



**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР**

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЛЕПТОСПИРОЗА**

ГОСТ 25386—91

Издание официальное

БЗ 9—91/1051

КОМИТЕТ СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ СССР

Москва

Редактор *Т. И. Василенко*
Технический редактор *Г. А. Терebinкина*
Корректор *А. И. Зюбан*

Сдано в наб. 29.01.92. Подп. в печ. 11.03.92. Усл. п. л. 2,0. Усл. кр-отг. 2,0. Уч.-изд. л. 2,10
Тираж 464.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП,
Новопресненский пер., 3.
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256.

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики лептоспироза

**ГОСТ
25386—91**Agricultural animals. Methods of laboratory
diagnostics of leptospirosis

ОКСТУ 9809

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на методы лабораторной диагностики инфекционной болезни— лептоспироза, вызываемой возбудителем вида *Leptospira interrogans*.

Диагноз на лептоспироз устанавливают на основании эпизоотологических, эпидемиологических, клинических и патологоанатомических данных с обязательным подтверждением диагноза лабораторными исследованиями.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Материалом для исследований служит кровь, моча, органы и ткани, а также трупы мелких животных. От трупов крупных животных берут сердце, кусочки паранхиматозных органов, почку, транссудат из грудной и брюшной полостей, перикардальную жидкость, мочевого пузыря с содержимым, спинномозговую жидкость.

Абортированный плод доставляют в лабораторию целиком или берут желудок с содержимым, сердце и паренхиматозные органы плода.

1.2. Кровь для серологического исследования берут в количестве 5—10 см³ не ранее чем через 5—7 сут после проявления клинических признаков болезни или через 90 сут — для крупного рогатого скота, 60 сут — для свиней и животных других видов после введения вакцины. Кровь для бактериологического исследования берут в период лихорадки на 1—7 сут болезни.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта СССР

1.3. Мочу собирают при естественном мочеиспускании в чистые пробирки. У коров и свиноматок допускается брать мочу катетером.

Мочу микроскопируют непосредственно в хозяйствах.

1.4. Почку извлекают в невскрытой капсуле. Сердце, мочевой пузырь и желудок плода берут с содержимым, для чего накладывают лигатуры на соответствующие сосуды и сфинктеры. Каждый орган или кусочек органа заворачивают в целлофановый пакет.

1.5. Ликвор, транссудат, спинномозговую жидкость и другие жидкие субстраты насасывают стерильным шприцем или пипеткой в стерильные пробирки.

1.6. Пробами для гистологического исследования служат кусочки коркового слоя почек и печени объемом не более 1 см³, консервированные 10 %-ным раствором формалина.

1.7. Пробы патологического материала должны быть исследованы с момента взятия в течение 6 ч в летнее время и 10—12 ч при хранении его в охлажденном состоянии.

1.8. Микроскопия мочи должна быть закончена при температуре: 30—40 °С в течение 3 ч, 25—30 °С — 4—5 ч, 20—25 °С — 6—8 ч, 16—20 °С — 10—12 ч с момента взятия.

1.9. Взятые пробы помещают в ящик, опечатывают и направляют в лабораторию с нарочным (курьером).

В сопроводительном документе к пробам патологического материала указывают время гибели животного или время взятия проб при жизни.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Серологический метод

Метод основан на обнаружении специфических антител в крови животных реакцией микроагглютинации (РМА) и реакцией иммуноадсорбции (РИА).

2.1.1. Реакция микроагглютинации

2.1.1.1. Аппаратура, материалы, реактивы

Термостат, обеспечивающий регулирование температуры на 28—30 °С.

Центрифуга со скоростью вращения не менее 10000 об/мин.

Микроскоп биологический по ГОСТ 8074.

Конденсор темного поля.

Осветитель с точечной лампой.

Стекла предметные толщиной 0,8—1,1 мм и покровные (стекла, используемые для микроскопии, должны быть бесцветными, прозрачными, чистыми, без царапин и бликов) по ГОСТ 9284.

Пластинки с лунками или пробирки Флоринского.

Штативы.

Пилетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292.

Аппарат Флоринского.

Петля бактериологическая.

Натрий хлористый х. ч. по ГОСТ 4233 или ч. д. а. 0,85 %-ный раствор в дистиллированной воде. Раствор разливают во флаконы или бактериологические пробирки и стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С в течение 30 мин.

Антигены — живые культуры штаммов лептоспир, указаны в таблице.

Серогруппа	Серовар	Рекомендуемые штаммы*
Pomona Tarassovi	pomona tarassovi	Pomona Perepelicin (Mitis Johnson)
Grippotyphosa Hebdomadis	grippotyphosa kabura (borincana, hebdomadis)	Moskva V (Valbuzzi) Kabura (HS—22, Hebdomadis)
Sejroe	polonica (sejroe, wolffi, hardjo)	493 Poland (M—84, 3705, Hardjoprajitno)
Mini Icterohaemorrhagiae	szwajizak copenhageni (icterohaemorrhagiae)	Szwajizak M—20, Waijnberg (RgA)
Canicola Bataviae Javanica	canicola djatzi (bataviae) poi (javanica)	Hond Utrecht IV HS—26 (Van Tienen) Poi (Veldrat Bataviae 46)
Australis	australis (bratislava)	Ballico (Iez Bratislava)
Autumnalis	autumnalis (rachmat)	Akijami A (Rachmat)
Ballum Pyrogenes Cynopteri Panama Celledoni Shermani Djasiman Sarmin Louisiana Ranarum Manhao	ballum (castellonis) pyrogenes cynopteri panama celledoni shermani djasiman sarmin louisiana ranarum manhao	Mus 127 (Castellon 3) Salinem Vleermuis 3568 (3522C) CZ—214—K Celledoni LT—821 Djasiman Sarmin LSU—1945 ISF L 105

* В скобках приведены штаммы-аналоги. Кроме рекомендуемых могут быть использованы и другие штаммы лептоспир.

2.1.1.2. Подготовки к исследованию

Предметные и покровные стекла, не бывшие в употреблении, кипятят в мыльном растворе в течение 30 мин, промывают про-

точной водой, ополаскивают дистиллированной водой и насухо протирают.

Стекла после употребления опускают в эксикатор с 1 %-ным раствором соляной кислоты или другим дезинфицирующим веществом. После накопления достаточного количества использованных стекол кислоту сливают, стекла промывают в проточной водопроводной воде, кипятят в мыльном растворе, промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и протирают.

Пластины с лунками после проведения в них реакции опускают для обеззараживания в 1 %-ный раствор соляной кислоты и выдерживают не менее 1 ч. Затем их промывают в теплой мыльной воде, протирают ершиком каждую лунку, тщательно отмывают в проточной водопроводной воде, заливают дистиллированной водой и выдерживают до следующего утра. Утром воду сливают и пластины просушивают.

Перед постановкой реакции каждую лунку дополнительно протирают тампоном из ваты.

Для исследований используют свежую, замороженную, высушенную на фильтровальной бумаге, консервированную фенолом или борной кислотой сыворотку крови.

Для консервации сыворотки фенол добавляют в виде 5 %-ного раствора при постоянном помешивании из расчета $0,05 \text{ см}^3$ (1 капля) на каждый кубический сантиметр сыворотки. Борную кислоту вносят в сыворотку до получения насыщенного раствора и образования на дне пробирки небольшого осадка кристаллов. Кристаллы кислоты не должны попадать в пипетку во время постановки реакции.

При консервации сыворотки методом высушивания на квадраты белой фильтровальной бумаги ($5 \times 5 \text{ см}$) наносят по 3—5 капель ($0,05 \text{ см}^3$ каждая) сыворотки. Высушивание проводят при комнатной температуре или в термостате при температуре $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$. Высушенные пробы сыворотки пригодны для исследования в течение месяца.

Гемоллизированную, загнившую, плесневелую и проросшую сыворотку не исследуют.

Сыворотку разбавляют физиологическим раствором

- 1) невакцинированных животных 1:25;
- 2) вакцинированных животных 1:50.

