



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

Жануарлар

КОЛИБАКТЕРИОЗДЫ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ

Животные

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА

ҚР СТ 3650-2020

Ресми басылым

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



Нұр-Сұлтан

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

СТ РК 3650-2020 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

Жануарлар

КОЛИБАКТЕРИОЗДЫ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ

ҚР СТ 3650-2020

Ресми басылым

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

Нұр-Сұлтан



ҚР СТ 3650-2020

Алғысөз

1 Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитетінің «Қазақстан стандарттау және метрология институты» республикалық мемлекеттік кәсіпорны **ӘЗІРЛЕП ЕНГІЗДІ**

2 Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитеті Төрағасының 2020 жылғы 9 желтоқсандағы № 434-од бұйрығымен **БЕКІТІЛІП, ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

3 Осы стандартта Қазақстан Республикасының 2002 жылғы 10 шілдедегі № 339 «Ветеринария туралы» Заңының нормалары іске асырылған

4 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ

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

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

Жануарлар

КОЛИБАКТЕРИОЗДЫ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ

Енгізілген күні 2021-04-15

1 Қолданылу саласы

Осы стандарт жануарлардың колибактериозын бактериологиялық диагностикалау әдістерін белгілейді.

2 Нормативтік сілтемелер

Осы стандартты қолдану үшін стандарттау жөніндегі мынадай сілтемелік нормативтік құжаттар қажет:

ГОСТ 3-88 Хирургиялық резеңке қолғап. Техникалық шарттар.

ГОСТ 12.1.008-76 Еңбек қауіпсіздігі стандарттарының жүйесі. Биологиялық қауіпсіздік. Жалпы талаптар.

ГОСТ 61-75 Реактивтер. Сірке қышқылы. Техникалық шарттар.

ГОСТ OIML R 76-1-2011 Өлшем бірлігін қамтамасыз етудің мемлекеттік жүйесі. Автоматты емес таразы. 1-бөлім. Метрологиялық және техникалық талаптар. Сынақтар.

ГОСТ 2222-95 Техникалық метанол. Техникалық шарттар.

ГОСТ 3118-77 Реактивтер. Тұз қышқылы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 4233-77 Реактивтер. Хлорлы натрий. Техникалық шарттар.

ГОСТ 4328-77 Реактивтер. Натрий гидроксиді. Техникалық шарттар.

ГОСТ 4919.1-77 Реактивтер және айрықша таза заттар. Индикатор ерітінділерін дайындау әдістері.

ГОСТ 5962-2013 Тағамдық шикізаттан ректификацияланған этил спирті. Техникалық шарттар.

ГОСТ 6709-72 Тазартылған су. Техникалық шарттар.

ГОСТ ISO 7864-2011 Бір рет қолданылатын стерильді инъекциялық инелер.

ГОСТ ISO 7886-1-2011 Бір рет қолданылатын стерильді инъекциялық шприцтер. 1-бөлім. Қолмен пайдалануға арналған шприцтер.

ГОСТ 8074-82 Аспаптық микроскоптар. Типтері, негізгі параметрлері және өлшемдері. Техникалық талаптар.

ГОСТ 9147-80 Зертханалық фарфор ыдыстар мен жабдықтар. Техникалық шарттар.

ГОСТ 9284-75 Микропрепараттарға арналған заттық шынылар. Техникалық шарттар.

ГОСТ 9656-75 Реактивтер. Бор қышқылы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 12026-76 Зертханалық сүзгіш қағаз. Техникалық шарттар.

ГОСТ 13739-78 Микроскопияға арналған иммерсиялық май. Техникалық талаптар. Сынақ әдістері.

ГОСТ 16317-87 Тұрмыстық электр тоңазытқыш аспаптары. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 Сынақ және калибрлеу зертханаларының құзыреттілігіне қойылатын жалпы талаптар.

ГОСТ 17206-96 Микробиологиялық агар. Техникалық шарттар.

ГОСТ 20730-75 Қоректік орта. Ет-пептонды сорпа (ветеринариялық мақсаттар үшін). Техникалық шарттар.



ҚР СТ 3650-2020

ГОСТ 21241-89 Медициналық пинцет. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ 22967-90 Көп рет қолданылатын инъекциялық медициналық шприцтер. Жалпы техникалық талаптар және сынау әдістері.

ГОСТ 22280-76 5,5 сулы натрий лимон қышқылы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 24104-2001 Зертханалық таразы. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ 25336-82 Зертханалық шыны ыдыстар мен жабдықтар. Типтері, негізгі параметрлері және өлшемдері.

ГОСТ 29230-91 (ИСО 835-4-81) Зертханалық шыны ыдыс. Градуирленген тамшуырлар. 4-бөлім. Үрленген тамшуырлар.

ГОСТ 32275-2013 Бір рет қолданылатын медициналық анатомиялық қолғаптар. Техникалық талаптар.

Ескертпе - Осы стандартты пайдалану кезінде ағымдағы жылдың көрсеткіші бойынша «Стандарттау жөніндегі құжаттар» каталогы және ағымдағы жылы жарияланған тиісті мерзімді басып шығарылатын ақпараттық каталог бойынша сілтемелік стандарттар мен жіктеуіштердің қолданылуын тексерген жөн. Егер сілтемелік құжат ауыстырылған (өзгертілген) болса, онда осы стандартты пайдалану кезінде ауыстырылған (өзгертілген) құжатты басшылыққа алған жөн. Егер сілтемелік құжат ауыстырылмай қолданылған алынып тасталса, онда оған сілтеме берілген ереже осы сілтемені қозғамайтын бөлігінде қолданылады.

3 Терминдер, анықтамалар, белгілеулер және қысқартулар

Осы стандартта тиісті анықтамасымен мынадай термин қолданылады:

3.1 **Колибактериоз** (эшерихиоз, колиинфекция): Жануарлар төлінің, құстардың барлық түрін қоса алғанда, жіті өтпелі жұқпалы ауру. Аурудың қоздырғышы – *Escherichia coli* (патогендік серологиялық нұсқалар), *Escherichia*, *Enterobacteriaceae* тұқымдасына жатады.

3.2 **ЕПА** – ет-пептонды агар.

3.3 **ЕПС** – ет-пептонды сорпа.

4 Қауіпсіздік талаптары

4.1 ГОСТ 12.1.008 және [1] сәйкес микроорганизмдермен жұмыс жүргізу кезіндегі жалпы қауіпсіздік талаптары.

4.2 Зерттеуден кейін материалды, сондай-ақ пайдаланылған жеке қорғаныш құралдарын зарарсыздандыру 30 минут қайнату немесе 2 атм (0,2 МПа) қысымда және $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ температурада 1 сағат бойы автоклавтау арқылы жүргізіледі.

5 Өлшеу құралдары, жабдықтар, материалдар, реактивтер және жануарлар

5.1 Зерттеу жүргізу кезінде мынадай өлшеу құралдары, жабдықтар, материалдар, реактивтер мен жануарлар пайдаланылады:

ГОСТ 17206 бойынша микробиологиялық агар.

Инокуляцияға арналған бактериологиялық ілмектер.

Термореттегіші бар су моншасы.

ГОСТ 20730 бойынша ет-пептонды сорпа.

ГОСТ 12026 бойынша ФБ-II немесе ФБ-III маркалы сүзгіш қағаз.

Қағаз сүлгілер.

Қағаз немесе мақта дәке сүзгілері.

