



## ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

**Жануарлар**

**САЛЬМОНЕЛЛЕЗДІ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ**

**Животные**

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА**

**ҚР СТ 3510-2019**

*(Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Salmonellosis, chapter 3.9.8, 2018, NEQ)*

**Ресми басылым**

**Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігінің  
Техникалық реттеу және метрология комитеті  
(Мемстандарт)**



Изм. Сирма

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3510-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





## ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

---

**Жануарлар**

**САЛЬМОНЕЛЛЕЗДІ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ**

**ҚР СТ 3510-2019**

*(Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Salmonellosis, chapter 3.9.8, 2018, NEQ)*

**Ресми басылым**

**Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігінің  
Техникалық реттеу және метрология комитеті  
(Мемстандарт)**

**Нұр-Сұлтан**



Алғысөз

**1 «Elit Art» ЖШС ӘЗІРЛЕП ЕНГІЗДІ**

**2** Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитеті Төрағасының 2019 жылғы 11 желтоқсандағы № 457-од бұйрығымен **БЕКІТІЛІП, ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

**3** Осы стандарт «Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Salmonellosis, chapter 3.9.8, 2018 (Жер жануарларына арналған диагностикалық тестер мен вакциналар жөніндегі нұсқаулық» Халықаралық Эпизоотикалық Бюро (ХЭБ), Сальмонеллез, 3.9.8-тарауы), 2018» Халықаралық Эпизоотикалық Бюросының нұсқауын есепке алып әзірленген.

Сәйкестік дәрежесі – баламалы емес (NEQ).

Ағылшын (en) тілінен аударылған.

**4** Осы стандартта Қазақстан Республикасының «Стандарттау туралы» 2018 жылғы 5 қазандағы № 183-VI Заңының нормалары іске асырылған

**5 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ**

*Осы стандартқа енгізілген өзгерістер туралы ақпарат жыл сайын басып шығарылатын «Стандарттау жөніндегі құжаттар» ақпараттық сілтеуішінде, ал өзгерістер мен түзетулер мәтіні мерзімді басып шығарылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық сілтеуіштерінде жарияланады. Осы стандарт қайта қаралған (ауыстырылған) немесе жойылған жағдайда, тиісті хабарлама ай сайын басып шығарылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық сілтеуішінде жарияланады*

Осы стандарт Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде толықтай немесе бөлшектеліп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды



## ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

## Жануарлар

## САЛЬМОНЕЛЛЕЗДІ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ

Енгізілген күні 2020-07-01

## 1 Қолданылу саласы

Осы стандарт сальмонеллездің зертханалық диагностикалау әдістерін белгілейді.

Сальмонеллез септицемиямен, жіті немесе созылмалы энтеритпен сипатталатын адамдар мен жануарлардың жұқпалы ауруы. Жануарлар клиникалық белгілері байқалмай ауыруы мүмкін. Сальмонеллалар – қоршаған ортаны контаминирлей отырып, нәжіс арқылы бөлінетін ішек бактериялары.

Salmonella тегі екі түрден ғана тұрады: *S. enterica* және *S. bongori*. *Salmonella enterica* алты кіші түрге бөлінеді, олар белгілі бір биохимиялық сипаттамаларымен және Felix O1 бактериофагымен лизиске бейімділігімен ерекшеленеді. Кіші түрлерінің деректері:

Бастапқы кіші тек		Ағымдағы номенклатура
I кіші түрі	=	<i>enterica</i> кіші түрі
II кіші түрі	=	<i>salamae</i> кіші түрі
IIIa кіші түрі	=	<i>arizonae</i> кіші түрі
IIIb кіші түрі	=	<i>diarizonae</i> кіші түрі
IV кіші түрі	=	<i>houtenae</i> кіші түрі
VI кіші түрі	=	<i>indica</i> кіші түрі

*S. bongori* серотиптері, оларды *s. enterica subsp enterica* кіші түрінің серотиптерінен айыру үшін V символымен белгіленеді.

*Salmonella* штаммдары Уайт-Кауфманна-Ле минор схемасына сәйкес липополисахаридті (LPS) немесе O-антигендердің және талшықты ақуыз немесе h-антигендердің кең алуан түрлілік негізінде серотиптерге жіктеледі; қазіргі уақытта 2600-ден астам серотиптер табылды. Адамдар мен жануарларда ауру тудыратын ең көп таралған серотиптер *enterica* кіші түріне жатады.

## 2 2 Қысқарған сөздер

Өгіз альбумині; БСА

Дезоксихолатты цитратты агар; DCA

Сальмонелланың диагностикалық жартылай қатты ортасы; DIASALM

Иммуномагниттік бөліну; IMS

Имуноферменттік талдау; ИФА

Ксилоза-лизин-деоксихолатты агар; КЛД-агар

Барынша ықтимал сандылық әдісі; НВЧ

Раппорт-Вассилиадис түрлендірілген жартылай қатты препараты; MSRV



## ҚР СТ 3510-20119

**Полимеразды тізбекті реакция; ПЦР**  
**Агглютинация реакциясы; РА**  
**Фосфатты-тұзды буфер; ФСБ**

### 3 Жалпы ережелер

3.1 Сальмонеллездің диагностикасы қоздырғышты бөлуде және оны реакциялардың бірінде сәйкестендірілуі болып табылады..

3.2 Сальманеллез диагнозы зерттеу, эпизоотологиялық және клиникалық деректердің, сондай-ақ патологоанатомиялық өзгерістер нәтижелерінің негізінде белгіленеді.

### 4 Диагностикалау әдістері

#### 1-кесте – Сальмонелланы және олардың мақсаттарын диагностикалауға арналған зерттеу әдістері

Әдіс	Мақсаты					
	Инфекциядан бос популяция	Орын ауыстыру алдында инфекциядан бос жеке жануарлар	Жою саясатына жәрдемдесу	Клиникалық жағдайларды растау	Инфекцияның таралуы - бақылау	Вакцинациядан кейін жеке жануарлардың немесе популяциялардың иммундық мәртебесі
Агентті сәйкестендіру <sup>1</sup>						
Сальманелланы бөлу	+++	+++	+++	+++	+++	қ.м
ПЦР	+	+	+	+	+	қ.м
Иммундық жауапты анықтау						
АР	++	-	++	-	+	++
ИФТ	++	-	+++	+	++	+
<p>+++ = ұсынылатын әдіс;            ++ = қолайлы әдіс;            + = кейбір жағдайларда пайдаланылуы мүмкін, бірақ құны, сенімділігі немесе басқа да факторлар оның қолданылуын айтарлықтай шектейді;            - = бұл мақсатқа сәйкес келмейді;            қ.м = қолданылмайды.</p> <p>Ескертпе - +++ немесе ++ санаттарында аталған барлық тесттер формальды тексеруден өтпесе де, олардың рутинді сипаты және олар күмәнді нәтижесіз кеңінен пайдаланылатын факт оларды қолайлы етеді.</p> <p>ПТР = полимеразалық тізбек реакция;            РА= агглютинация реакциясы;            ИФА = иммуноферменттік талдау;</p>						

## 5 Агентті сәйкестендіру

Бактериологиялық зерттеулер үшін сынамалардың үлгілері антибиотиктермен емдеу басталғанға дейін асептикалық жағдайларда іріктеледі. Сынамалардың үлгілерін аурудың жіті фазасы немесе жануардың өлімі кезінде алады. Егер жануарлар ұсақ болса, жануардың өлі денесін толық жеткізу керек.

Аурудың латентті түрі бар жануарларда сальмонелланың бөлінуіне ерекше назар аудару керек, өйткені олар бактерияларды мезгіл-мезгіл және аз мөлшерде бөле алады. Үлгінің үлкен өлшемі, сынамалардың көп саны сынамаларды және қайта іріктемелерді біріктірумен бірге сальмонеллез диагностикасының жоғары деңгейін қамтамасыз ете алады. Бактериологиялық, сондай-ақ серологиялық әдістер залалданған табындарды немесе отарларды сәйкестендіру үшін пайдаланылады, бірақ жұқтырылған жеке жануарларды сәйкестендіру үшін емес..

### 5.1 Өсіру

Өсіру әдістері және нақты диагностикалық жағдайда жақсы жұмыс істей алатын орталар сальмонелланың серотипін, үлгілер көздері мен типін, жануардың түрін, микробиолог тәжірибесін, сондай-ақ селективті байытудың қол жетімділігін және селективті тілімшелі ортаны қоса алғанда, көптеген факторларына байланысты.

Барлық қорек орталары сапа бақылауынан өтуге тиіс және сынамалардың тиісті матрицасының қатысуымен шағын себілген қоздырғыштың өсуін ұстап тұруға тиіс. Бақылау штаммын рутинді сынамалармен қатар рутинді пайдалану дәл емес әдістерді пайдалану кезінде сынамалардың айқаспалы ластануына әкелуі мүмкін; сондықтан ең жоғары басымдылығы бар мақсатты штаммдарға ұқсас типтік өсу сипаттамалары бар сирек серотипін пайдалану керек.. Сондай-ақ микробқа қарсы препараттарға төзімділігі бар штаммаларды немесе флуоресценция сияқты басқа да маркерлерді пайдалануға болады.