После добавления антигена разведения удваиваются и составляют соответственно 1:50 и 1:100.

При необходимости сыворотку разбавляют в соотношениях 1:100, 1:200, 1:400 и т. д. до титра.

Сыворотку крови вакцинированного крупного рогатого скота исследуют в РМА через 3 мес, животных других видов — через 2 мес после вакцинации.

При исследовании сыворотки, высушенной на фильтровальной бумаге, вырезают одну или две капли (0,05 или 0,1 см³) сыворотки, измельчают ножницами и заливают в пробирке физиологическим раствором в объеме 2,45 или 4,9 см³, экстрагируют в течение 1 ч при температуре (37±1) °С.

Полученный экстракт используют как исходное разведение сыворотки 1:25 или 1:50.

Сыворотку крови животных при ввозе их в хозяйство и вывозе из него для племенных целей и целей воспроизводства разводят 1:25 и исследуют только в одном разведении (после добавления антигена разведение сыворотки будет соответствовать 1:50).

При изучении этиологической структуры и обследовании импортируемого скота реакцию ставят со всеми приведенными в таблице антигенами, при обследовании животных в хозяйствах с известной этиологией и при перевозках внутри страны реакцию ставят с антигенами 4—7 серогрупп (Romona, Tarassovi, Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae).

Диагностические штаммы лептоспир лаборатории получают во Всесоюзном государственном научно-контрольном институте ветеринарных препаратов не реже одного раза в год.

Пригодность культуры для использования в реакции оценивают просмотром в проходящем свете и микроскопией. При достаточном накоплении лептоспир после встряхивания пробирки с культурой в среде в проходящем свете хорошо заметны муаровые волны, а в спокойном состоянии наблюдается легкая опалесценция. Наличие осадка, пленки, помутнения среды свидетельствует о прорастании посторонней микрофлоры, полная прозрачность среды — об отсутствии роста лептоспир.

В реакции используют чистые культуры лептоспир в возрасте 5—15 сут без признаков агглютинации и лизиса с накоплением 70—100 микробных клеток в поле зрения микроскопа при увеличении 40×1,5×7 или 40×7—10.

Через каждые 3 мес лаборатории контролируют диагностические штаммы лептоспир в реакции микроагглютинации (РМА) с групповыми агглютинирующими сыворотками.

2.1.1.3. Проведение исследования

Для постановки РМА разведенную сыворотку разливают мерной пипеткой или аппаратом Флоринского, начиная с большего разведения, в лунки агглютинационных пластин или пробирки по 0,1 см³ в каждую.

Сыворотку из каждого разведения разливают в отдельный ряд, состоящий из 4—23 лунок (пробирок) в зависимости от количества антигенов, используемых в реакции. Каждую культуру-антиген вносят по 0,1 см³ в 1—3 лунки в зависимости от количества разведений сыворотки. После добавления антигенов пластины встряхивают и выдерживают в термостате при 30—37 °С в течение 1 ч.

Контрольной служит смесь 0,1 см³ культуры лептоспир с 0,1 см³ физиологического раствора. Лептоспиры в контрольном варианте должны оставаться подвижными, не иметь признаков лизиса и агглютинации.

Реакцию учитывают микроскопией каплей из каждой лунки в темном поле микроскопа при увеличении 20×10 или 40×7×1,5. Капли из лунок наносят на предметное стекло бактериологической петлей от большего разведения к меньшему и просматривают их без покровного стекла. Капли наносят двумя способами: бактериологической петлей диаметром 3 мм наносят на стекло сразу до 30 капель и просматривают их под микроскопом; бактериологической петлей диаметром 1 мм наносят на предметное стекло в освещенный центр поля зрения одну каплю и просматривают ее, передвигая столик на 2—3 мм, и рядом с первой наносят и учитывают вторую каплю. Перед взятием каждого нового антигена петлю прокалывают и охлаждают.

Результаты реакции оценивают в крестах:

++++	—	агглютинированы	100 %	лептоспир;
+++	—	»	75 %	»
++	—	»	50 %	»
+	—	»	25 %	»
—	—	агглютинация отсутствует.		

Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир и образовании паучков. Паучок включает от 3—5 до нескольких десятков и сотен лептоспир. Свободные концы лептоспир сохраняют подвижность.

В начальных разведениях сыворотки может наблюдаться лизис лептоспир, проявляющийся в набухании и прекращении движения клеток, появлении зернистости и полного распада микробных клеток.

2.1.1.4. Оценка результатов

Положительной считают РМА, оцененную на два креста и более при отсутствии агглютинации в контроле.

Наличие специфических антител в сыворотке крови животных в титре 1:50 у невакцинированных — 1:100 у вакцинированных и выше свидетельствует об инфицировании данной особи лептоспирами и возможном лептоспиросительстве.

РМА специфична в любом разведении, а наличие антител в любом титре свидетельствует об инфицировании данной особи лептоспирами и возможном лептоспиросительстве.

По результатам серологических исследований возбудителями лептоспироза считают лептоспиры той серологической группы, к которой обнаружены антитела в наиболее высоком титре.

Необходимо учитывать, что в сыворотке крови свиней, лошадей, крупного и мелкого рогатого скота при исследовании в РМА обнаруживают в 5—15 % случаев антитела в наиболее высоком

титре к лептоспирам: Autumnalis, Synopteri, Bataviae, Pyrogenes, Australis, которые не выделяют у сельскохозяйственных животных. Такие реакции следует рассматривать как межгрупповые.

Лептоспиры названных серогрупп могут быть признаны возбудителями лептоспироза у сельскохозяйственных животных только после выделения в чистой культуре или подтверждения их роли исследованием пробы сыворотки в реакции иммуноадсорбции.

В случае выявления реакций с лептоспирами необычных для сельскохозяйственных животных серогрупп проводят повторное исследование сыворотки крови в РМА с интервалом 10—12 сут с целью освобождения от межгрупповых реакций без проведения иммуноадсорбции.

2.1.2. Реакция иммуноадсорбции

2.1.2.1. Аппаратура, растворы и антигены

Для проведения исследования применяют аппаратуру, растворы и антигены, указанные в п. 2.1.1.1.

2.1.2.2. Проведение исследования

В реакции иммуноадсорбции изучают пробы сыворотки животных, агглютинирующие лептоспир нескольких серологических групп в разных титрах или имеющие наиболее высокий титр по отношению к лептоспирам, ранее не известным в качестве возбудителя лептоспироза у сельскохозяйственных животных.

Для проведения адсорбции выращивают во флаконах вместимостью 0,5—1,0 дм³ все штаммы лептоспир, с которыми данная проба сыворотки дала реакцию агглютинации, 5—7 сут культуры лептоспир осаждают центрифугированием с частотой вращения 10000 об/мин в течение 30 мин. Сливают надосадочную жидкость, осадок подсушивают, 0,1 см³ исследуемой сыворотки смешивают с 0,9 см³ физиологического раствора и дробно в три приема с интервалом 10 мин добавляют к осадку антигена, суспендируя его после каждой порции разведенной 1:10 сыворотки. Смесь выдерживают в течение 24—48 ч при 1—5 °С и отделяют сыворотку центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 мин. Адсорбированную сыворотку проверяют в РМА на наличие остаточных антител к штамму-адсорбенту, а затем при отрицательных результатах исследуют с лептоспирами всех серогрупп, с которыми реагировала сыворотка до адсорбции.

Для сокращения объема работы сыворотку целесообразно в начале адсорбировать лептоспирами, являющимися частыми возбудителями болезни у животных данного вида.

2.1.2.3. Оценка результатов

В процессе адсорбции лептоспиры, являющиеся возбудителем инфекции у данной особи, извлекают из сыворотки антитела к лептоспирам всех серологических групп, в то время как антитела к возбудителю болезни не адсорбируются из сыворотки гетерологичными типами лептоспир.

Возбудителями инфекции являются лептоспиры той серогруппы, антигены которой извлекают из сыворотки антитела к лептоспирам всех серологических групп.