ГОСТ OIML R 76-1 бойынша рұқсат етілетін қателіктің шегі $\pm 0,01$ г-нан аспайтын автоматты емес әрекет ететін жоғары сыныпты немесе ГОСТ 24104 $\pm 0,01$ г-нан аспайтын рұқсат етілген қателік шектерімен арнайы немесе жоғары дәлдік класты дәлдік таразысы.

Ұсақтағыш саптаманың айналу жылдамдығы 2000-нан бастап 27000 айн./мин дейінгі



перистальтикалық типтегі гомогенизатор, гомогенизация үшін сынама көлемі 1-ден бастап 2500 см³ дейін және диаметрі 10-50 мкм суспензия бөлшектерін алуға мүмкіндік береді.

ГОСТ 6709 бойынша тазартылған су.

Ауыспалы көлемдегі (5-1000 мкл) бір арналы, ауыспалы көлемдегі сегіз арналы (10-100 мкл), ауыспалы көлемдегі он екі арналы мөлшерлегіштер

Ұсақталған мұз немесе суық таған.

Қан алуға арналған ветеринариялық инелер.

ГОСТ ISO 7864 бойынша инъекциялық инелер.

Қалдықтарға арналған контейнер (шағын).

Қоқыс контейнері (үлкен).

Пайдаланылған инелер мен өткір құралдарға арналған контейнер(лер).

СК бөлуге арналған реактивтер жиынтығы.

Зертханалық маркер.

Зертханалық халат.

ГОСТ 13739 бойынша микроскопияға арналған иммерсиялық май.

Араластырғыш қырыс.

Микросынауықтар.

Мұздатқыш минус 15-тен бастап минус 20 °С-қа дейін.

Зертханалық ақ тышқандар.

Грамм бойынша бояулар жиынтығы.

0,5-10 мкл аэрозоль түзілуіне кедергі келтіретін мөлшерлегіштерге арналған ұштықтар.

2-20 мкл аэрозоль түзілуіне кедергі келтіретін мөлшерлегіштерге арналған ұштықтар.

10-100 л аэрозольдің пайда болуына жол бермейтін мөлшерлегіштерге арналған ұштықтар.

200-1000 мкл аэрозоль түзілуіне кедергі келтіретін мөлшерлегіштерге арналған ұштықтар.

Бір рет қолданылатын нитрилді қолғап.

Бір рет қолданылатын аяқ киім.

Сүзгісі бар гомогенизация пакеті.

Биологиялық қалдықтарға арналған пакеттер (шағын).

Биологиялық қалдықтарға арналған пакеттер (үлкен).

Парафил.

ГОСТ 32275 бойынша бір рет қолданылатын анатомиялық медициналық қолғаптар.

ГОСТ 3 бойынша хирургиялық резеңке қолғаптар.

ГОСТ 21241 бойынша медициналық пинцеттер.

Электрлік тамшуыр.

Заттық шынылар.

Эппендорф түріндегі сынауықтар.

Жабын шынылар.

Температураны қолмен немесе автоматты анықтағышпен жарақталған 0,01 бірлік рН рұқсаты бар 0,05 бірлік рН дейінгі дәлдікпен өлшеуді қамтамасыз ететін рН-метр.

Ковач реактиві.

Оксидазаға реактив.

Каталазаға реактив.

Селективті-дифференциалды қоректік орта: Эндо немесе Левин ортасы, Макконки ортасы немесе сорбит ортасы.

Антикоагулянтты құрал.



ҚР СТ 3650-2020

Көзді қорғау құралдары (көзілдірік).

Ферментативті қасиеттерді зерттеуге арналған орта: Симмонс ортасы, Клиглер ортасы, көмірсулар мен полиатомды спирті бар Гисс ортасы.

Күкіртсутекті қағаз жолақтар.

Vacti – Incenirators стерилизаторы.

Стерильді тамшуырлар (көлемі 1, 2, 5, 10 мг).

20 °С-тан бастап 50 °С-қа дейінгі температураны ұстап тұруды қамтамасыз ететін термостат.

ГОСТ 16317 сәйкес 0 °С-тан бастап 10 °С-қа дейінгі температураны қамтамасыз ететін тұрмыстық тоңазытқыш.

ГОСТ 4233 бойынша хлорлы натрий (х.с.).

Айналу жылдамдығы 6000 айн/мин дейін зертханалық центрифуга.

ГОСТ 25336 бойынша Петри тостағандары.

2-деңгейдегі биологиялық қауіпсіздік шкафы.

ГОСТ 22967 бойынша көп рет қолданылатын инъекциялық медициналық шприцтер.

ГОСТ ISO 7886-1 бойынша бір рет қолданылатын инъекциялық медициналық шприцтер.

Сынауықтарға арналған тағандар.

СО₂-құрамында 10 %-дан бастап 15 %-ға дейін көмірқышқыл газы бар шыны инкубатор немесе эксикатор (микроанаэроустат).

5.2 Метрологиялық сипаттамалары көрсетілгеннен төмен емес басқа өлшеу құралдары мен жабдықтарды қолдануға рұқсат етіледі.

5.3 Бір рет қолданылатын ыдыстарды пайдалануға рұқсат етіледі.

6 Сынама алу

6.1 Зерттеу үшін зертханаға жаңа мәйіт жіберіледі. Алғашқы диагноз қойылған және мәйіттер болмаған кезде мүмкіндігінше антибиотиктермен емделмеген амалсыз өлтірілген немесе ауыр науқас жануардың мүрдесі жіберіледі. Мүрдені жеткізу мүмкін болмаған жағдайда толығымен мынадайпатологиялық материалдарды жібереді: (бас (ми), жілік, көкбауыр, өт қабы бар бүйректің үлесі, аш ішектің зардап шеккен аймақтарына сәйкес келетін мезентериялық лимфа түйіндері және жеке ыдыста – аш ішектің зақымдалған бөлігі.

6.2 Құстардың колибактериозын диагностикалау үшін зертханаға жаңа өлген өліктерден басқа, аурудың айқын белгілері бар кемінде 5-6 ауру құс жіберіледі. Ауру құс зертханада өлтіріледі, одан алынған материал бактериологиялық зерттеуден өтеді.

7 Әдістің мәні

7.1 Бактериологиялық зерттеулер

7.1.1 Патологиялық материалды колибактериозға зертханалық зерттеу
7.1.2 т. көрсетілген тәртіппен және мерзімде жүргізіледі.

7.1.2 Бактериологиялық зерттеу жүргізу кезеңдері:

1-күн – аш ішектің мүшелері мен шырышты қабығынан алынған себінділер. Жағындылардың микроскопиясы.

2-күн – Эшерихияға тән екі колонияны эндо немесе Левин ортасынан бастап ЕПС-ға және Симмонс ортасына дейін екі органның себінділерінен шығару. 4 сағаттан кейін термостатта көмірсулар мен Андраде индикаторы бар ортаға, ферментативті қасиеттерін зерттеу үшін, екі ЕПА сынауығына антигенді дайындау және ақ тышқандарды жұқтыру

үшін егу.

3-күн – себінділерден жағындыларды дайындау, оларды зерттеу. Ферментативті қасиеттерді алдын-ала есепке алу. Себінділерді серологиялық типтеу үшін антигенді дайындау. Жануарлардың күкірт тобына жататындығын анықтау. Ақ тышқандарға жұқтыру.

4-күн – биосынама есебі. Бөлінген жануарлардың антибиотиктерге сезімталдығын анықтау. Кеңейтілген РА есебі.

5-күн-биосынама есебі. Антибиотиктерге жануарлардың сезімталдығын анықтау нәтижелерін есепке алу.