Стандартты әдістің негізі Раппорт-Вассиладис (MSRV) модификацияланған жартылай қатты препаратында кейіннен байыта отырып және ксилоза-лизин-деоксихолатты агарда (КЖД-агар) бөлумен және таңдауға қосымша тілімшелі ортада буферленген пептонды суда алдын ала байыту болып табылады. Бұл әдіс мал азығын, қоршаған ортадан, жануарлардың өнімдері мен шикізаттарынан алынатын сынамаларды зерттеу үшін жоғары тиімді болып табылады.

#### 5.1.1 Алдын ала байыту ортасы

Аурудың жасырын түрі бар жануарлардың нәжістеріндегі, қоршаған ортадан алынған сынамаларындағы, жануарлардан алынатын азықтар мен азық-түлік өнімдеріндегі сальмонеллалардың мөлшері көп емес, әрі бөліп шығаруға ықпал ету үшін буферлік пептонды су сияқты алдын ала байыту үшін ортаны пайдалану қажет. Бұл сальмонеллалардың аз мөлшерін көбейтуге мүмкіндік береді, олар керісінше жағдайда байытудың селективті ортасының уытты әсерінен өлуі мүмкін және бұл қатыру, қыздыру, кептіру процесінен өткен немесе биоцидтердің немесе органикалық қышқылдардың әсерінен зақымданған сальмонеллаларды реанимациялауға көмектеседі.

#### 5.1.2. Байытудың селективтік қорек ортасы

Байытуға арналған орта қоспалардан тұратын сұйық немесе жартылай қатты агарлы ортаны білдіреді, олар бір мезгілде басқа бактериялардың өсуін тежей отырып, сальмонелдерге өсуге селективті мүмкіндік беретін. Селективті байыту ортасының мысалдары тетрационат, мысалы Мюллер-Кауфман ерітіндісі, селенистый цистин, жылтыр жасыл сұйығы, Раппорт-Вассиладис сұйығы және модификацияланған жартылай қатты Раппорт-Вассиладис (MRSV) агар болып табылады. Алайда кейбір қоспалар сальмонелланың кейбір сероварлары үшін салыстырмалы уытты, мысалы, селенит *S.Choleraesuis* тежейді, ал жылтыр жасыл көптеген *S.Dublin* штаммдар үшін



## ҚР СТ 3510-20119

уытты. Жоғары температура сондай-ақ селективтілікті арттыру үшін де пайдаланылады, бұл ретте кейбір зертханаларда температура 43 °С пайдаланылады, бірақ бұл кейбір орталарға, мысалы, тетрационат үшін кедергі болуы мүмкін. Раппапорт-Вассилиадис сұйығын 43°С температурада пайдаланған кезде температураға сезімтал штамдар, әсіресе S.Dublin бәсеңдетіледі және сонда Раппапорт-Вассилиадис сұйығы негізіндегі орталарды инкубациялау үшін 41,5 °С температура ұсынылады. MSRV немесе сальмонелланың диагностикалық жартылай қатты ортасы (DIASALM) сияқты селективті қозғалғыштықты байытуға арналған орта әдетте сальмонелланы бөлу процедурасының сезімталдығын арттыру үшін пайдаланылады. Кем дегенде екі байытылған ерітіндіні пайдалану ұсынылады, олардың біреуі 37 °С кезінде инкубацияланады, ал екіншісі - неғұрлым жоғары температурада қолайлы. Сондай-ақ ортаның құрамын, инкубациялау температурасы мен ұзақтығын, сондай-ақ қоздырғыштың бөліну жылдамдығына әсер етуі мүмкін ортаның инокуляциясы үшін пайдаланылатын сынамалардың көлемін назарға алу қажет. Сондай-ақ ферриоксамин Е сияқты әртүрлі қоспалар, мысалы, жұмыртқа, су немесе топырақ, немесе новобиоцин тәрізді антибиотиктер сияқты құрамында темір немесе қоректік заттар шектеулі үлгілерден сальмонелл бөліп алуды күшейту үшін, немесе Proteus сияқты грамоң микроорганизмдердің көпшілігін немесе басқа да грамтеріс бактерияларды басу үшін селективті байыту ортасына қосылуы мүмкін. Микробқа қарсы препараттарға төзімді сальмонеллалар штамдарының бөлінуін күшейту үшін антибиотиктер қосылуы мүмкін.

### 5.1.3 Селективті тілімшелі орта

Әртүрлі дәрежелерде әртүрлі өсу байқалатын қатты, селективті агарлар. Олар сальмонелладан басқа бактериялардың өсуін тежейді және кейбір негізгі дифференциалды биохимиялық сипаттамалар - әдетте лактозды ферментация емес және күкірт сутегін өндіру (H<sub>2</sub>S) туралы ақпарат береді. Нәтижелер 37°С-да еккеннен кейін 24 және 48 сағаттан кейін оқылады. Сальмонеллалар қоректік ортаның қабатындағы басқа бактериялардың колонияларынан, Proteus, Pseudomonas, Citrobacter және Hafnia ықтимал ерекшеліктерімен ерекшеленетін осындай орталарда тән колонияларды түзеді. Кейде лактозо-ферменттейтін сальмонеллалар бөлінеді, ал H<sub>2</sub>S өндіруі айнымалы болуы мүмкін. Мұндай атиптік штамдар жартылай қатты жылжымалы орталарды пайдалану кезінде неғұрлым тиімді анықталады. Осы орталардың селективтілігі қоздырғыштың қозғалуына, малахитті жасыл контраст пен новобиоцинді болуына, сондай-ақ магний хлоридінің жоғары концентрациясына байланысты. Жартылай қатты орта енгізу орнынан алыс өсу ореалдары түріндегі қозғалғыштықты анықтауға мүмкіндік береді. DIASALM ортасы атиптік штамдарды анықтау үшін аса пайдалы, өйткені поливалентті O, H немесе арнайы антисарсуды пайдалана отырып, заттық әйнекте агглютинация реакциясы тестісінің көмегімен болжалды растауды Петри тостағындағы қорек ортасының қабатындағы өсу аймағынан алынған сұйықтықтарға жүргізуге болады. Сондай-ақ дезоксихолатты цитратты агар (DCA), жылтыр жасылды (BGA) агар немесе Висмут-сульфит агар сияқты ыдыстағы қоректік ортаның қабаттары пайдаланылуы мүмкін, алайда оларда жалған оң колониялардың жоғары жиілігі бар екені расталды. Salmonella Abortusovis баяу өсіп келе жатқан сероварды білдіреді. Тостақтар әдетте 72 сағатқа дейін инкубацияланады және селективті емес қан агары пайдаланылады. Селективті пластинкалы орталардың мысалдары агары BGA, DCA агарлары, КЖД-агар және Висмут-сульфит агар болып табылады. Қазіргі уақытта Рамбах агар және SMID агар (сальмонелланы анықтау және анықтауға арналған агар) сияқты хромогенді агарлардың кең спектрі бар. Олардың көпшілігі күдікті колонияларды дифференциялауға көмектесе алады, бірақ типтік матрицаларға, мақсатты жүйелер мен сероварлар диапазонына тексерілуі тиіс, өйткені кейбір жағдайларда сезімталдық төмен болуы мүмкін. Brilliance немесе Rapid сияқты белгілі бір хромогенді агар орталары, алайда, биохимиялық атиптік сальмонеллаларды



анықтау үшін тиімдірек болады.

5.1.4 Тамақ өнімдерінің, азықтың, нәжістің және қоршаған ортаның сынамаларынан алынатын сальмонеллалар бөлуге арналған сынау процедурасы

а) қоршаған орта температурасы кезінде буферленген пептон суының  $\times 10$  көлеміне 10-25 г үлгі қосылады.

б)  $37^{\circ}\text{C}$  кезінде 16-20 сағат бойы буферлік пептонды суды инкубациялаңыз.

Ескертпе – Тегіне бейімделген серотиптер мен *arizonae* кейбір серотиптері үшін үлгіні селенит-цистин сұйығы сияқты селективтік қоректік байыту ортасына қосқан дұрыс және тін үлгілерін тестілеуді, бұл мүмкін болған жағдайда, Петри тостағында тікелей егуді қоса жүргізу;

в) 20 мл MSRV немесе DIASALM 0,1 мл инкубацияланған забуференделген пептон суы құйылған Петри тостағына енгізіледі.

г) 1 мл инкубацияланған буферлік пептонды су сұйығымен бірге 10 мл Мюллер-Кауфман тетрационатты сұйығы енгізіледі.

д) MSRV немесе DIASALM  $41,5^{\circ}\text{C}$  кезінде және тетрационатты сұйықтар  $37^{\circ}\text{C}$  кезінде инкубацияланады (тетрационаттың қолданылатын брендті жоғары беделге ие және  $37^{\circ}\text{C}$  кезінде қолдануға жарамды екеніне көз жеткізіледі).

е) 24 және 48 сағат селективті байытудан кейін хромогенді агар (мысалы, Рамбах агар) құйылған немесе новобиоцин қосылған жылтыр жасыл сұйықтықты агар құйылған бір тостаққа штрихпен еге отырып, лайланған өсу аймағының шетінен 1 мкл материал ілмегін алып, MSRV немесе DIASALM-ді егіледі.