2.1.3. Учет результатов серологических исследований

2.1.3.1. По результатам серологических исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство (ферму, отделение и т. д.) неблагополучным по лептоспирозу, если специфические антитела обнаружены в сыворотке крови при однократном исследовании в РМА в титре 1:100 у вакцинированных и 1:50 и выше у невакцинированных более чем у 20 % обследованных животных.

2.1.3.2. Лептоспироз считают причиной абортос при обнаружении антител в сыворотке крови абортированного плода и предположительно при высоком титре антител (1:2500 и более) в группе абортированных животных и низком титре (до 1:500) или отрицательной реакции в группе здоровых животных.

2.1.3.3. Лептоспиры серогрупп *Autumnalis*, *Synopteri*, *Bataviae*, *Pyrogenes*, *Australis*, *Ballum* могут быть признаны возбудителями лептоспироза животных только после выделения из органов павших животных или подтверждения их роли исследованием пробы сыворотки в реакции иммуноадсорбции.

2.2. Бактериологический метод

Метод заключается в обнаружении лептоспир в исследуемом материале путем микроскопии в темном поле микроскопа, иммунофлуоресцентным методом, выделения культур лептоспир в специальных средах, постановке биологических проб на лабораторных животных, идентификации и дифференциации выделенных культур.

2.2.1. Аппаратура, материалы, реактивы

Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и растворы, указанные в п. 2.1.1, и дополнительно:

Колбы или бутылки вместимостью 1, 2, 3, 5 дм³.

Сифоны с резиновыми шлангами.

Фильтры Зейтца или другие аналогичного типа.

Сыворотку крови кролика или барана, не содержащую специфических противолептоспирозных антител.

Среду сывороточную на фосфатном буфере.

Среду Уленгута (водно-сывороточную среду).

Среду Ферворта-Вольфа (в модификации С. И. Тарасова).

Среду Флетчера полужидкую.

Среду Кортгофа.

Среду синтетическую безбелковую Шенберга.

Среду твин (полисорбат) альбуминовую Эллингаузена.

Среду Эллингаузена.

Среду твин-альбумин-сывороточную Эллиса.

Среду усовершенствованную селективную для выделения лептоспир.

Среду избирательную с 5-флюороурацилом для выделения лептоспир.

Среду плотную Кокса.

2.2.2. Подготовка к испытанию

2.2.2.1. Приготовление сыворотки крови кролика или барана

Для приготовления сыворотки используют:

кровь кролика или барана;

цилиндры стерильные вместимостью 100 и 200 см³ по ГОСТ 1770;

шприцы по ГОСТ 22967;

пробирки бактериологические по ГОСТ 1770.

Сыворотку готовят следующим образом: кровь у кролика берут из сердца в количестве 30—40 см³ в стерильные цилиндры вместимостью 100—200 см³ или шприцем, из которого кровь переливают в стерильные пробирки, у барана — из яремной вены в стерильные цилиндры вместимостью 0,5—1,0 дм³ в количестве 400—500 см³.

Цилиндры или пробирки с кровью выдерживают при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30—40 мин, затем кровяной сгусток обводят металлической спицей и ставят в холодильник для отстаивания сыворотки на 1—2 сут. Отстоявшуюся сыворотку сливают в стерильные флаконы вместимостью 100—200 см³ и инактивируют в водяной бане при 56—58 °С в течение 1 ч.

Инактивированную сыворотку хранят при 1—5 °С и используют по мере необходимости для изготовления питательной среды.

2.2.2.2. Приготовление сывороточной среды на фосфатном буфере

Для приготовления среды используют:

калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 10075;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773.

Среду готовят следующим образом: рабочий раствор фосфатного буфера (рН 7,2—7,4) в количестве 1,4 дм³ разливают в бутылки с сифоном, стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин.

Раствор фосфатно-буферный готовят следующим образом: в стеклянных колбах растворяют отдельно 9,078 г однозамещенного фосфорнокислого калия в 1 дм³ дистиллированной воды и 11,879 г двузамещенного фосфорнокислого натрия в 1 дм³ дистиллированной воды. Эти маточные растворы хранят при 2—4 °С до 30 сут.