6-7-күн – биосынама мен жануарлардың ферментативті қасиеттерін зерттеу нәтижелерін түпкілікті есепке алу. Сараптаманы ресімдеу.

7.2 Жануарды бөліп алу, оның морфологиялық, өсінділік, ферментативті және гематологиялық қасиеттерін зерттеу

7.2.1 6.1 т. аталған патологиялық материалдан себінділер. ЕПА-да, ЕПС-да және эндо немесе Левин ортасы бар шыныаяқтарда (эозин мен метилен көкімен агар) жасалады.

Құстарды зерттеу кезінде олар сүйек кемігінен, жүректен және бауырдан егумен шектеледі.

7.2.2 ЕПА-да және қиғашталған ЕПА-да себінділер Пастер тамшуырымен жүзеге асырылады: Эндо және Левин ортасына (шыныаяқтарда) көкбауырдан, бауырдан, өт қабынан, мезентериялық лимфа түйіндерінен, бас және сүйек кемігінен себінді Пастер тамшуырымен жүзеге асырылады, материалды қоректік ортаның бетіне шпательмен ысқылайды немесе қоректік ортаның бетіне кесілген органның профламбирленген бөліктерін жүргізу арқылы жүзеге асырылады.

7.2.3 Себінді алдында ішектің аш бөлігінен ішіндегісі алынады, шырышты қабығын Пастер тамшуырының ұшымен тазартады және скарификатты эндо немесе Левин ортасының бетіне қалақшамен ысқылайды.

7.2.4 Себумен бір мезгілде микроскопиялық зерттеу үшін әр мүшеден жағындылар жасайды.

7.2.5 Протеиннің өсуін тежеу үшін Петри ыдысына құйылған ортаның беті 1-2 мл спирт-ректификатты суарады, бір минуттан кейін спирт ағызылады, тостаған 5-15 мин бойы 37-38 °С ашық күйінде кептіріледі, содан кейін себу үшін пайдаланылады.

7.2.6 18-24 сағаттан кейін 37-38 °С температурада өскінділер қаралады. Эндо немесе Левин ортасында өсу болмаған жағдайда, ал ЕПС-да ортаның бұлдырлығы байқалса, жануарды микроскоптайды және грам-теріс таяқшалар табылған кезде Эндо немесе Левин ортасы бар шыныаяққа қайта егеді; бір тәуліктен кейін өскінділер қаралады және өсу сипатын анықтайды.

7.2.7. 6.1 тармақта көрсетілген екі мүшеден өсірілген екі колониядан алынған өскінділер одан әрі зерттеледі. Әрбір типтік колония (А қосымшасын қараңыз) МПБ және Simmons ортасы бар сынауыққа жіберіледі. 4 сағаттық өсіруден кейін МПБ термостатында ферментативті қасиеттерді анықтау үшін, сондай-ақ ақ тышқандарды (тауықтарды) жұқтыру үшін қыздырылған антигенді және суспензияны дайындау үшін МПА бар екі сынауыққа егу жүргізіледі. Ісінген ауруға күдік болған жағдайда, кеуденің лимфа түйіндерінен және ішектің аш бөлігінен өсірілген торайлар, сонымен қатар, гемолитикалық қасиеттерін анықтау үшін қан агарына Петри ыдысына салады.

7.2.8 Бөлінген дақылдарда олардың тектік тиістілігін анықтау үшін морфологиялық, тинкториалдық, өсінділік және ферментативтік қасиеттері зерттеледі.

Бактериялардың морфологиясын зерттеген кезде жағындылар грамм бойынша боялады.

ҚР СТ 3650-2020

7.2.9 Ферментативті қасиеттер лактоза, маннитол, Симмонс, желатиннің цитаталық аммоний ортасы және келесі орталардың бірі: лактоза және күкірт қышқылы бар агар немесе Клиглер ортасы, Олькеницкий ортасы – лактоза және несепнәр бар орталар кіретін қоректік орта жиынтығы арқылы зерттеледі (А қосымшасын қараңыз).

Дақылдардың тектік (түрлік) тиістілігін 1-кесте бойынша анықтайды.

Жоғарыда аталған сынақтар арқылы таңдалған өсіндінің жынысын анықтауға мүмкіндік бермейтін нәтижелерді алу кезінде нақтылау үшін қосымша сынақтар қолданылады: несепнәрдің бөлінуі, метилротпен және Фогес – Проскауэр реакциялары.

7.2.10 Торайларда ісіну ауруы түрінде болатын колибактериоздың қоздырғышы, әдетте, β-гемолизин шығарады. В-гемолизин өндіру қабілетін өсінділерді ЕПА немесе ЕПС-ға қанмен себу арқылы 3.3 т.сәйкес анықтайды.

Егер өсінді гемолитикалық қасиетке ие болса, сорпа гемолизденген қанның түсін сорпаның бүкіл бағанының немесе оның бір бөлігінің түсімен алады. Өсіп келе жатқан колониялардың айналасында қаны бар ЕПА-да түссіз гемолиз аймағы пайда болады.

1-кесте - Энтеробактерияларды ферментативті қасиеттері бойынша саралау

Бастапқы сараланған тест	Бактериялардың тегі/түрі												
	Escherichia coli	Salmonella кроме S. arizonae	S. arizonae	Citrobacter	Klebsiella	Enterobacter		Hafnia	Proteus (Берги бойынша, 1974)				
						aerogenes	cloacae		vulgaris	mirabilis	morganii	rettgeri	inconstans
Симмонс ортасында цитратты ассимиляциялау	-	+	+	+	±	+	+	+	±	+	-	+	+
Лактозаны ашыту	+	-	+	±	±	+	+	-	-	-	-	-	-
Маннитті ашыту	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	±	-
Желатинді сұйылту	-	-	±	-	-	±	+	-	+	+	-	-	-
Күкіртті сутектің түзілуі	-	+	+	±	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Индолдың түзілуі	+	-	-	±	±	-	-	-	+	-	+	+	+
Қосымша саралау үшін													
Несепнәрдің бөлінуі	-	-	-	±	±	±	±	-	+	+	+	+	-
Метилротпен реакция	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Фогес-Проскауэр реакциясы	-	-	-	-	±	+	+	±	±	±	-	-	-

7.3 Эшерихияның таңдалған дақылдарының патогенділігін анықтау

7.3.1 Эшерихияның патогенді қасиеттерін ақ тышқандарға биологиялық сынама қою арқылы анықтайды.

7.3.2 Салмағы 14-16 г үш ақ тышқанға екі ішкі ағзадан бөлінген агар дақылдарының суспензиясының қоспасы 500 миллион микроб жасушасымен жұқтырылады (бактериялардың концентрациясы бактериялық стандартқа сәйкес белгіленеді).

Инфекциядан кейін 2 күн ішінде бір немесе одан да көп тышқандар өлген жағдайда өсінді патогенді деп танылады.

Колибактериозға арналған биосынама үшін патологиялық материал қолданылмайды.

7.3.3 Құстан бөлінген эшерихия дақылдарының патогендік қасиетін 4-5 апталық балапандардағы биосынама арқылы да анықтауға болады. Осы мақсатта тәуліктік агар культуурасын 1 млрд. микроб денелерімен жуу үш балапанды ішастарға жұқтырады. Өсінді бір немесе одан да көп тауықтар жұқтырғаннан кейінгі алғашқы 4 күнде өлген кезде патогендік болып саналады.