ж) 10 мкл тетрационатты сұйығын хромогенді агар (мысалы, Рамбах агар) немесе жаңабиоцинді жылтыр жасылды агар құйылған бір тостаққа және КЛД-агар құйылған тостаққа егіледі.

и) Тостақтарды  $37^{\circ}\text{C}$  кезінде 24 сағат бойы инкубациялайды.

к) TSI, LDC және зэр сияқты аралас ортаны пайдалана отырып, КЛД-агарда бес күмәнді колонияға дейін (қызыл/жылтыр жасыл қосылған агарда орта қызарған қызғылт немесе шегі бозғылт таңқурай түстес немесе қызғылт сары/ Рамбах агарда түссіз, ортасы қара қызыл немесе кейде  $\text{H}_2\text{S}$  теріс штаммдар болған жағдайда жартылай мөлдір қызыл) тексеріңіз. Серотоптың деңгейін 'О' және 'Н' полиін (1-фаза және 2-фаза) антисарсуды немесе аралас биохимиялық ортаны қолдана отырып, растаңыз. Поливалентті сарысулармен, мысалы, *Citrobacter* spp айқаспалы реакцияларға байланысты бір серотоптау жеткіліксіз. Бірнеше есе биохимиялық тестлер растауды қамтамасыз ете алады.

л) Егер күмәнді колониялар, селективті емес ортада поли Н-антисарсумен агглютинацияланбаған жағдайда зерттеуді қайталау қажет. Егер поли-О және поли-Н күшті агглютинациясы алынған жағдайда, онда бұл растау болып табылады. Биохимиялық және серологиялық расталған изоляттар содан кейін серотиптеу үшін беріледі. Егер агглютинация нәтижелері түсініксіз болса, TSI сияқты аралас орталарды пайдалана отырып немесе ONPG (О-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид) және несеп нәрді пайдалана отырып, одан әрі биохимиялық зерттеулер жүргізу қажет.

5.25. Сандық анықтау әдісі

Патологиялық материалдан алынған сальмонелла Петри тостағына тікелей егу арқылы бөлінеді, бірақ ең ықтимал сан (ЕІС) әдісі нәжіс, жем немесе қоршаған орта сынамаларының үлгілері үшін қажет.

5.3 Болжамды колонияларды анықтау

Болжамды колониялар *Proteus* spp сияқты ықтимал ластағыштардың болмауына кепілдік беру үшін селективті және селективті емес агарларда субкультивацияланады. Егер болжамды колонияның мол таза өсуі байқалса, сальмонелланы типтейтін поливалентті антисыворотканың көмегімен заттық шыныда агглютинация реакциясы

## ҚР СТ 3510-20119

арқылы тексерілуі мүмкін. Кейбір жағдайларда күдікті колония агглютинациялануы немесе аутоагглютинацияламауы мүмкін және бірдейлігін растау үшін биохимиялық талдауларды қолдану қажет. Бұл әдістер пептонды су қанттарын немесе аралас орталарды (мысалы, организмдер скринингі үшін пайдаланылуы мүмкін үш қантты темір бар tsi ағары сияқты) пайдалана отырып орындалуы мүмкін. Микробқа қарсы препараттарға төзімділікті анықтау үшін пайдаланылатын сальмонелла екпелері мультирезистентті болып табылатын *Pseudomonas* сияқты басқа организмдермен араласпауын қамтамасыз ету қажет. MALDI-TOF сондай-ақ сальмонеллаларды сәйкестендірудің қолайлы әдісі болып табылады.

O-факторды және H-антигенін және ерекше жағдайларда Vi антигенін (*s.Typhi*, *s. Paratyphi C* және *s. Dublin*-ге бар) анықтау, заттық шыныда агглютинация реакциясының тікелей әдісі немесе арнайы антисворотканы пайдалана отырып, пробиркада агглютинация жолымен жүргізіледі. Екі фазалы организмдер болған жағдайда фазаның инверсиясын пайдалана отырып, екі фазаны анықтау қажет - бұл белгілі фазаға дейін антисарсудан тұратын жартылай қатты ағар арқылы өтуді қамтиды. Скрининг бірнеше факторларға қарсы бағытталған антисыворотканың болуына ықпал етеді, бұл моновалентті типті сарысуларды қолданумен жалғастырылады.

Қосымша биохимиялық тестер серотиптердің кейбір нұсқаларын сәйкестендіру үшін қажет болуы мүмкін, мысалы, *S. Paratyphi B var. Java* (*d-tartrate* +) бастап *S. Paratyphi B* дифференциациялау үшін пайдаланылатын *d-тартратты* егу. Изоляттар сондай-ақ антимикробты агенттер қатарына сезімталдығына тексерілуге тиіс, өйткені цефалоспориндер мен фторхинолондарға тұрақтылық гендерін көтеретін (тасымалданатын) көптеген тұрақты штаммдардың пайда болуына байланысты күннен күнге алаңдаушылық бар. Тірі вакциналық штамдар, сондай-ақ, әдетте, ауксотрофизм немесе кедір-бұдырлық сияқты микробқа қарсы препараттарға, биохимиялық өзгерістерге төзімділік маркерлері бойынша сәйкестендіріледі.

### 5.4 Нуклеин қышқылдарын иммунологиялық тану әдістері мен тану әдістері

Сальмонеллаларды анықтау әдістеріне иммуномагниттік бөліну (IMS), нақты уақыттағы кері транскриптазасы бар ПТР, иммуноферменттік талдау (ИФТ), нақты уақыттағы ПТР, сандық ПТР және микроматриялық талдау жатады. Бұл әдістер сальмонелланың нақты сероварларын сәйкестендіру үшін немесе үйірді немесе табынды зақымдайтын сальмонелла сероварларынан тірі вакцина штамдарын бөлу үшін пайдаланылады. Кейбіреулер екі кезеңді байыту және нақты уақытта ПТР сияқты әдістердің комбинацияларынан тұрады. Бұл әдістер тағамдық талдау үшін қолданылады. ИФТ немесе ПТР-дан байыту әдісі/иммуномагниттік бөліну әдісі сальмонеллез қоздырғышын 24 сағат ішінде анықтай алады. Осы әдістермен сальмонеллаларды тікелей анықтау мүмкін болмағандықтан, байытудың селективті емес немесе селективті сатылары талап етіледі.

## 6 Серологиялық әдістер

6.1 Ауру жұқтырған жануарларды, үйірлер мен табындарды серологиялық сәйкестендіру

Үй құстарының қанын зерттеу үшін боялған антиген және *S.Pullorum/Gallinarum* жұқтырған үйірлерді анықтау үшін агглютинация реакциясы (AP) қолданылады. *Pullorum/Gallinarum. S. Enteritidis* тобында *S.Pullorum/Gallinarum* сияқты D тобының соматикалық антигені болғандықтан, олардан шыққан деп саналады, *S.Enteritidis* диагностикалау үшін бүтін қан талдауын және оған байланысты талдауларды қолдануға болады, алайда сезімталдық төмен болады. Сондай-ақ үй құстарынан *S.Enteritidis* және *S.Typhimurium* инфекцияларын анықтау үшін *Enteritidis* және *S. ауыл*

шаруашылығы жануарларынан басқа да сероварларды диагностикалау үшін ИФТ қолданылады. ИФТ әдісі S.Dublin инфекциясының көзі ретінде ірі қара малды серологиялық сәйкестендіру үшін тиімді қолданылады және сүтті табындарға скрининг жасау мақсатында жиналған сүтті зерттеу үшін қолданылуы мүмкін. ИФТ сероварлар қоспасынан («қоспа-ИФА»), сарысудағы немесе мұздату жолымен бөлінетін жасуша сұйықтықтарындағы соматикалық антигендерді, содан кейін шошқада сальмонеллезді анықтау үшін бұлшықет үлгілерін ерітуді қамтиды. Ұқсас тест S.Enteritidis және S.Typhimurium антителоларды Enteritidis және S. егілмеген тауарлық жұмыртқалайтын тауық тобы жұмыртқасының сары белогынан анықтау үшін пайдаланылады.

#### 6.2 Серологиялық диагностикалауға әсер ететін факторлар

а) Табындарға жасалған қайталанған тестілер созылмалы ауру жануарларды селективті іріктеп алу үшін қосалқы құрал ретінде пайдаланылғанымен, серологиялық әдістерді жекелеген ауру жұқтырған малды бірдейлендіру үшін емес, ауру жұқтырған табындарды бірдейлендіру үшін пайдалану керек. Серологиялық тестер әдетте сероварлардың шектеулі шеңберін немесе сальмонелл серотоптарын анықтауға арналған.

б) Оң серологиялық реакциясы бар кейбір жануарлар сальмонеллезді жұқтырмауы мүмкін. Сальмонеллез ауруының ерте сатысындағы жануарлар серологиялық теріс реакцияларды көрсете алады, ал кейбір жекелеген ауру жұқтырған жануарлардың серологиялық ерекшелігінің түрі ешқашан өзгермейді. Серологиялық зерттеуден оң нәтижелер алған жануарлар сальмонеллаларды бөлмеуі мүмкін, бірақ айналмалы иммуноглобулиннің концентрациясы жоғары болуы мүмкін. Жануарлардағы серологиялық теріс нәтижелер иммуноглобулинді өндіру барынша көп немесе инвазивті сероварлары бар инфекция болғанға дейін экскреция тудыратын жуырдағы инфекцияның нәтижесі болуы мүмкін.

