl. sporogenes</i>	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 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 — «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<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 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 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°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 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 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 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 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 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 фильтратах или центрифугатах культур микроорганизмов указанного вида типов А, В, С, D, Е и F.

Реакцию ставят на белых мышцах или морских свинках, или кроликах. При постановке реакции на мышцах 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 внутрикожно по 0,2 см<sup>3</sup> 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 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. 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