7.4 Эшерихияның таңдалған дақылдарын серологиялық типтеу

7.4.1 Бактериялардың морфологиялық, культуралық, ферментативті және патогендік қасиеттерін зерттеумен бір мезгілде олардың энзоотиялық серологиялық нұсқаларға тиістілігін анықтау мақсатында О-антиген бойынша эшерихия өсінділерін серологиялық типтеуді жүргізеді. Ақ тышқандар (тауықтар) үшін патогендігі бар эшерихия дақылдары серологиялық типтеуге ұшырамайды.

7.4.2 Ақ тышқандар (балапандар) үшін патогендігі бар эшерихия дақылдары серологиялық типтеуге ұшырамайды.

7.4.3 Эшерихияның серологиялық О-тобын биофабрика шығаратын тип спецификалық агглютинациялайтын сарысулар жиынтығының көмегімен анықтайды.

8 Бактериологиялық зерттеу нәтижелерін есепке алу

8.1 Сүтқоректілердегі колибактериозға бактериологиялық диагноз мына көрсеткіштердің бірін алған кезде анықталған деп саналады:

- эшерихия өсінділері мынадай екі ағзадан бөлінген кезде: көкбауыр, сүйек немесе бас миы патогендігі мен серологиялық тиістілігін анықтамай;

- ақ тышқандар үшін патогенді немесе жануарлар үшін патогенді деп танылған О-серотоптарға жататын (яғни диагностикалық жиынтыққа кіретін агглютинациялайтын О-коли-сарысулармен типтелетін) эшерихия жануарлар дақылдарының кемінде зерттелген екі ағзасынан бөлу кезінде).

8.2 Торайлардың колиэнтеритоксемияға (ісінген ауруға) бактериологиялық диагнозы белгіленген болып саналады:

β-гематологиялық эшерихияны бөлгенде және патогендігі мен серологиялық тиістілігін анықтамай тән патологиялық өзгерістер болған кезде;

жануарлар үшін патогенді деп танылған кемінде екі жұқтырған ақ тышқанның немесе О-серотоптарға жататын өлуді тудыратын β-гематологиялық эшерихияны бөлгенде (тән патологоанатомиялық өзгерістер болмаған кезде).

8.3 Құстардың колибактериозына оң бактериологиялық диагноз мына екі мүшеден: сүйек кемігінен, қаннан немесе бауырдан тауықтар үшін патогенді эшерихия бөлінген кезде белгіленеді. Колибактериоз бойынша анық қолайсыз шаруашылықтан патологиялық материалды зерттеу кезінде балапандарға биосынама қою міндетті емес.

8.4 Қажет болған жағдайда бөлінген патогенді эшерихияның антибиотиктерге,



ҚР СТ 3650-2020

химиотерапиялық препараттарға сезімталдығын [3] және [4] басшылыққа ала отырып анықтайды.

8.5 Бактериологиялық зерттеудің жалпы мерзімі – 7 тәулікке дейін.

9 Диагноз қою

Шаруашылықтарда колибактериозға диагноз аурудың клиникалық белгілерін, патологиялық-анатомиялық өзгерістерді талдау және өлген жануарлардан немесе еріксіз сойылған ауру жануарлардан алынған патологиялық материалды олардың өлімі болмаған кезде бактериологиялық зерттеу нәтижелері негізінде, эпизоотологиялық деректерді ескере отырып – ауырған жануарлардың жасын, стационарлығын, жаппай зақымдануын және т.б. (А қосымшасын қараңыз).

10 Сараптама актісі (сынақ хаттамасы)

Ауру диагностикасының нәтижелері бойынша зертханалық сынақтарды жүргізу кезінде сараптама актісін (сынақ хаттамасын) [2] сәйкес ресімдейді және береді.

А қосымшасы (ақпараттық)

Колибактериоз (эшерихиоз) бұзауларға негізінен өмірінің алғашқы 3-5 күнінде, торайларға – өмірдің алғашқы күндері мен аптасында, сондай-ақ төлдегеннен кейінгі кезеңде, қозыларға – өмірдің алғашқы күндерінен бастап 5-7 айға дейін, құс – 1-ден бастап 90 күнге дейін және ересектер – жұмыртқа салу кезеңінде, аң терісі – 1-5 күнде, сирек 6-10 күнде зақымдайды.

Ауру аурудың жаппай болуымен, стационарлығымен және жоғары өліммен сипатталады. Септикалық, энтеротоксемиялық және энтерит түрінде өтеді. Соңғы екі формада қоздырғыш тек асқазан-ішек жолдарында және мезентеральды лимфа түйіндерінде, ішектің аймақтық зардап шеккен аймақтарында локализацияланады.

Ауыспалы жастағы шошқаларда колибактериоз ісіну ауруы түрінде жүреді; құстарда – септикалық және созылмалы түрінде, көбінесе тыныс алу микоплазмасы, инфекциялық бронхит, кокцидиозбен аралас инфекция түрінде болады.

Антибиотиктер мен нитрофуран препараттарын профилактикалық және емдік мақсатта кеңінен қолдану колибактериоздың ағымы мен формаларына әсер етуі мүмкін, нәтижесінде ауру жануарларда септикалық форма дамымайды және барлық органдардың қоздырғышымен себінді болмайды.

Клиникалық тұрғыдан колибактериоз кәсіби диареямен, ауыр интоксикация белгілерімен, дегидратациямен, депрессияның жоғарылауымен, кейде артритпен және орталық жүйке жүйесінің зақымдану белгілерімен (конвульсия, паралич) білінеді. Бұзауларда колибактериоз диарея белгілерінсіз де дамуы мүмкін. Алынатын жастағы торайларда ісіну ауруы аурудың басында дене температурасының қысқа мерзімді жоғарылауымен, содан кейін оның қалыпты деңгейіне дейін төмендеуімен, қабақтың тері астындағы тіндердің, бастың мұрын бөлігінің, субмандибулярлық кеңістіктің ісінуімен, қозғалыс үйлесімділігінің бұзылуымен, құрысулармен, кесулермен, параличпен, пиглет, құлақ, аяқ-қол және іштің терісінің тоқыраған гиперемиясымен сипатталады.

Терісі бағалы аңдардың күшіктерінде-көз көпіршіктері мен шырышы бар сұйық сарғыш-жасыл нәжістің бөлінуімен диарея, летаргия, орталық жүйке жүйесінің зақымдану белгілері (қозу, құрысулар, содан кейін депрессия) сирек кездеседі.

Патологиялық өзгерістер негізінен ішектің және тік ішектің катаральды-геморрагиялық қабынуымен сипатталады. Сонымен қатар, әр түрлі дәрежеде мынадай өзгерістер болуы мүмкін: капсула көкбауырының астындағы нүктелі қан кету, оны ұлғайтпай; эпикард және эндокардта қан кетулер – нүктелік, жолақты немесе дақ; фокальды катаральды-геморрагиялық пневмония.

Шошқалардың ісіну ауруы кезінде қабақтың, конъюнктиваның, асқазанның кардиологиялық аймағының субмукозальды бөлігінің, бастың артқы жағындағы тері астындағы тіндердің, мойынның, жақ асты кеңістігінің, құлақтың түбінде ісінуі; жоғарғы тыныс жолдарының шырышты қабығының серозды инфильтрациясы және тоқырау гиперемиясы; асқазан қабырғасының желатинді инфильтрациясы; асқазан шырышты қабығының геморрагиялық қабынуы; кеуде және іш қуыстарындағы серозды-фибринозды эффузия; өкпе ісінуі; перитонеум мен ішектің серозды мембранасының инфильтрациясы; мезентериялық лимфа түйіндерінің ұлғаюы, олардың түсінің мәрмәрі анықталады.