в) Жаңа туған жануарлар иммунологиялық жетілмеген болып табылады және 2-3 апталық жасқа дейінгі соматикалық липополисахаридті антигенге серологиялық әсер етпейді. Ірі қара мал 10-12 апталық жасқа дейін сезімтал болмауы мүмкін, ал сорғыш шошқаларда иммундық жауап дамымауы мүмкін немесе аналық иммунитетті көрсететін иммундық жауап болуы мүмкін. Тестілердің көпшілігі G класындағы иммуноглобулинге негізделген, ал антителолар деңгейінің жоғарылауы әдетте 1-3 аптадан кейін байқалады және 2-3 ай сақталады.

Балапандар сары қап арқылы өз ата-аналарынан сальмонеллаға қарсы антителоларды пассивті ала алады; бұл жұқтыру немесе ата-ана үйірін вакцинациялау көрсеткіші бола алады. Сүтқоректілер аналық антителоларды уыз арқылы ала алады.

г) Егер сальмонеллезге қарсы вакцинация жүргізілген жағдайда, онда вакцина штаммын далалық штаммынан дифференциациялауды жүргізу қажет.

д) Егер бактерияға қарсы ем жүргізілген жағдайда, серологиялық диагностикалау егуге қарағанда неғұрлым тиімді анықтау әдісі болып табылады.

е) 2600-ден астам түрлі сальмонелла сероварлары бар. Пайдаланылатын антиген мен тестке байланысты, әртүрлі сероварлар арасында серологиялық қарама-қайшы реакциялар туындауы мүмкін, мысалы, S. Typhimurium, S. Pullorum және S. Enteritidis. Кейбір жағдайларда қарама-қайшы реакциялар сальмонелланы қоспағанда, басқа патогенді бактериялардың әсерінің нәтижесінде пайда болуы мүмкін.

ж) Үй құстары арасында сальмонеллез қоздырғышының болуына скрининг ретінде жұмыртқаның сары уызын сальмонеллеге иммуноглобулиндердің болуына зерттейді. Ірі қара малдың арасында сүтті скрининг ретінде сүтті сальмонеллаға қарсы антителолардың болуына зерттейді.

и) Сарысуды жинау үшін сүзгіш қағаздан жасалған дискілерді пайдалану сарысуды бөлу қажеттілігін жояды. Дискілер сондай-ақ ұзақ сақтауды қамтамасыз етеді. Сынақтың сезімталдығы жаңа сарысуға жасалған тестермен салыстырғанда аздап төмендеуі мүмкін.



## ҚР СТ 3510-20119

### 6.3 Қан талдауы

Қанды талдау іш сүзегі мен пуллорозға тез диагностиканы қамтамасыз етеді. Талдаудың сезімталдығы төмен және жиі жалған оң және жалған теріс нәтиже береді.

### 6.4 Заттық шыныдағы агглютинация реакциясы

Сарысуды (0,02 мл) поливалентті боялған кристалды-күлгін антигенмен (0,02 мл) араластырады. Заттық шыны 2 минут бойы абайлап шайқалады, содан кейін реакция оқылады. Тест компоненттері 4°C температурада сақталады және пайдалану алдында бөлме температурасына жетуге тиіс.

Тест-сарысу құрамында ластанулар мен гемолиз болмауы тиіс. Белгілі бір уақыт кезеңі ішінде сақталған сарысудың үлгілерін центрифугалау қажет.

Егер спецификалық емес жалған оң реакцияларға күдік болса, оң/күмәнді сынамалар 56°C кезінде 30 минут ішінде термоинактивациялаудан кейін қайта жүргізілуі мүмкін.

### 6.5 Агглютинация реакциясы

Агглютинация реакциясын жүргізу кезінде стандартты сарысулар және осы антигендермен өндірілетін сарысуларға тәуелді емес РА антигендері препаратының тазалығы мен иммуногендігін бақылау үшін растайтын әдістер қолданылады. Бұл әдіс сальмонелланың әртүрлі серотиптерінің әсер етуін сәйкестендіру үшін қолданылады, мысалы Typhimurium, S. Enteritidis, S. Dublin, S. diarizonae у индекк и S. Abortusequi, S. серотиптері.

#### 6.5.1 Соматикалық антигенді дайындау

а) Сальмонелл өсіріндісі тиісті бастапқы өсіріндіден қан ағары негізінде пластинаға немесе басқа да бір колонияның өсуі үшін қолайлы ортаға бөлінеді. Инкубация 35 °C-ден 39 °C-қа дейінгі температурада түнде жүргізіледі.

б) Тегіс колонияны таңлады және қажетті соматикалық антиген бар екеніне көз жеткізу үшін шыныда агглютинация реакциясы жүргізіледі.

в) Зарарсыздандырылған ілмекті қолданып, таңдалған колонияны еңкейіп қоректік ағарға эмбебап контейнерде енгізіледі.

г) Өсірінді 35 °C-ден 39 °C-қа дейінгі температурада 8-12 сағат бойы инкубацияланады

д) Пастер тамшуырын пайдалана отырып, өсіріндіні ламинарлық шкафта шамамен 2 мл абсолютті спиртпен жуып, зарарсыздандырылған эмбебап контейнерге ауыстырылады.

е) Спирт бактерияларды жойып және талшықтарды бөліп алу үшін антигенді бөлме температурасында 4-6 сағатқа қалдырылады.

ж) Центрифугалау 1000 айналымда 5 минут ішінде эмбебап контейнерде үйірткілеу жүргізіледі. Сұйықтықты төгеді және антигенді мөлдір болмауы, № 2 Браун пробиркасына (шамамен 10 колония тұзуші бірлік/мл) немесе басқа тиісті стандартқа баламалы етіп жасауы үшін фенол тұз ерітіндісінің жеткілікті мөлшерін қосады.

и) Антиген қажетті реакция үшін оң екеніне көз жеткізу үшін белгілі сарысумен стандартты титрлеу жүргізіледі.

к) Тоңазытқышта 4°C температурада сақталады.

#### 6.5.2. антиген талшықтарын дайындау

а) Сальмонеллдің тиісті өсіріндісі қан ағарының негізінде тілімшеге немесе басқа да тиісті ортаға салынады. Инкубация 35 °C-ден 39 °C-қа дейінгі температурада түнде жүргізіледі.

б) Крейг пробиркасындағы немесе басқа сәйкес талшықты антигеннің оңтайлы экспрессиясының индукциясы үшін қолайлы контейнердегі жартылай қатты ағарадағы Пассаж (шамамен 0,3%). Егер серотип екі фазалы болса, ағарға берілетін фазаға сәйкес келетін Н антисыворотка қосылады.

в) Сальмонелла қажетті фазада екенін тексеру үшін шыныда агглютинацияны пайдаланыңыз. 20 мл қоректік сұйығына өсіріндісі бар ілмек енгізіледі. Оңтайлы өсу үшін



35 °С-тен 39 °С дейінгі температурада 12-18 сағат бойы инкубацияланады.

г) 250 мкл формальдегидтің 40% антиген суспензиясына енгізіледі және түнге қалдырылады.

д) Типтеу үшін тиісті сарысуды пайдалана отырып, РА көмегімен антигенді тексеріледі.

#### 6.5.3. Сынау процедурасы

а) 1/20 сұйылту кезінде сарысуларға скрининг жүргізу ұсынылады; 0,25 мл антигенді алдын ала 1/10 дейін физиологиялық ерітіндіде араластырылған 0,25 мл сарысуға қосады.

б) Сынамалар су моншасында 50°С кезінде 24 сағат бойы соматикалық антиген болса және егер талшықты антиген болса 4 сағат бойы инкубацияланады. Өсіру және инкубация уақыты пайдаланылған антисывороткаға байланысты өзгереді.

в) Оң реакция беретін сарысуларды содан кейін 1/20-дан 1/320-ға дейін араластырады және тиісті антигенмен қайта тестілейді.

#### 6.6 S. Enteritidis үшін қатты фазалы иммуносорбентті талдау.

S. Enteritidis үшін тән иммуноглобулинді G (IgY) анықтау үшін екі негізгі базальқ жүйелер қолжетімді: ИФА тікелей емес әдісі және бәсекелес ИФА «сэндвич-талдау».

Тікелей емес ИФТ микротитр пластинасының шұңқырына салынған антигенді пайдалануды қамтиды. Спецификалық емес байланыстыруды төмендету үшін бұғаттайтын реагентті жаққаннан кейін зерттелетін үлгілер шұңқырларға салынады. Үлгідегі арнайы байланысқан антидене антидене/энзим конъюгатымен анықталады.