Для получения рабочего буферного раствора берут 79 см³

маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия, 21 см³ маточного раствора однозамещенного фосфорнокислого калия и 900 см³ дистиллированной воды.

Буфер должен иметь рН 7,2—7,4. При отклонении рН в кислую сторону добавляют раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия. При отклонении рН в щелочную сторону добавляют в раствор однозамещенного фосфорнокислого калия. Рабочий буферный раствор стерилизуют при 120 °С в течение 30 мин.

В охлажденный буферный раствор добавляют 5—10 % инактивированной сыворотки крови кролика или барана.

Смесь фильтруют через фильтр Зейтца или другой. Профильтрованную среду расфасовывают сифоном в стерильные пробирки или флаконы.

Среду для проверки на стерильность выдерживают при (37±1) °С в течение 3—5 сут.

2.2.2.3. Приготовление среды Уленгута (водно-сывороточной среды)

Для приготовления среды используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709 или колодезную, или речную, или водопроводную;

пробирки бактериологические по ГОСТ 1770;

сыворотку крови кроликов инактивированную.

Среду готовят следующим образом: воду дистиллированную, водопроводную, колодезную или речную разливают в пробирки по 5 см³ и стерилизуют, охлаждают, добавляют в каждую пробирку по 0,5 см³ свежей кроличьей инактивированной сыворотки. Среду для проверки на стерильность выдерживают при (37±1) °С в течение 3—5 сут.

2.2.2.4. Приготовление среды Ферворта-Вольфа (в модификации С. И. Тарасова)

Для приготовления среды используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

пептон (Дифко или Витте);

бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;

пробирки бактериологические по ГОСТ 1770;

сыворотку крови кролика;

баню водяную.

Среду готовят следующим образом. к 900 см³ дистиллированной воды добавляют 0,5 г хлорида натрия, 1 г пептона (Дифко или Витте), 100 см³ маточного раствора фосфатного буфера с рН 7,2—7,4. Смесь в колбе автоклавируют при 120 °С в течение 30 мин. На следующий день дважды фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 5 см³ и снова автоклавируют при 120 °С в течение 30 мин. В пробирки с прозрачной сре-

дой добавляют по 0,5 см³ кроличьей сыворотки. Среду прогревают в водяной бане при 56—58 °С в течение 30 мин.

Для проверки на стерильность пробирки со средой выдерживают при (37±1) °С в течение 3—5 сут.

2.2.2.5. Приготовление полужидкой среды Флетчера

Для приготовления используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

агар-агар микробиологический по ГОСТ 17206 или пищевой по ГОСТ 16280, или Дифко;

пробирки бактериологические по ГОСТ 25336;

сыворотку крови кролика или барана;

баню водяную.

Среду готовят следующим образом: к 1 дм³ дистиллированной воды добавляют 2 г агар-агара (лучше агар Дифко). Смесь кипятят 30 мин, расфасовывают по 5 см³ в пробирки, автоклавизируют при 120 °С в течение 30 мин, охлаждают, добавляют в каждую пробирку по 0,5 см³ стерильной кроличьей или овечьей сыворотки, прогревают в водяной бане при 56—58 °С в течение 30 мин. Среду контролируют на стерильность выдержкой при (37±1) °С в течение 3—5 сут.

2.2.2.6. Приготовление среды Кортгофа

Для приготовления среды используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

пептон Витте;

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

натрия гидрокарбонат по ГОСТ 199;

калий хлористый по ГОСТ 4234;

кальций хлористый по ГФХ;

калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 10075;

натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773;

аппарат Коха;

бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;

пробирки бактериологические по ГОСТ 1770.