Жүнді жануарлардың күшіктерінде катаральды гастроэнтерит, гиперемия және өкпе ісінуі, бауыр дистрофиясы, іріңді менингоэнцефалит бар.

Колибактериоздың қоздырғышы – спораларды түзбейтін грам-теріс таяқшалар, жағындыларда бір-біріне орналасады, кейде филиформды формаларды құрайды, ұштарында қарқынды дақ пайда болуы мүмкін (биполярылы). Сұйық ортада эшерихия қарқынды бұлдырлықты тудырады, тығыз жерлерде олар дөңгелек пішінді колонияларды



ҚР СТ 3650-2020

кұрайды, шырынды, жылтыр, дөңес, тегіс, жиектері тегіс.

Эшерихияның типтік колониялары (S-пішіні) дөңгелек пішінмен, тегіс, дөңес немесе ортасында сәл көтерілген бетімен, тегіс жиектерімен, қызғылт, қызыл немесе таңқурай түсімен, металл жылтырымен немесе онсыз Эндо ортасында және Левин ортасында күлгін немесе қара түспен сипатталады.

Эшерихия (*E. coli*) цитраттарды кәдеге жаратпайды (Симмонс ортасында өспейді және оның түсін өзгертпейді), лактоза мен маннитті ашытады, желатинді сұйылтпайды, күкірт қышқылы, темір, Клигер және Олькеницкий ортасы бар қант агарында күкірт сутегін түзбейді (ЕПС сынауығына түсірілген күкірт сутегінің түзілуін анықтау үшін индикаторлық қағазды қолдануға болмайды), индол түзеді (сынауыққа салынған индикаторлық қағаздың қызаруын тудырады қант агарымен және күкірт қышқылымен, Клигер, Олькеницкий немесе ЕПС ортасымен), метилротпен және теріс Фогес-Проскауэрмен оң реакция береді, несепнәрдi ыдыратпайды (1-кестені қараңыз).

Колибактериоздың энзоотиялық өршуі көбінесе мына О-топтардың патогенді эшерихиясын тудырады: 08, 09, 015, 020, 026, 078, 086, 0101, 0119, 0141, сирек 033, 02, 035, 041, 0103, 0115, 0117, 0127, 0137, - бұзауларда; 08, 026, 0101, 0138, 0139, 0141, 0142, 0147, 0149 шошқаларда; 08, 09, 015, 020, 035, 041, 078, 0101, 0137 – қой; 01, 02, 055, 08, 015, 026, 078, 0111, 0115, 0119, 0141 құстарда. Жануарлардың аталған түрлерінде кейбір жағдайларда басқа сұр топтардың эшерихиясынан туындаған аурулар болуы мүмкін.

E. coli құрамында антигендердің үш түрі бар: О, К және Н. О-антиген – соматикалық, термостабелді, негізінен цитоплазма мен цитоплазмалық мембранада локализацияланған. О-антиген бойынша қазіргі уақытта эшерихияның 163 серологиялық тобы белгілі, К-антигенге L, В және А. L және В-антигендерімен белгіленетін беттік (қабықшалы немесе капсулалы) антигендердің үш түрі кіреді. Бір микробтық жасушада әдетте үш беттік антигендердің біреуі ғана болады. Н-антиген-флагелла, термолабильді, эшерихияның жылжымалы сорттарында кездеседі.

Беттік (L, В, және А) антигендер О-агглютинацияға кедергі келтіреді. Сондықтан оларды өсіндіні бұзу үшін 1 сағат ішінде 100 °С температурада қайнату (L – және В-антигендерді жою үшін) немесе 2 сағат ішінде автоклавтау (а-антигенді жою үшін) қажет.

Библиография

[1] Орны ауыстырылатын (тасымалданатын) объектілердің және биологиялық материалдың сынамаларын іріктеу қағидаларын бекіту туралы Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрінің 2015 жылғы 30 сәуірдегі № 7-1/393 бұйрығы.

[2] «Сараптама актісін (сынақ хаттамасын) беру қағидаларын бекіту туралы» Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрінің 2015 жылғы 16 қаңтардағы № 7-1/19 бұйрығы.

[3] Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрінің 2017 жылғы 8 қыркүйектегі № 684 бұйрығымен бекітілген «Ықтимал қауіпті химиялық және биологиялық заттарды пайдаланатын зертханаларға қойылатын санитариялық-эпидемиологиялық талаптар» санитариялық қағидалары.

[4] 1971 жылғы 30 қазанда КСРО АШМ ВБ бекіткен Ауыл шаруашылығы жануарларының инфекциялық аурулары қоздырғыштарының антибиотиктерге сезімталдығын анықтау жөніндегі әдістемелік нұсқаулар.



МСЖ 07.100.01

Түйін сөздер: жануарлар, құс, колибактериоз, диагноз, оқшаулау, егу, теру, колония, антиген, қоздырғыш, дақыл



НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Животные

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА

СТ РК 3650-2020

Издание официальное

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

Нур-Султан



Предисловие

1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от 9 декабря 2020 года № 434-од

3 В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан «О ветеринарии» от 10 июля 2002 года.

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге «Документы по стандартизации», а текст изменений и поправок – в периодически издаваемом информационном каталоге «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в периодически 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 КОЛИБАКТЕРИОЗА**

Дата введения 2021-04-15

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы бактериологической диагностики колибактериоза животных.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы по стандартизации:

ГОСТ 3-88 Перчатки хирургические резиновые. Технические условия.

ГОСТ 12.1.008-76 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования.

ГОСТ 61-75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия.

ГОСТ OIML R 76-1-2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания.

ГОСТ 2222-95 Метанол технический. Технические условия.

ГОСТ 3118-77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия.

ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия.

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия.

ГОСТ 4919.1-77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов.

ГОСТ 5962-2013 Спирт этиловый ректифицированный из пищевого сырья. Технические условия.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ ISO 7864-2011 Иглы инъекционные однократного применения стерильные.

ГОСТ ISO 7886-1-2011 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования.

ГОСТ 8074-82 Микроскопы инструментальные. Типы, основные параметры и размеры. Технические требования.

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия.

ГОСТ 9284-75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия.

ГОСТ 9656-75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия.

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 13739-78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования.

Методы испытаний.

ГОСТ 16317-87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия.

ГОСТ ISO/МЭК 17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

ГОСТ 17206-96 Агар микробиологический. Технические условия.

ГОСТ 20730-75 Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных



СТ РК 3650-2020

целей). Технические условия.

ГОСТ 21241-89 Пинцеты медицинские. Общие технические условия.

ГОСТ 22967-90 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 22280-76 Натрия лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия.

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические условия.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 29230-91 (ИСО 835-4–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные.

ГОСТ 32275-2013 Перчатки медицинские анатомические одноразовые. Технические требования.

Примечание - При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов и классификаторов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Указатель нормативных документов по стандартизации» по состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения, сокращения и обозначения

В настоящем стандарте применяется следующий термин с соответствующим определением:

3.1 Колибактериоз (эшерихиоз, колиинфекция): Остропротекающая заразная болезнь молодняка всех видов животных, включая птиц. Возбудителем болезни является *Escherichia coli* (патогенные серологические варианты), относящиеся к роду *Escherichia*, семейству *Enterobacteriaceae*.

В настоящем стандарте применяются следующие обозначения и сокращения:

3.2 МПА – мясо-пептонный агар.

3.3 МПБ – мясо-пептонный бульон.