Бәсекелес сэндвич ИФА-да арнайы реагент – моноклональды антидене немесе поликлональды антитело – шұңқырларды антигенмен жабу үшін қолданылады. Содан кейін таза немесе шикі антиген препаратын жағыңыз. Егер үлгіде арнайы антителолар болса, антигенмен байланыспайтын, кейіннен конъюгацияланған антителолар бар тест үлгілері қолданылады. Талдау уақыты тест үлгісін де, конъюгатты да қосу арқылы азаюы мүмкін. Моноклональды антителолар липосахарид, ширатпалар және S. Enteritidis үшін SEF14 үшін дайындалған Enteritidis.

Екі талдау да жалған оң нәтиже көрсетуі мүмкін, әрі кейбір жағдайларда липосахаридтің тікелей емес ИФТ скринингі талшықты бәсекелес ИФТ көмегімен растау арқылы қоса берілуі мүмкін. Бұл комбинация ширатпа антигендері жоқ S. Gallinarum 9P вакцинасына вакцина жауаптан s. Enteritidis далалық инфекциясын саралау үшін қолданылды.

Талдаудың екі түрі де сарысумен, жұмыртқа сарысымен немесе сүзгіш қағаз дискілерінен элюирленген кептірілген, қайта қалпына келтірілген қанмен пайдаланылуы мүмкін. ИФТ S. Typhimurium және S алынған 1, 4, 5, 6, 7 және 12 липосахаридтері-О бар антигендерді қамтиды. Choleraesuis-нен алынған, бұл көптеген еуропалық елдерде шошқадан табылған сальмонелл серотоптарын 95%-ға дейін серологиялық анықтауға мүмкіндік береді.

ИФТ көмегімен әртүрлі серотоптардан сальмонелл сероварлары шығаратын инфекциялар арасында дифференциация жүргізуге болады. Кейбір айқас реакциялар Б және Д топтары мен басқа инвазивті сероварлар арасында орын алады.

#### 6.6.1 Жабдықтар

ПВХ тақталары; тиісті тамшуырлар және өлшеуіш цилиндрлер; Микротілімше; ИФТ планшет ридер; 405-410 Нм тестілік сүзгісі және эталон сүзгі, 630 Нм.

#### 6.6.2 Антиген

S. Enteritidis фенолмен шайғындалған 1 мл деиондалған суға қалпына келтіреді және -20°С кезінде фосфат-тұздық буферінде (ФСБ), рН 7,2, 2,5 мг/мл концентрациясында 100 мкл аликвоттарда сақтайды. Антигендерді пайдалану үшін тиісті концентрацияда отырғызу буферінде ерітіледі.

#### 6.6.3 Сарысулық және конъюгатты сұйылтқыш



## ҚР СТ 3510-20119

FSB (100 мл) бұқа альбуминін (BSA) (2 г) және Твин 20 (0,05 мл) қосыңыз. (БСА құрғақ сүтпен ауыстыруға болады 1 г) 4°C кезінде сақтауға болады, жаңа ерітінділерді аптасына 1 рет дайындауға болады.

а) Отырғызу буфері

деиондалған суға натрий карбонаты (1,59 г) және натрий бикарбонаты (2,93 г) қосылады (1 л) және рН 9,6 дейін реттеледі. 4 °С кезінде сақталады және 2 аптада бір рет жаңартылады.

б) Субстратты буфер

Деиондалған суда диэтаноламиннің 10% ерітіндісі дайындалады. Диэтаноламин мөлшерлеу алдында 37°C дейін алдын ала қыздырылуы тиіс, ал ерітіндінің рН-ы 1 м тұз қышқылының көмегімен 9,8 дейін реттелуі тиіс. 4°C сақталады және 2 аптада бір рет жаңартылады.

в) Фермент конъюгаты

Сілтілі фосфатазамен немесе анти-тауық глобулиннің басқа түрлерімен конъюгирленген ешкі анти-тауық иммуноглобулині. 4°C кезінде тиісті концентрациядағы сұйылтқышта сақталады және аптасына бір рет жаңартылады.

г) Фермент субстраты

) П-нитрофенилфосфат динатрий (5 мг) бір таблеткасы дозаланғанға дейін 30 минут бұрын субстрат буферінде ертіледі және қараңғыда сақталады.

### 6.7 Стандарттар

а) Құрамында 106 s.Enteritidis бар арнайы патогенсіз 1 апталық балапандарға бұлшықетішілік инъекция жолымен дайындалған оң бақылаудың антисывотротка. Атитело титрлары максимальды болғанда сарысу 3-4 аптадан кейін алынады.

б) Ерекше патогенсіз төрт апталық құстардан алынған А теріс бақылау сарысуы.

в) Сальмонеллез жұқтырмаған 1 апталық мал өндірушілерден алынған В теріс бақылау сарысуы. Сарысулар біріктіріледі және 20°C температурада 100 мкл көлемінде сақталады.

---

ӘОЖ 636.2

МСЖ 65.020.30 (NEQ)

**Түйін сөздер:** Сальмонеллез, зертханалық әдіс, агентті сәйкестендіру, серологиялық тестлер

---



## НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

---

**Животные**

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА**

**СТ РК 3510-2019**

*(Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Salmonellosis, chapter 3.9.8, 2018, NEQ)*

**Издание официальное**

**Комитет технического регулирования и метрологии  
Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан  
(Госстандарт)**

**Нур-Султан**



## Предисловие

### 1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН ТОО «Elit Art»

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от 11 декабря 2019 г. № 457-од.

**3** Настоящий стандарт разработан с учетом Руководства Международного эпизоотического бюро «Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Salmonellosis, chapter 3.9.8, 2018 (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных» Международное Эпизоотическое Бюро (МЭБ), Сальмонеллез, глава 3.9.8), 2018»

Степень соответствия – неэквивалентная (NEQ).

Перевод с английского языка - (en).

**4** В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан «О стандартизации» от 5 октября 2018 года № 183-VI

### 5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений и поправок - в периодически издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты»*

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан





## НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## Животные

## МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА

Дата введения 2020-07-01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает методы лабораторной диагностики сальмонеллеза.

Сальмонеллез является инфекционным заболеванием людей и животных, характеризующимся септициемией, острым или хроническим энтеритом. Животные могут болеть без проявления клинических симптомов. Сальмонеллы - кишечные бактерии, которые могут выделяются через кал, контаминируя окружающую среду.

Род *Salmonella* состоит только из двух видов: *S. enterica* и *S. bongori*. *Salmonella enterica* подразделяется на шесть подвидов, которые отличаются определенными биохимическими характеристиками и склонностью к лизису бактериофагом Felix O1. Данные подвиды:

Оригинальный подрод		Текущая номенклатура
Подвид I	=	подвид <i>enterica</i>
Подвид II	=	подвид <i>salamae</i>
Подвид IIIa	=	подвид <i>arizonae</i>
Подвид IIIb	=	подвид <i>diarizonae</i>
Подвид IV	=	подвид <i>houtenae</i>
Подвид VI	=	подвид <i>indica</i>

Серотипы *S. bongori* обозначаются символом V для того, чтобы отличать их от серотипов подвида *S. enterica subsp. enterica*.

Штаммы *Salmonella* классифицируются на серотипы на основе обширного разнообразия липополисахаридных (LPS) или O-антигенов и жгутикового белка или H-антигенов в соответствии со схемой Уайта-Кауфманна-Ле Минора; в настоящее время обнаружено более 2600 серотипов. Наиболее распространенные серотипы, вызывающие заболевание у людей и животных, относятся к подвиду *enterica*.

**2 Сокращения**

**Бычий альбумин; БСА**

**Дезоксихолатный цитратный агар; DCA**

**Диагностическая полутвердая среда сальмонеллы; DIASALM**

**Иммуномагнитное разделение; IMS**

**Иммуноферментный анализ; ИФА**

**Ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар; КЛД-агар**

**Метод наиболее вероятной численности; НВЧ**



## СТ РК 3510-2019

**Модифицированный полутвердый препарат Раппорта-Вассилиадиса; MSRV**  
**Полимеразная цепная реакция; ПЦР**  
**Реакция агглютинации; РА**  
**Фосфатносолевой буфер; ФСБ**

### 3 Общие положения

3.1 Диагностика сальманеллеза заключается в выделении возбудителя и его идентификации в одной из реакций.

3.2. Диагноз на сальманеллез устанавливается на основании результатов исследования, анализа эпизоотологических и клинических данных, а также патологоанатомических изменений.

### 4 Методы диагностики

**Таблица 1 – Методы исследования для диагностики сальмонеллы и их цели**

Метод	Цель					
	Популяция свободная от инфекции	Индивидуальные животные свободные от инфекции перед перемещением	Содействие политике ликвидации	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции - наблюдение	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация агента</b>						
Выделение сальмонеллы	+++	+++	+++	+++	+++	н.п
ПЦР	+	+	+	+	+	н.п
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
РА	++	-	++	-	+	++
ИФА	++	-	+++	+	++	+
<p>+++ = рекомендуемый метод;            ++ = подходящий метод;            + = может использоваться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы серьезно ограничивают его применение;            - = не подходит для этой цели;            н.п = не применимо.</p> <p>Примечание – Хотя не все методы, перечисленные в категории +++ или ++, прошли формальную проверку, их рутинный характер и тот факт, что они широко используются без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.</p> <p>ПЦР = полимеразная цепная реакция;            РА= реакция агглютинации;            ИФА = иммуноферментный анализ;</p>						

## 5 Идентификация агента

Пробы для бактериологических исследований отбираются в асептических условиях до начала лечения антибиотиками. Пробы отбираются во время острой фазы заболевания или падежа животного. Если животные мелкие, то желательно доставить полностью его труп.

