

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Москва — 1985 г.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Главное санитарно-эпидемиологическое управление

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Москва - 1985 г.

Методические рекомендации разработаны Московским ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательским институтом гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана (д.м.н. Г.П.Калина, к.м.н. Л.М.Виноградова, к.м.н. Г.М.Трухине).

Методические рекомендации рассмотрены Лабораторным Советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР и рекомендованы к утверждению.

Рекомендации предназначены для использования в практике бактериологических лабораторий гигиенического и эпидемиологического профиля научно-исследовательских институтов, медицинских институтов и, по показаниям, республиканских, краевых, областных и городских санитарно-эпидемиологических станций,

"УТВЕРЖДО"

Начальник Главного санитарно-эпидемиологического управления Министерства здравоохранения СССР

Рубцов → В.Е.Ковыло

"14 августа 1985 год

№ 3923-85

**Методические рекомендации
по идентификации грамотрицательных неферментирующих
микроорганизмов.**

I. Введение.

В последние годы внимание гигиенистов и эпидемиологов привлекает обширная группа грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов /НФМ/, широко распространенная в объектах окружающей среды. Доказана патогенность от них /*Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Moraxella laevigata*/ и роль в патогенезе заболеваний человека и животных других НФМ / *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Aeromonas hydrolyticans*, *Bordetella rufae*^{Лебедев}/ Однако, частое нахождение многих из них в кишечнике человека свидетельствует о возможном их индикаторном значении.

Поэтому возникла необходимость в систематике НФМ, а также упрощенных и доступных для широких исследований идентификации микроорганизмов, обнаруживаемых при исследованиях поверхностных и подземных вод, вод централизованного водоснабжения, сточных жидкостей, почвы, омызов с предметов окружения больных в лечебных учреждениях и в патологическом материале. В основу идентификации положено симметризирование признаков по степени их значения, дополненное тестами, необходимыми

в отдельных случаях для более четкой идентификации того или иного НФМ, имеющего медицинское и (или) санитарное значение, и для дифференциации последних от хемолитотрофных и сапрофитных НФМ, широко распространенных в воде и почве. В предлагаемом виде с данным набором ключевых признаков и количеством идентифицируемых НФМ предлагаемая схема разработана в СССР впервые.

I. Лабораторное оборудование, реактивы, материалы.

I.I. Основы питательных сред.

I.I.1. Агар микробиологический. ГОСТ И7206-71.

I.I.2. Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия И71-81.

I.I.3. Молоко коровье пастеризованное. Технические условия И3277-79.

I.I.4. Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей.

Технические условия И3805-76.

I.2. Реактивы.

I.2.1. I-нафтол. Технические условия 5638-79.

I.2.2. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия И99-78.

I.2.3. Реактивы. Калий гидроокись. Технические условия 24363-80.
(СТ ГЭВ И439-78).

I.2.4. Диметил-пара-фениллендиамин ТУ 6-09-18-28-72.

I.2.5. Калий азотнокислый. Технические условия 4217-77
(СТ САВИ697-79).

I.2.6. Аммоний щернокислый. Технические условия 3769-78.

I.2.7. Калий сернокислый. Технические условия 4145-74.

I.2.8. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия 4523-77.

I.2.9. Тетраметил-пара-фениллендиамид ТУ 6-09-18-28-72.

I.2.10. Калий фосфорнокислый однозамещенный. ТУ 4198-76.

I.2.11. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические
условия 2493-75.

I.2.12. Натрий-аммоний фосфорникиский двузамещенный 4-водный.

Технические условия 4170-78.

I.2.13. Аммоний хлористый. Технические условия 3773-72.

I.2.14. Магний хлористый 6-водный. Технические условия 4209-77.

I.2.15. Натрий лимоннокислый трехзамещенный. ТУ 22280-76.

I.3. Углеводы, спирты.

I.3.1. Д-глюкоза. Технические условия 6038-79.

I.3.2. Глицерин. Технические условия 6259-75.