4 Требования безопасности

Общие требования безопасности при проведении работ с микроорганизмами — согласно ГОСТ 12.1.008 и [1].

Обеззараживание материала после исследований, а также использованных индивидуальны х средств защиты, инструментов и т. д. проводят путем кипячения в течение 30 мин или автоклавирования в течение 1 ч при давлении 2 атм (0,2 Мпа) и температуре $(132 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

5 Средства измерений, оборудование, материалы, реактивы и животные

5.1 При проведении исследований используют следующие средства измерений, оборудование, материалы, реактивы и животных:

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Бактериологические петли для инокуляции.

Баня водяная с терморегулятором.

Бульон мясо-пептонный по ГОСТ 20730.

Бумага фильтровальная марок ФБ-II или ФБ-III по ГОСТ 12026.

Бумажные полотенца.

Бумажные или ватно-марлевые фильтры.

Весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности не более $\pm 0,01$ г или весы лабораторные по ГОСТ 24104 специального или высокого класса точности с пределами допускаемой погрешности не более $\pm 0,01$ г.

Гомогенизатор перистальтического типа со скоростью вращения измельчающей насадки от 2000 до 27000 об./мин, объемом пробы для гомогенизации от 1 до 2500 см³ и позволяющий получать частицы суспензии диаметром 10 – 50 мкм.

Дистиллированная вода по ГОСТ 6709.

Дозаторы одноканальные переменного объема (5-1000) мкл, восьмиканальные переменного объема (10-100) мкл, двенадцатиканальные переменного объема (30-300) мкл.

Дробленный лед или холодный штатив.

Иглы ветеринарные для взятия крови.

Иглы инъекционные по ГОСТ ISO 7864.

Контейнер для отходов (малый).

Контейнер для отходов (большой).

Контейнер(ы) для использованных игл и острых инструментов.

Комплект реактивов для выделения НК.

Лабораторный маркер.

Лабораторный халат.

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.

Мешалка вортекс.

Микропробирки.

Морозильник от минус 15 до минус 20 °С.

Мыши белые лабораторные.

Набор красок по Грамму.

Наконечники для дозаторов, препятствующие образованию аэрозоля 0,5 – 1000 мкл.

Одноразовые нитриловые перчатки.

Одноразовые бахилы.

Пакет для гомогенизации с фильтром.

Пакеты для биологических отходов (малые).

Пакеты для биологических отходов (большие).

Парафильм.

Перчатки анатомические медицинские одноразовые по ГОСТ 32275.

Перчатки хирургические резиновые по ГОСТ 3.

Пинцеты медицинские по ГОСТ 21241.

Пипетатор электрический.

Предметные стекла.

Пробирки типа Эппендорф.

Покровные стекла.

pH-метр, обеспечивающий измерение с точностью до 0,05 ед. pH, с разрешением 0,01 ед. pH, оснащенный ручным или автоматическим определителем температуры.

Реактив Ковача.

Реактив на оксидазу.

Реактив на каталазу.

Селективно - дифференциальные питательные среды: среда Эндо, или Левина, среда Мак-Конки или среда с сорбитом.

Средство антикоагулянтное.

Средства защиты глаз (защитные очки).



СТ РК 3650-2020

Среды для изучения ферментативных свойств: среда Симмонса, среда Клиглера, среды Гисса с углеводами и многоатомными спиртами.

Сероводородные бумажные полоски.

Стерилизатор Bacti – Incinerators.

Стерильные пипетки (объемом 1, 2, 5, 10 мг).

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 50 °С.

Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры от 0 °С до 10 °С по ГОСТ 16317.

Натрий хлористый (х.ч.) по ГОСТ 4233.

Центрифуга лабораторная со скоростью вращения до 6000 об/мин.

Цыплята 4-5 недельного возраста

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Шкаф биологической безопасности 2-го уровня.

Шприцы медицинские инъекционные многократного применения по ГОСТ 22967.

Шприцы медицинские инъекционные однократного применения по ГОСТ ISO 7886-1.

Штативы для пробирок.

СО₂-инкубатор или эксикатор стеклянный (микроанаэроустат) с содержанием углекислого газа от 10 % до 15 %.

5.2 Допускается применение других средств измерений и посуды с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов и материалов по качеству не ниже указанных выше.

5.3 Допускается использовать посуду одноразового применения.

6 Отбор проб

6.1 Отбор проб биологического материала, пробоподготовку и доставку его в ветеринарную лабораторию проводят согласно [1].

6.2 Для исследования в лабораторию направляют свежий труп животного. В случае невозможности доставить труп целиком посылают следующий патологический материал: (голову (головной мозг), трубчатую кость, селезенку, долю почек с желчным пузырем, брыжеечные лимфатические узлы, соответствующие пораженным участкам тонкого отдела кишечника, и в отдельной посуде – пораженный отрезок тонкого отдела кишечника).

6.2 Для диагностики колибактериоза птиц в лабораторию направляют, кроме свежих трупов, не менее 5-6 больных птиц с явными признаками болезни. Больную птицу убивают в лаборатории, материал от нее подвергают бактериологическому исследованию.

7 Бактериологический метод

7.1 Сущность метода

При бактериологической диагностике колибактериоза обязательно выделение чистой культуры возбудителя, изучение ее морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств. Последующее определение патогенности выделенных культур эшерихий (биопроба на белых мышах) и определение серологической принадлежности проводят в соответствии с 7.3 и 7.4 настоящего стандарта.

7.1.1 Лабораторное исследование патологического материала на колибактериоз проводят в порядке и в сроки, указанные в 7.1.2.

7.1.2 Этапы проведения бактериологического исследования:

1-й день – посевы из органов и слизистой оболочки тонкого отдела кишечника. Микроскопия мазков;

2-й день – отбивка двух типичных для эшерихий колоний из посевов двух органов со среды Эндо или Левина в МПБ и на среду Симмонса. Посев из МПБ через 4 ч. инкубирования в термостате на среды с углеводами и индикатором Андраде для изучения ферментативных свойств, на две пробирки МПА для приготовления антигена и заражения белых мышей;

3-й день – приготовление мазков из посевов, их исследование. Предварительный учет ферментативных свойств. Приготовление антигена для серологической типизации культур. Определение серогрупповой принадлежности культур. Заражение белых мышей;

4-й день – учет биопробы. Определение чувствительности выделенных культур к антибиотикам. Учет развернутой РА;

5-й день – учет биопробы. Учет результатов определения чувствительности культур к антибиотикам;

6-7-й день – окончательный учет биопробы и результатов изучения ферментативных свойств культур.

7.1.3 Акт экспертизы (протокол испытаний) оформляют в соответствии с [2].

7.2 Выделение культуры, изучение её морфологических, культуральных, ферментативных, и гематологических свойств

7.2.1 Посевы из патологического материала, перечисленного в п. 6.2 делают на МПА, в МПБ и на чашки со средой Эндо или Левина (агар с эозином и метиленовой синью).

При исследовании материала от птиц ограничиваются посевом из костного мозга, сердца и печени.

7.2.2 Посев в МПБ и на скошенный МПА проводят пастеровской пипеткой: на среду Эндо и Левина (в чашках) посев из селезенки, печени, желчного пузыря, брыжеечных лимфатических узлов, головного и костного мозга также проводят пастеровской пипеткой, растирая материал шпателем по поверхности питательной среды, или путем проведения разрезанной поверхностью профламбированных кусочков органа по поверхности питательной среды.

7.2.3 Перед посевом из тонкого отдела кишечника удаляют содержимое, слизистую оболочку скарифицируют концом пастеровской пипетки и скарификат растирают шпателем по поверхности среды Эндо или Левина.