Особое внимание следует уделить выделению сальмонелл у животных с латентной формой заболевания, поскольку они могут выделять бактерии периодически и в небольших количествах. Большой размер выборки, большое количество проб, в сочетании с объединением проб и повторных выборок может обеспечить высокий уровень диагностики сальмонеллеза. Бактериологические, а также серологические методы могут использоваться для идентификации зараженных стай или стад, но не для идентификации отдельных зараженных животных.

### 5.1. Культивирование

Методы культивирования и среды, которые могут лучше всего работать в конкретной диагностической ситуации, зависят от множества факторов, включая серотип сальмонеллы, источник и тип образцов, вид животного, опыт микробиолога, а также доступность селективного обогащения и селективной пластинчатой среды.

Все питательные среды должны подвергаться контролю качества и должны поддерживать рост возбудителя из небольшого посева в присутствии соответствующей матрицы проб. Рутинное использование контрольного штамма параллельно с рутинными пробами может привести к перекрестному загрязнению проб при использовании неточных методов; поэтому следует использовать редкий серотип с типичными характеристиками роста, которые аналогичны целевым штаммам с наивысшим приоритетом. Также можно использовать штаммы с устойчивостью к противомикробным препаратам или другие маркеры, такие как флуоресценция.

Основой стандартного метода является предварительное обогащение в забуференной пептонной воде с последующим обогащением на модифицированном полутвердом препарате Раппапорта-Вассилиадиса (MSRV) и выделением на ксилоза-лизин-деоксихолатном агаре (КЖД-агар) и дополнительной пластинчатой среде на выбор. Данный метод является высокоэффективным для исследования кормов животного происхождения, проб из окружающей среды, продукции и сырья животного происхождения.

#### 5.1.1. Среда предварительного обогащения

Количество сальмонелл в фекалиях у животных с латентной формой заболевания, пробах из окружающей среды, кормах животного происхождения и продуктах питания невелико, и необходимо использовать среду для предварительного обогащения, такую как забуференная пептонная вода, чтобы способствовать выделению. Это может позволить размножиться небольшому количеству сальмонелл, которые в противном случае могут погибнуть из-за токсического эффекта селективной среды обогащения, и это может помочь реанимировать сальмонеллы, которые были повреждены замораживанием, нагреванием, высушиванием или воздействием биоцидов либо органических кислот.

#### 5.1.2. Селективная питательная среда обогащения

Среда для обогащения представляет собой жидкую или полутвердую агаровую среду, содержащую добавки, которые селективно позволяют сальмонеллам расти, одновременно ингибируя рост других бактерий. Примерами селективных сред обогащения являются тетрационат, раствор Мюллера-Кауфмана, селенистый цистин, бульон с бриллиантовым зеленым, бульон Раппапорта-Вассилиадиса и модифицированный полутвердый агар Раппапорта-Вассилиадиса (MRSV). Однако некоторые добавки относительно токсичны для некоторых серотипов сальмонеллы,

## СТ РК 3510-2019

например, селенит ингибирует *S. Choleraesuis*, а бриллиантовый зеленый токсичен для многих штаммов *S. Dublin*. Повышенные температуры также используются для повышения селективности, при этом в некоторых лабораториях используется температура 43 °С, хотя это может быть препятствием для некоторых сред, например для тетрационата. При использовании бульона Раппапорта-Вассилиадиса при температуре 43 °С чувствительные к температуре штаммы, особенно *S. Dublin*, подавляются, и тогда рекомендуется температура в 41,5 °С для инкубации сред на основе бульона Раппапорта-Вассилиадиса. Среды для обогащения селективной подвижности, такие как MSR/V или диагностическая полутвердая среда сальмонеллы (DIASALM), обычно используются для повышения чувствительности процедуры выделения сальмонеллы. Рекомендуется использовать как минимум два обогащенных раствора, один из которых инкубируется при 37 °С, а другой - при подходящей более высокой температуре. Необходимо также принимать во внимание состав среды, температура и продолжительность инкубации, а также объем проб, используемых для инокуляции среды, которые могут повлиять на скорость выделения возбудителя. Также могут быть добавлены различные добавки такие как ферриоксамин Е в селективную среду обогащения для усиления выделения сальмонелл из образцов с ограниченным содержанием железа или питательных веществ, таких как яйца, вода или почва, или антибиотики, такие как новобиоцин, для подавления большинства грамположительных микроорганизмов или других грамотрицательных бактерий, таких как *Proteus*. Возможно добавление антибиотиков для усиления выделения устойчивых к противомикробным препаратам штаммов сальмонеллы.

### 5.1.3. Селективная пластинчатая среда

Твердые, селективные агары, на которых проявляется различный рост в разных степенях ингибируют рост бактерий, отличных от сальмонелл, и дают информацию о некоторых основных дифференциальных биохимических характеристиках - обычно не лактозной ферментации и производства сероводорода ( $H_2S$ ). Результаты считывают через 24 и 48 часов после культивирования при 37 °С. Сальмонеллы образуют характерные колонии на таких средах, которые обычно отличаются от колоний других бактерий на слое питательной среды, с возможными исключениями *Proteus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* и *Haefnia*. Иногда выделяют лактозо-ферментирующие сальмонеллы, а выработка  $H_2S$  может быть переменной. Такие атипичные штаммы могут быть более эффективно обнаружены при использовании полутвердых подвижных сред. Селективность этих сред зависит от подвижности возбудителя, наличия малахитового зеленого контраста и новобиоцина, а также высокой концентрации хлорида магния. Полутвердая среда позволяет определять подвижность в виде ореолов роста вдали от места введения. Среда DIASALM особенно полезна для обнаружения атипичных штаммов, поскольку предполагаемое подтверждение с помощью метода реакции агглютинации на предметном стекле с использованием поливалентной О, Н или специфической антисыворотки можно проводить на жидкости из зоны роста в слое питательной среды в чашке Петри. Также могут быть использованы слои питательной среды в чашке, такие как дезоксихолатный цитратный агар (DCA), агар с бриллиантовым зелёным (BGA) или Висмут-сульфит агар, однако подтверждено, что у них более высокая частота ложноположительных колоний. *Salmonella Abortusovis* представляет собой медленно растущий серотип. Чашки обычно инкубируются до 72 часов и используется неселективный кровяной агар. Примерами селективных пластинчатых сред являются агары BGA, DCA, КЛД-агар и Висмут-сульфит агар. В настоящее время доступен широкий спектр хромогенных агаров, таких как Рамбах агар и SMID агар (агар для обнаружения и идентификации сальмонелл). Многие из них могут помочь дифференциации подозрительных колоний, но должны быть проверены на типовые матрицы, целевые системы и диапазон серотипов, так как чувствительность в некоторых обстоятельствах может быть низкой. Определенные хромогенные агаровые

среды, такие как Brilliance или Rapid, могут, однако, быть более эффективными для обнаружения биохимически атипичных сальмонелл.

5.1.4. Процедура испытания для выделения сальмонелл из проб пищевых продуктов, кормов, фекалий и окружающей среды

а) Добавляется 10-25 г пробы к ×10 объему забуференной пептонной воды при температуре окружающей среды.

б) Инкубируется забуференная пептонная вода в течение 16-20 часов при 37 °С.

Примечание - Для многих адаптированных к хозяину серотипов и некоторых серотипов arizonae предпочтительно добавлять пробу в селективную питательную среду обогащения, такую как селенит-цистиновый бульон, и проводить тестирования образцов ткани, когда это возможно включая прямое высевание на чашку Петри;

в) Вводится 20 мл MSR/V или DIASALM в чашку Петри с 0,1 мл инкубированной забуференной пептонной воды.

г) Вводится 10 мл тетраэтилатного бульона Мюллера-Кауфмана с 1 мл инкубированного забуференного пептонного водного бульона.

д) Инкубируется MSR/V или DIASALM при 41,5 °С и тетраэтилатные бульоны при 37 °С (убеждаются, что используемый бренд тетраэтилата, обладает высокой репутацией и подходит для использования при 37 °С).

е) После 24 и 48 часов селективного обогащения высевается MSR/V или DIASALM, взяв 1 мкл петли материала с края мутной зоны роста, делая посев штрихом на одну чашку с хромогенным агаром (например, Рамбах агар) или с агаром с бриллиантовым зелёным с новобиоцином и на одну чашку с КЛД-агаром.

ж) Высевается 10 мкл тетраэтилатного бульона на одну чашку хромогенного агара (например, Рамбах агар) или с агаром с бриллиантовым зелёным с новобиоцином и на чашку с КЛД-агаром.

и) Инкубируются чашки при 37 °С в течение 24 часов.