Среду готовят следующим образом: к 500 см³ дистиллированной воды добавляют 0,40 г пептона Витте, 0,70 г хлорида натрия (NaCl), 0,01 г гидрокарбоната натрия (NaHCO₃), 0,02 г хлорида калия (KCl), 0,02 г хлорида кальция (CaCl₂), 0,09 г калия фосфорнокислого однозамещенного (KH₂PO₄), 0,48 г натрия фосфорнокислого двузамещенного (Na₂HPO₄×2H₂O). Раствор прогревают в аппарате Коха при 100 °С в течение 20 мин, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и еще раз прогревают при 100 °С в течение 30 мин. После того как раствор остынет, добавляют 8 % свежей сыворотки. Среду разливают по 5—8 см³ в пробирки и прогревают в водяной бане при 56 °С в течение 1 ч.

2.2.2.7. Приготовление безбелковой среды Шенберга

Для приготовления среды используют:
воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773;
калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 10075;
магний сернокислый по ГОСТ 4523;
сульфат железа (II) аммоний;
кислоту этилендиаминтетрауксусную;
твин-80;
твин-60;
глицерин по ГОСТ 6259;
L — аспарагин;
витамин В₁₂;
витамин В₁;
кальция карбонат по ГОСТ 3159;
кислоту соляную по ГОСТ 3118;
уголь активированный древесный;
фильтр мембранный.

Среду готовят следующим образом: к 1 дм³ дистиллированной воды добавляют 0,531 г натрия фосфорнокислого двузамещенного (Na₂HPO₄), 0,069 г калия фосфорнокислого однозамещенного (KH₂PO₄), 0,150 г сульфата магния (MgSO₄×7H₂O), 0,006 г сульфата железа (II) — аммония FeSO₄·(NH₄)₂SO₄·6H₂O, 0,004 г Ca⁺⁺, 0,010 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, 0,050 г твина-80, 0,200 г твина-60, 0,200 г глицерина, 0,500 г L-аспарагина, 0,01 г витамина В₁₂ и 0,001 г витамина В₁. Ca⁺⁺ берут в виде карбоната кальция и обрабатывают раствором соляной кислоты, витамин В₁ добавляют в среду асептически после стерилизации. Среду нагревают до кипения, фильтруют, расфасовывают и стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин, конечное значение рН составляет 7,4—7,6.

Для детоксикации добавляют к питательной среде сыворотку крови или альбумин или соединяют твин с 0,5 частями по массе мелкого порошка древесного угля. Для этого 20 г отобранного полисорбата разводят в 200 см³ дистиллированной воды при комнатной температуре и перемешивают раствор до достижения однородной консистенции. При помешивании к водному раствору медленно добавляют 40 г активированного древесного угля. Отношение твина к древесному углю может варьироваться от 1:6 до 6:1. Помешивание продолжают до 18 ч при 22—25 °С, далее отстаивают уголь в течение 18 ч при 4 °С. Раствор полисорбата осторожно отделяют от осадка древесного угля, центрифугируют в течение 1 ч при 10000 об/мин, фильтруют через мембранный фильтр для удаления оставшихся мелких частиц угля, хранят раствор полисорбата при минус 20 °С.

2.2.2.8. Приготовление твин (полисорбат) альбуминовой среды Эллингаузена

Для приготовления среды используют:

аммоний хлористый по ГОСТ 3773;

цинк сернокислый по ГОСТ 4174;

кальций хлористый по ГВХ;

магний хлористый по ГОСТ 4209;

железо сернокислое по ГОСТ 4148;

медь сернокислую по ГОСТ 4165;

глицерин по ГОСТ 6259;

твин-80;

витамин В₁;

витамин В₁₂;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

натрий фосфорнокислый однозамещенный;

калий фосфорнокислый;

натрий хлористый по ГОСТ 4233,

тиамин;

альбумин бычий;

натрия гидроокись.

Для приготовления среды готовят исходные водные растворы (грамм на 100 см³ воды): хлорида аммония (NH₄Cl) — 25, сульфата цинка (ZnSO₄×7H₂O) — 0,4, хлорида кальция (CaCl₂×2H₂O) — 1,0, хлорида магния (MgCl₂×6H₂O) — 1,0, сульфата железа (FeSO₄×7H₂O) — 0,5, сульфата меди (CuSO₄×5H₂O) — 0,3, глицерина — 10, твина-80 — 10, витамина В₁ — 0,5, витамина В₁₂ — 0,02. Растворы хранят в замороженном состоянии.