7.2.4 Одновременно с посевом делают мазки из каждого органа для микроскопического исследования.

7.2.5 Для торможения роста протей поверхность среды, разлитой в чашки Петри, орошают 1-2 мл спирта-ректификата, через одну минуту спирт сливают, чашки подсушивают открытыми при температуре от 37 °С до 38 °С в течении от 5 до 15 мин, после чего используют для посева.

7.2.6 Через 18-24 ч инкубирования при температуре от 37 °С до 38 °С посевы просматривают. В тех случаях, когда на среде Эндо или Левина роста нет, а в МПБ отмечается помутнение среды, культуру микроскопируют и при обнаружении грамтрицательных палочек пересевают на чашку со средой Эндо или Левина; через сутки посевы просматривают и определяют характер роста.

7.2.7 Дальнейшему исследованию подвергают культуры, полученные из двух колоний, выращенных из селезенки и печени. Каждую типичную колонию (приложение А) отбивают в пробирку с МПБ и средой Симмонса. После 4-часового выращивания в термостате из МПБ проводят посев с целью определения ферментативных свойств, а

СТ РК 3650-2020

также на две пробирки с МПА для приготовления гетерогенного антигена и суспензии для заражения белых мышей (цыплят). При подозрении на отечную болезнь поросят культуры, выращенные из брыжеечных лимфатических узлов и тонкого отдела кишечника, кроме того, пересевают на кровяной агар в чашки Петри для определения гемолитических свойств.

Примечание - Типичные колонии эшерихий (S –форма) характеризуются круглой формой, гладкой, выпуклой или слегка приподнятой в центре поверхностью, ровными краями, розовым, красным или малиновым цветом с металлическим блеском или без него на среде Эндо и фиолетовым или черным цветом на среде Левина.

7.2.8 У выделенных культур изучают морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства для определения их родовой принадлежности.

При изучении морфологии бактерий мазки окрашивают по Граму.

7.2.9 Ферментативные свойства изучают с помощью набора питательных сред, куда входят среды с лактозой, маннитом, цитратно-аммонийная среда Симмонса, желатина и одна из следующих сред: агар с лактозой и серноокислым железом, или среда Клиглера, или среда Олькеницкого – на среды с лактозой и мочевиной (см. приложение А).

Родовую (видовую) принадлежность культур определяют по таблице 1.

При получении результатов, которые не позволяют идентифицировать род выделенной культуры по вышеуказанным тестам, для уточнения используют дополнительные тесты: расщепление мочевины, реакции с метилротом и Фогеса – Проскауэра.

7.2.10 Возбудитель колибактериоза, протекающего у поросят в форме отечной болезни, как правило продуцирует β-гемолизин. Способность продуцировать β-гемолизин определяют путем посева культур на МПА или МПБ с кровью в соответствии с 7.2.7.

Если культура обладает гемолитическими свойствами, бульон приобретает цвет гемолизированной крови с окраской всего столбика бульона или части его. На МПА с кровью вокруг выросших колоний образуется бесцветная зона гемолиза.

Таблица 1- Дифференциация энтеробактерий по ферментативным свойствам

Тест для первичной дифференциации	Род/вид бактерий												
	Escherichia coli	Salmonella кроме S. arizonae	S. arizonae	Citrobacter	Klebsiella	Enterobacter		Hafnia	Proteus (по Берги, 1974)				
						aerogenes	cloacae		vulgaris	mirabilis	morganii	retgeri	inconstant
Усвоение цитрата на среде Симмонса	-	+	+	+	±	+	+	+	±	+	-	+	+
Ферментация лактозы	+	-	+	±	±	+	+	-	-	-	-	-	-
Ферментация маннита	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	±	-
Разжижение желатины	-	-	±	-	-	±	+	-	+	+	-	-	-
Образование сероводорода	-	+	+	±	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Образование индола	+	-	-	±	±	-	-	-	+	-	+	+	+

Для дополни- тельной диффе- ренциации													
Расщепление мочевины	-	-	-	±	±	±	±	-	+	+	+	+	-
Реакция с метилротом	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Реакция Фогеса- Проскауэра	-	-	-	-	±	+	+	±	±	±	-	-	-

7.3 Определение патогенности выделенных культур эшерихий (постановка биологической пробы)

7.3.1 Патогенные свойства эшерихий определяют путем постановки биологической пробы на белых мышах.

7.3.2 Трех белых мышей массой 14-16 г заражают внутрибрюшенно смесью суспензий агаровых культур, выделенных из двух внутренних органов, в дозе 500 млн. микробных клеток (концентрацию бактерий устанавливают по бактериальному стандарту).

Культуру признают патогенной в случае гибели одной или более мышей в течении 2 сут после заражения.

Паталогический материал для биопробы на колибактериоз не используют.

7.3.3 Патогенные свойства культур эшерихий, выделенных от птицы, могут быть определены также биопробой на цыплятах 4-5 недельного возраста. С этой целью смывов суточной агаровой культуры в дозе 1 млрд. микробных тел заражают трех цыплят внутрибрюшенно. Культуру считают патогенной при гибели в первые 4 дня после заражения одного и более цыплят.

7.4 Серологическая типизация выделенных культур эшерихий

7.4.1 Одновременно с изучением морфологических, культуральных, ферментативных и патогенных свойств бактерий проводят серологическую типизацию культур эшерихий по О-антигену с целью определения принадлежности их к энзоотическим серологическим вариантам.

7.4.2 Культуры эшерихий, обладающие патогенностью для белых мышей (цыплят), серологической типизации не подвергают.

7.4.3 Серологическую О-группу эшерихий определяют при помощи набора типоспецифических агглютинирующих сывороток, выпускаемых биофабрикой.

8 Учет результатов бактериологического исследования

8.1 Бактериологический диагноз на колибактериоз у млекопитающих считают установленным при получении одного из следующих показателей:

при выделении культур эшерихий из двух следующих органов: селезенки, костного или головного мозга без определения их патогенности и серологической принадлежности;

при выделении не менее чем из двух исследованных органов животного культур эшерихий, патогенных для белых мышей или принадлежащих к О-серогруппам, признанным патогенными для животных (т.е. типизируемых агглютинирующими О-кокси-сыворотками, входящими в диагностический набор).



СТ РК 3650-2020

8.2 Бактериологический диагноз на колиэнтеротоксемию (отечную болезнь) пороят считают установленным:

при выделении β -гематологических эшерихий и наличии характерных патологических изменений без определения патогенности и серологической принадлежности;

при выделении β -гематологических эшерихий, вызывающих гибель не менее двух зараженных белых мышей или принадлежащих к O-серогруппам, признанных патогенными для животных (при отсутствии характерных патологоанатомических изменений).

8.3 Положительный бактериологический диагноз на колибактериоз птиц устанавливают при выделении патогенных для цыплят эшерихий из двух следующих органов: костного мозга, крови или печени. При исследовании патологического материала из заведомо неблагополучного по колибактериозу хозяйства постановка биопробы на цыплятах не обязательна.

8.4 При необходимости чувствительность выделенных патогенных эшерихий к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам определяют, руководствуясь [3] и [4].

8.5 Общий срок бактериологического исследования – до 7 суток.

9 Постановка диагноза

Диагноз на колибактериоз в хозяйствах устанавливают на основании анализа клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений и результатов бактериологического исследования патологического материала от павших животных или вынужденно убитых больных животных при отсутствии их гибели, с учетом эпизоотологических данных – возраст заболевших животных, стационарность, массовость поражения и др. (см приложение А).