к) Проверяется до пяти подозрительных колоний (красный/розовый с покраснением среды на агаре с бриллиантовым зелёным, малиновый с бледными границами или оранжевый/бесцветный на Рамбах агаре, красный с черным центром (или иногда полупрозрачный красный в случае отрицательных штаммов H<sub>2</sub>S) на КЛД-агаре биохимически, используя комбинированные среды, такие как TSI, LDC и мочевины, или коммерческие биохимические методы. Подтверждается уровень серогруппы, используя поли «О» и поли «Н» (фаза 1 и фаза 2) антисыворотку или комбинированную биохимическую среду. Одного серогруппирования недостаточно из-за перекрестных реакций с поливалентными сыворотками, например, Citrobacter spp. Многократные биохимические методы могут обеспечить подтверждение.

л) В случае если подозрительные колонии не агглютинируют с поли Н-антисывороткой на неселективных средах, необходимо повторить исследование. В случае если получена сильная агглютинация поли-О и поли-Н, то это является подтверждением. Биохимически и серологически подтвержденные изоляты могут быть затем переданы для серотипирования. Если результаты агглютинации неясны, необходимо провести дальнейшие биохимические исследования с использованием комбинированных сред, таких как TSI, или с использованием ONPG (О-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид) и мочевины.

## 5.2. Метод количественного определения

Сальмонелла из патологического материала может быть выделена путем прямого высевания на чашку Петри, однако метод наиболее вероятной численности (НВЧ) необходим для проб фекалий, кормов или окружающей среды.

## 5.3. Выявление предполагаемых колоний



## СТ РК 3510-2019

Предполагаемые колонии субкультивируются на селективных и неселективных агарах, чтобы гарантировать отсутствие возможных загрязнителей, таких как *Proteus spp.* Если наблюдается обильный чистый рост предполагаемых колонии могут быть проверены путем реакции агглютинации на предметном стекле с помощью поливалентной антисыворотки, типизирующей сальмонеллу. В некоторых случаях подозреваемая колония может не агглютинировать или аутоагглютинировать, и для подтверждения идентичности необходимо использовать биохимические анализы. Эти методы могут быть выполнены с использованием пептонных водных сахаров или комбинированных сред (таких как трехсахарный железосодержащий агар TSI, которые могут использоваться для скрининга организмов. Необходимо обеспечить, чтобы культуры сальмонеллы, используемые для определения устойчивости к противомикробным препаратам, не смешивались с другими микроорганизмами, такими как *Pseudomonas*, которые являются мультирезистентными. MALDI-TOF также является приемлемым методом идентификации сальмонелл.

Определение О-фактора и Н-антигена и, в особых случаях, антигена Vi (присутствующего в *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* и *S. Dublin*), проводят путем прямого метода реакции агглютинации на предметном стекле или агглютинации в пробирке, используя специфическую антисыворотку. В случае двухфазных организмов необходимо определить обе фазы, используя инверсию фазы - это включает прохождение через полутвердый агар, содержащий антисыворотку, до известной фазы. Скринингу способствует наличие антисывороток, направленных против нескольких факторов, что может быть продолжено применением сывороток моновалентного типа.

Дополнительные биохимические методы могут быть необходимы для идентификации некоторых вариантов серотипов, например, культивирование d-тартрата, которое можно использовать для дифференциации *S. Paratyphi B var. Java* (d-tartrate +) от *S. Paratyphi B*. Изоляты также должны быть проверены на их чувствительность к ряду антимикробных агентов, поскольку существует растущая обеспокоенность по поводу появления новых множественных устойчивых штаммов, несущих (переносящих) гены устойчивости к цефалоспорином и фторхинолонам. Живые вакцинные штаммы также идентифицируются по маркерам устойчивости к противомикробным препаратам, биохимическим изменениям, таким как ауксотрофизм или шероховатость.

5.4. Иммунологические методы распознавания и методы распознавания нуклеиновых кислот

К методам обнаружения сальмонелл относятся иммуномагнитное разделение (IMS), ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени, иммуноферментный анализ (ИФА), ПЦР в реальном времени, количественная ПЦР и микроматричный анализ. Эти методы могут использоваться для идентификации конкретных серотипов сальмонеллы или для выделения живых вакцинных штаммов от серотипов сальмонеллы, заражающих стаи или стада. Некоторые состоят из комбинации методов, таких как двухэтапное обогащение и ПЦР в реальном времени. Эти методы используют для анализа пищевых продуктов. Метод обогащения/метод иммуномагнитного разделения с ИФА или ПЦР может выявить возбудителя сальмонеллеза в течение 24 часов. Поскольку данными методами невозможно прямое выявление сальмонелл, требуются неселективные или селективные стадии обогащения.

## 6. Серологические методы

### 6.1. Серологическая идентификация зараженных животных, стай и стад

Для исследования крови домашней птицы используется окрашенный антиген, и реакция агглютинации (РА) с целью выявления стай, зараженных *S. Pullorum/Gallinarum*.

Поскольку *S. Enteritidis* обладает тем же соматическим антигеном группы D, что и *S. Pullorum/Gallinarum*, и считается, что он происходит от них, для диагностики *S. Enteritidis* можно использовать анализ цельной крови и связанные с ним анализы, однако чувствительность будет низкая. Также используется ИФА для диагностики инфекций *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* у домашней птицы и для диагностики других серотипов у сельскохозяйственных животных. Метод ИФА эффективно используется для серологической идентификации крупного рогатого скота как источника инфекции *S. Dublin* и может применяться для исследования сборного молока для скрининга молочных стад. ИФА включает соматические антигены из смеси серотипов («смесь-ИФА»), на сыворотке или тканевой жидкости, выделяемой путем замораживания, а затем оттаивания мышечных проб для обнаружения сальмонеллеза у свиней. Аналогичный метод может быть использован для выявления антител к *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* в яичном желтке от не привитых товарных стад-несушек.

#### 6.2. Факторы, влияющие на серологическую диагностику

а) Серологические методы следует использовать для идентификации зараженных стай/стад, а не для идентификации отдельных зараженных животных, хотя повторные методы у стада могут использоваться в качестве вспомогательного средства для селективной выбраковки хронически больных животных. Серологические методы предназначены для обнаружения ограниченного круга серотипов или серогрупп сальмонелл.

б) Некоторые животные с положительной серологической реакцией могут не заражаться сальмонеллезом. Животные на ранних стадиях заболевания сальмонеллеза могут показывать серологически отрицательные реакции, а у некоторых отдельных инфицированных животных никогда не видоизменяется серологическая специфичность. Животные с положительными результатами серологического исследования могут не выделять сальмонеллы, хотя концентрация циркулирующего иммуноглобулина может оставаться высокой. Серологически отрицательные результаты у животных могут быть результатом недавней инфекции, вызывающей экскрецию до того, как выработка иммуноглобулина будет максимальной, или инфекцией с менее инвазивными серотипами.

в) Новорожденные животные являются иммунологически незрелыми и не реагируют серологически на соматический липополисахаридный антиген до 2-3 недельного возраста. Крупный рогатый скот может быть невосприимчивым примерно до 10-12 недельного возраста, а у сосущих свиней может не развиваться иммунный ответ или может возникнуть иммунный ответ, который отражает материнский иммунитет. Большинство методов основаны на иммуноглобулине класса G, а повышение уровня антител обычно проявляется через 1-3 недели после заражения и держится 2-3 месяца.

Цыплята могут пассивно приобретать антитела против сальмонеллы от своих родителей через желточный мешок; это может служить показателем зараженности или вакцинации родительской стаи. Млекопитающие могут приобретать материнские антитела через молозиво.

г) В случае если проводится вакцинация против сальмонеллеза необходимо проведение дифференциации вакцинного штамма от полевого штамма.

д) В случае если проводили антибактериальную терапию серологическая диагностика более эффективный метод выявления, чем культивирование.

е) Существует более 2600 различных серотипов сальмонелл. В зависимости от используемого антигена и метода могут возникнуть серологические перекрестные реакции между различными серотипами, например, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum* и *S. Enteritidis*. В некоторых случаях перекрестные реакции могут также возникать в результате воздействия других патогенных бактерий, кроме сальмонеллы.

ж) В качестве скрининга на наличие возбудителя сальмонеллеза среди домашней

## СТ РК 3510-2019

птицы исследуют яичный желток на наличие иммуноглобулинов к сальмонелле. Среди крупного рогатого скота молоко в качестве скрининга исследуют молоко на наличие антител против сальмонеллы.

и) Использование дисков из фильтровальной бумаги для сбора сыворотки устраняется необходимость отделения сыворотки. Диски также обеспечивают длительное хранение. Чувствительность метода может быть снижена по сравнению с методами, проводимыми на свежей сыворотке.

### 6.3. Анализ крови

Анализ крови обеспечивает быструю диагностику на брюшной тиф и пуллороз. Чувствительность анализа низкая, и часто дает ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

### 6.4. Реакция агглютинации на предметном стекле

Сыворотка (0,02 мл) смешивается с поливалентным окрашенным кристаллически-фиолетовым антигеном (0,02 мл). Предметное стекло встряхивается осторожно в течение 2 минут, после чего считывается реакция. Тестовые компоненты хранятся при температуре 4 °С и должны достигнуть комнатной температуры перед использованием.

Тест-сыворотка не должна содержать загрязнений и гемолиза. Необходимо центрифугировать образцы сыворотки, которые хранились в течение определённого периода времени.