Основную среду готовят добавлением к 997 см³ дистиллированной воды натрия фосфорнокислого однозамещенного (Na₂HPO₄) — 1,0 г или (Na₂HPO₄×2H₂O) — 1,2535 г, калия фосфорнокислого (KH₂PO₄) — 0,3 г, хлорида натрия (NaCl) — 1,0 г и исходных растворов: хлорида аммония — 1,0 см³, тиамин — 1,0 см³, глицерина 1,0 см³, рН доводят до 7,4, стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 20 мин.

Альбуминово-твиновая добавка представляет собой 10 %-ный бычий альбумин, фракция V, 20 г которой добавляют к 100 см³ стерильного бидистиллята, при постоянном помешивании, добавляют исходные растворы: хлоридов кальция и магния по 3,0 см³, сульфата цинка — 2,0 см³, сульфата меди — 0,2 см³, сульфата железа — 20,0 см³, витамина В₁₂ — 2,0 см³, твина-80 — 25,0 см³, воды до 200 см³. Доводят рН до 7,4, используя гидроксид натрия, фильтруют через фильтр миллипор (0,22 микрон) или Зейтца (0,2—0,3 микрон). Добавку можно хранить при (4±1) °С или замороженной при минус 20 °С.

Среду для культивирования готовят добавлением 1 части альбуминовотвиновой добавки к 9 частям основной среды в асеп-

тических условиях, фильтруют, расфасовывают по пробиркам или флаконам.

2.2.2.9. Приготовление среды Эллингаузена

Для приготовления среды используют:

цинк сернокислый по ГОСТ 4174;

железо сернокислое по ГОСТ 4148;

воду деионизированную;

L-цистин;

раствор тиамин гидрохлорида — 0,2 %-ный раствор;

полисорбат—80;

витамин B₁₂;

альбумин сывороточный;

натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245;

калий фосфорнокислый по ГОСТ 4198;

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

аммоний хлористый по ГОСТ 3773;

медь сернокислую по ГОСТ 4165.

Готовят полную среду смешиванием 800 см³ основной среды и 200 см³ буферного раствора альбумина сыворотки крови крупного рогатого скота.

Основную среду готовят следующим образом. Смешивают 40 см³ фосфатного буфера, 50 см³ солевого раствора, 1 см³ 0,03 %-ного раствора сульфата меди, 10 см³ 0,04 %-ного раствора сульфата цинка, 0,05 см³ сульфата железа (FeSO₄×7H₂O), растворенного в 20—40 см³ деионизированной воды, 0,2 г цистина, 0,1 см³ 0,2 %-ного раствора тиамин гидрохлорида, 1,2 см³ полисорбата-80 (растворенного в 5—10 см³ воды), 0,2 см³ раствора витамина B₁₂ (1000 см³), доводят деионизированной водой до 1000 см³.

После добавления L-цистина среду перемешивают 20 мин, дают отстояться 20 мин. Смесь очищают фильтрованием. Затем добавляют остальные компоненты. Среду перемешивают, разливают в стеклянные контейнеры, автоклавируют.

Буферный раствор альбумина сыворотки крупного рогатого скота готовят смешиванием 40 см³ фосфатного буфера и 50 г альбумина сыворотки крови крупного рогатого скота, фракция V в порошке (либо эквивалентное количество в стерильном растворе), деионизированную воду добавляют до 1000 см³. Стерилизуют фильтрованием.

Растворы готовят следующим образом:

а) фосфатный буфер: натрий фосфорнокислый (Na₂HPO₄) — 16,6 г, калий фосфорнокислый (KH₂PO₄) — 2,17 г смешивают, добавляют деионизированной воды до 1000 см³;

б) солевой раствор: хлорид натрия (NaCl): 36,0 г, хлорид аммония (NH₄Cl) — 5,35 г, сульфат магния (MgSO₄×6H₂O) — 3,8 г, деионизированная вода — до 1000 см³;