10 Акт экспертизы (протокол испытания)

По результатам диагностики заболевания при проведении лабораторных испытаний оформляют и выдают акт экспертизы (протокол испытаний) согласно [2].

Приложение А (информационное)

Колибактериоз (эшерихиоз) поражает телят преимущественно в первые 3-5 дн их жизни, поросят – в первые дни и недели жизни, а также в послеотъемный период, ягнят – с первых дней жизни и до 5-7 мес, птицу – в возрасте от 1 до 90 дней и взрослых – в период начала яйцекладки, пушных зверей – в 1-5 дневном возрасте, реже 6-10 дней.

Болезнь характеризуется массовостью заболевания, стационарностью и высокой смертностью. Протекает в септической, энтеротоксемической и энтеритной формах. При последних двух формах возбудитель локализуется только в желудочно-кишечном тракте и брыжеечных лимфатических узлах, регионарных пораженным участкам кишечника.

У поросят отъемного возраста колибактериоз протекает в форме отчетной болезни; у птиц – в септической форме и хронически, чаще в виде смешанной инфекции с респираторным микоплазмозом, инфекционным бронхитом, кокцидиозом.

Широкое применение антибиотиков и нитрофурановых препаратов с профилактической и лечебной целями может оказать влияние на течение и формы проявления колибактериоза, вследствие чего у больных животных септическая форма не развивается и обсеменения возбудителем всех органов не происходит.

Клинически колибактериоз проявляется профузным поносом, признаками тяжелой интоксикации, обезвоживанием организма, нарастающей депрессией и иногда артритами и признаками поражения центральной нервной системы (судороги, параличи). У телят колибактериоз может развиваться и без признаков диареи. У поросят отъемного возраста отечная болезнь характеризуется кратковременным повышением температуры тела в начале заболевания, затем снижением ее до нормы, развитием отеков подкожной клетчатки век, носовой части головы, подчелюстного пространства, нарушением координации движения, судорогами, порезами, параличами, застойной гиперемией кожи пяточка, ушей, конечностей и живота.

У щенков пушных зверей – диарея с выделением жидкого желтовато-зеленого кала с пузырьками газа и слизью, вялость, реже с признаками поражения центральной нервной системы (возбуждение, судороги, затем угнетение).

Патологоанатомические изменения характеризуются главным образом катарально-геморрагическим воспалением тонкого отдела кишечника и прямой кишки. Кроме того, в разной степени выраженности могут иметь место следующие изменения: точечные кровоизлияния под капсульной селезенки без ее увеличения; под эпикардом и на эндокарде кровоизлияния – точечные, полосчатые или пятнистые; очаговая катарально-геморрагическая пневмония.

При отечной болезни поросят устанавливают отек век, конъюнктивы, подслизистой части кардиальной зоны желудка, подкожной клетчатки в области затылка, верхней части шеи, подчелюстного пространства, у основания ушей; серозную инфильтрацию и застойную гиперемия слизистой оболочки верхних дыхательных путей; студенистую инфильтрацию стенки желудка; геморрагическое воспаление слизистой оболочки желудка; серозно-фибринозный выпот в грудной и брюшной полостях; отек легких; инфильтрацию серозной оболочки брюшины и кишечника; увеличение мезентериальных лимфатических узлов, мраморность их окраски.

У щенков пушных зверей – катаральный гастроэнтерит, гиперемия и отек легких, дистрофию печени, гнойный менингоэнцефалит.

Возбудитель колибактериоза – грамотрицательные палочки, не образующие спор, в мазках располагающиеся одиночно, иногда образующие нитевидные формы, могут более интенсивно окрашиваться по концам (биполярно). В жидких средах эшерихии вызывают



СТ РК 3650-2020

интенсивное помутнение, на плотных – образуют колонии круглой формы, сочные, блестящие, выпуклые, гладкие, с ровными краями.

Типичные колонии эшерихий (S –форма) характеризуется круглой формой, гладкой, выпуклой или слегка приподнятой в центре поверхностью, ровными краями, розовым, красным или малиновым цветом с металлическим блеском или без него на среде Эндо и фиолетовым или черным цветом на среде Левина.

Эшерихии не утилизируют цитраты (не растут на среде Симмонса и не изменяют ее цвет), ферментируют лактозу и маннит, не разжижают желатину, не образуют сероводород на сахарном агаре с сернокислым железом, среде Клигера и Олькеницкого (пользоваться для определения образования сероводорода индикаторной бумажкой, опущенной в пробирку м МПБ, нельзя во избежание получения ложноположительных результатов), образуют индол (вызывают покраснение индикаторной бумажки, помещенной в пробирку с сахарным агаром и сернокислым железом, средой Клигера, Олькеницкого или МПБ), даю положительную реакцию с метилротом и отрицательную Фогеса – Проскауэра, не расщепляют мочевины (см таблицу 1).

Энзоотические вспышки колибактериоза наиболее часто вызывают патогенные эшерихии следующих О-групп: 08, 09, 015, 020, 026, 078, 086, 0101, 0119, 0141, реже 033, 02, 035, 041, 0103, 0115, 0117, 0127, 0137, - у телят; 08, 026, 0101, 0138, 0139, 0141, 0142, 0147, 0149 у поросят; 08, 09, 015, 020, 035, 041, 078, 0101, 0137 – у овец; 01, 02, 055, 08, 015, 026, 078, 0111, 0115, 0119, 0141 у птиц. У названных видов животных в отдельных случаях возможны заболевания, вызванные эшерихиями других серогрупп.

E. coli содержат три типа антигенов: О, К и Н. О-антиген – соматический, термостабильный, локализуется в основном в цитоплазме и цитоплазматической мембране. По О-антигену в настоящее время известны 163 серологических группы эшерихий, К-антиген включает три вида поверхностных (оболочечных или капсульных) антигенов, которые обозначаются L, В и А. L и В-антигены термолабильные, находятся в оболочке бактерии; А-антиген более устойчив к прогреванию, присутствует у капсулообразующих разновидностей. Одна микробная клетка обычно содержит только какой-нибудь один из трех поверхностных антигенов. Н-антиген – жгутиковый, термолабильный, содержится у подвижных разновидностей эшерихий.

Поверхностные (L, В, и А) антигены препятствуют О-агглютинации. Поэтому для их разрушения культуры необходимо инактивировать кипячением при 100 °С в течение 1 ч (для разрушения L – и В-антигенов) или автоклавированием в течение 2 ч (для разрушения А-антигена).

Библиография

[1] Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 30 апреля 2015 года № 7-1/393 «Об утверждении Правил отбора проб перемещаемых (перевозимых) объектов и биологического материала».

[2] Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 16 января 2015 года № 7-1/19 «Об утверждении Правил выдачи акта экспертизы (протокола испытаний)».

[3] Санитарные правила «Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества», утвержденные приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 8 сентября 2017 года № 684.

[4] Методические указания по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных», утвержденными ГУВ МСХ СССР 30 октября 1971 г.



СТ РК 3650-2020

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОЛУМРУЕТ"
СТ РК 3650-2020 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан

МКС 07.100.01

Ключевые слова: животные, птица, колибактериоз, диагностика, выделение, посев, типизация, колония, антиген, возбудитель, культура

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

СТ РК 3650-2020 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 метрология институты» республикалық мемлекеттік
кәсіпорны 010000, Нұр-Сұлтан қаласы, Мәңгілік Ел даңғылы, 11 үй
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8(7172) 98-06-42, 44-64-50