Если есть подозрения на неспецифические ложноположительные реакции, положительные/подозрительные пробы могут быть повторно исследованы после термоинактивации при 56 °С в течение 30 минут.

### 6.5. Реакция агглютинации

При проведении реакции агглютинации (РА) используются стандартные сыворотки и подтверждающие методы для контроля качества чистоты и иммуногенности препарата антигенов РА, которые не зависят от сывороток, продуцируемых этими антигенами. Этот метод используется для идентификации воздействия различных серотипов сальмонеллы, например, серотипов *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. diarizonae* у индеек и *S. Abortusequi*.

#### 6.5.1. Подготовка соматического антигена

а) Выделяется культура сальмонелл из соответствующей исходной культуры на пластину на основе кровяного агара или другую подходящую среду для роста одной колонии. Проводится инкубация в течение ночи при температуре от 35 °С до 39 °С.

б) Выбирается гладкая колония и проводится реакция агглютинации на стекле для подтверждения наличия необходимого соматического антигена.

в) Используя стерильную петлю, вводится выбранная колония под наклоном в питательный агар в универсальном контейнере.

г) Культура инкубируется течение 8-12 часов при температуре от 35 °С до 39 °С.

д) Используя пипетку Пастера, культуру вымывается, предпочтительно в ламинарном шкафу, примерно с 2 мл абсолютного спирта и переносится в стерильный универсальный контейнер.

е) Антиген оставляется на 4-6 часов при комнатной температуре для того, чтобы спирт мог уничтожить бактерии и отделить жгутики.

ж) Проводится центрифугирование в универсальном контейнере в течение 5 минут при 1000 оборотах. Жидкость сливается и добавляется достаточное количество фенольного солевого раствора, чтобы сделать антиген непрозрачным, эквивалентным пробирке Брауна № 2 (приблизительно 10 колониеобразующих единиц/мл) или другому соответствующему стандарту.

и) Проводится стандартное титрование известной сывороткой для подтверждения того, что антиген является положительным для требуемой реакции.



к) Храниться в холодильнике при температуре 4 °С.

#### 6.5.2. Подготовка жгутикового антигена

а) Соответствующая культура сальмонелл помещается на пластину на основе кровяного агара или другую соответствующую среду. Проводится инкубация в течение ночи при температуре от 35 °С до 39 °С.

б) Пассаж в полутвердом агаре (около 0,3 %) в пробирке Крейга или другом подходящем контейнере для индукции оптимальной экспрессии соответствующего жгутикового антигена. Если серотип является двухфазным, в агар добавляется антисыворотка Н, соответствующей подавляемой фазе.

в) Используется агглютинация на стекле для подтверждения того, что сальмонелла находится в необходимой фазе. Вводится петля с культурой в 20 мл питательного бульона. Инкубируется в течение 12-18 часов при температуре от 35 °С до 39 °С для оптимального роста.

г) Вносится 250 мкл 40 % формальдегида в суспензию антигена и оставляется на ночь.

д) Проверяется антиген с помощью РА, используя соответствующую сыворотку для типирования.

#### 6.5.3. Процедура испытания

а) Рекомендуются проводить скрининг сывороток при разведении 1/20; 0,25 мл антигена добавляют к 0,25 мл сыворотки, предварительно разведенной до 1/10 в физиологическом растворе.

б) Пробы инкубируют на водяной бане при 50 °С в течение 24 часов если соматические антигены и в течение 4 часов если жгутиковые антигены. Разведение и время инкубации может варьироваться в зависимости от используемой антисыворотки.

в) Сыворотки, которые дают положительную реакцию, затем разбавляются от 1/20 до 1/320 и повторно тестируются с соответствующим антигеном.

#### 6.6. Твердофазный иммуносорбентный анализ для S. Enteritidis

Для обнаружения иммуноглобулина G (IgY), специфичного для S. Enteritidis, доступны две основные базовые системы: непрямой метод ИФА и конкурентный "сэндвич-анализ" ИФА.

Непрямой ИФА включает в себя использование обнаруживающего антигена, нанесенного на лунки пластины микротитра. После нанесения блокирующего реагента для снижения неспецифического связывания, исследуемые образцы наносятся на лунки. Специфически связанное антитело в образце обнаруживается конъюгатом антитела/энзимы.

В конкурентном сэндвич ИФА используется специфический реагент-моноклональное антитело или поликлональное антитело – для покрытия лунок антигеном. Затем наносится чистый или сырой антигенный препарат. Применяются тестовые образцы с последующим конъюгированным антителом, которое не будет связываться с антигеном, если образец содержит специфические антитела. Время анализа может быть сокращено путем добавления как тестового образца, так и конъюгата. Моноклональные антитела подготовлены для липосахаридов, жгутиков и SEF14 для S. Enteritidis.

Оба анализа могут показывать ложноположительные результаты, и в некоторых случаях скрининг с непрямым ИФА липосахаридов может сопровождаться подтверждением с помощью жгути конкурентного ИФА. Эта комбинация используется для дифференциации полевой инфекции S. Enteritidis от вакцинного ответа на вакцину S. Gallinarum 9P, в которой отсутствуют жгутиковые антигены.

Оба типа анализа могут быть использованы с сывороткой, яичным желтком или восстановленной высушенной кровью, элюированной из дисков фильтровальной бумаги. ИФА содержит антигены 1, 4, 5, 6, 7 и 12 липосахаридов-О из S. Typhimurium и S.

## СТ РК 3510-2019

*Choleraesuis*, что позволяет серологически выявлять до 95 % серогрупп сальмонелл, обнаруженных у свиней в большинстве европейских стран.

С помощью ИФА можно провести дифференциацию между инфекциями, продуцируемыми серотипами сальмонелл из разных серогрупп. Некоторые перекрестные реакции происходят между группами Б и Д и другими инвазивными серотипами.

### 6.6.1. Оборудование

Плиты ПВХ; соответствующие пипетки и мерные цилиндры; Микропластина; ИФА планшет ридер; тестовый фильтр 405-410 Нм и эталонный фильтр, 630 Нм.

### 6.6.2. Антиген

Экстрагированный фенолом *S. Enteritidis* восстанавливается в 1 мл деионизированной воды и хранят при минус 20 °С в аликвотах по 100 мкл в фосфатносолевом буфере (ФСБ), рН 7,2, в концентрации 2,5 мг/мл. Для использования антиген размораживается в посадочном буфере в соответствующей концентрации.

### 6.6.3. Сывороточный и конъюгатный разбавитель

Добавляется бычий альбумин (БСА) (2 г) и Твин 20 (0,05 мл) к ФСБ (100 мл). (БСА можно заменить сухим молоком 1 г) Хранится при 4 °С, свежие растворы можно изготавливать 1 раз в неделю.

#### а) Посадочный буфер

Добавляется карбонат натрия (1,59 г) и бикарбонат натрия (2,93 г) к деионизированной воде (1 л) и регулируется до рН 9,6. Храниться при 4 °С и обновляется один раз в 2 недели.

#### б) Субстратный буфер

Готовится 10 % раствор диэтаноламина в деионизированной воде. Диэтаноламин должен быть предварительно нагрет до 37 °С перед дозированием, а рН раствора должен быть отрегулирован до рН 9,8 с помощью 1 м соляной кислоты. Храниться при 4 °С и обновляется один раз в 2 недели.

#### в) Конъюгат фермента

Козий анти-куриный иммуноглобулин, конъюгированный с щелочной фосфатазой или другими видами анти-куриного глобулина. Хранится при 4 °С в разбавителе в соответствующей концентрации и обновляется один раз в неделю.

#### г) Субстрат фермента

Растворяется одна таблетка п-нитрофенилфосфата динатрия (5 мг) в буфере субстрата (5 мл) не ранее чем за 30 минут до дозирования и хранится в темноте.

## 6.7. Стандарты

а) Антисыворотка положительного контроля, приготовленная путем внутримышечной инъекции цыплятам 1-недельного возраста без специфического патогена, содержащим 10<sup>6</sup> *S. Enteritidis*. Сыворотка получается через 3-4 недели, когда титры антител максимальны.

б) Отрицательная Контрольная сыворотка А от четырех недельных птиц без специфического патогена.

в) Отрицательная Контрольная сыворотка В от 1-недельных животных производителей, которые, не заражены сальмонеллезом. Сыворотки объединяются и хранятся в объеме 100 мкл при минус 20 °С.



---

**УДК 636.2**

**МКС 65.020.30 (NEQ)**

**Ключевые слова:** Сальмонеллез, лабораторный метод, идентификация агента, серологические тесты.

---



БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3510-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





Басуға \_\_\_\_\_ ж. Қол қойылды. Пішімі 60x84 1/16  
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «Kz Times New Roman»,  
«Times New Roman»

Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы \_\_\_\_\_ дана. Тапсырыс \_\_\_\_\_

---

«Қазакстан стандарттау және сертификаттау институты»  
республикалық мемлекеттік кәсіпорны  
010000, Нұр-Сұлтан қаласы, Мәңгілік Ел даңғылы, 11 үй  
«Эталон орталығы» ғимараты  
Тел.: 8(7172) 27-08-14, 44-64-50