I.3.3. Ксилоза ТУ 6-09-20-45-77.

I.3.4. Лактоза ТУ 6-09-22-93-79.

I.3.5. Мальтоза ВТУ 257-59.

I.3.6. Спирт этиловый ректифицированный. ТУ 5962-67.

I.4. Красители, индикаторы.

I.4.1. Бромтиоловый синий. ТУ 6-09-20-45-77.

I.4.2. Индикаторы. Феноловый красный. ГОСТ 4599-73.

I.4.3. Хлорид 2-, 3-, 5-трифенилтетразола. ТУ 6-09-38-38-78.

I.5. Лабораторное оборудование, посуда, материалы.

I.5.1. Посуда и оборудование лаборатории, стеклянное. Типы, основные параметры и размеры. ГОСТ 25336-82 Е (СТ СЭВ 2945-81).

I.5.2. Термостат электрический с автоматической терморегулировкой до 60⁰С с термометром ценой деления 0,2⁰С.

I.5.3. Проволока из никелевого и медноникелевых сплавов для удлиняющих проводов к термоэлектрическим преобразователям.

ТУ 1791-54.

2. Питательные среды.

2.1. Среда для определения оксидации и ферментации глюкозы (0/Ф). Перитон 2,0; хлорид натрия 5,0 г; 2-замещенный фосфат калия 0,3 г; глюкоза 10,0 г; агар 4,0-6,0 г; 1,6% щелочного раствора фене-

лового красного 2,5 мл; вода до 1000,0 мл.; рН 7,4-7,6. После растворения ингредиентов разлить в пробирки в количестве, достаточном для получения высоты столбика не менее 6 см (примерно 7,5-8,0 мл.). После стерилизации при 0,5 атм 15 мин, охладить в вертикальном положении. Посев иглой (не короче 6-7 см) уколом до дна пробирки. Инкубация 35-37°C 18-20 часов или 30°C 42-44 часа. Пожелтение всего столбика-окисление и ферментация нейтрогениты (+/+), пожелтение только верхней части столбика, иногда всего 1,5-2,0 см. от поверхности, окисление без ферментации (+/-), отсутствие пожелтения всего столбика и, как правило, щелочение (малиновый цвет) поверхности среди - отсутствие ферментации и окисления (0/0). В некоторых случаях наблюдается пожелтение нижней половины столбика при малиновой краске верхней, что может быть следствием высокой протеолитической активности, в результате чего образованием кислоты за счет окисления гликазы сменяется щелочением в результате интенсивного расщепления липтона.

2.2. Определение нитратазной активности. Нитрон 20,0 г; хлорид натрия 5,0 г; нитрат кальция 2,0 г; агар 1,0-3,0 г; жидкий дрожжевой экстракт 200,0 мл; вода до 1000,0 мл. Разлить по 4-6 мл в пробирки, стерилизовать при I атм. 20 мин. Посев уколом до дна пробирки. Процесс восстановления нитрата может идти с различной глубиной реакции - от восстановления нитрата в нитрит, до редукции последнего до выделения свободного азота. Нитрат-редуктазная активность способствует утилизации киородона в анаэробных условиях и диффузному росту нитратаз-активных НКМ в среде. Неактивные НКМ растут в этой среде лишь на поверхности в виде более или менее толстой пленки. При завершении редукции нитрата и нитрита до конечного этапа - образования свободного азота, в среде данного состава в толще и на поверхности образуются пузырьки газа - при 0,1% агара в виде обильной пени, при 0,3% - в толще среды. Реакцию можно

согласиться с определением способности роста при 42⁰С, но учитывая, что некоторые НМ не способны расти при этой температуре или продуцировать свободный азот, необходимо дублировать посев с инкубацией при 30-35⁰С. Выделение свободного азота в более ранние сроки (через 4-5 часов после посева, но не позже) можно определить, используя феномен "раскаленной патлы", погружение которой в среду вызывает интенсивное освобождение азота в виде пузырьков газа или пенки на поверхности среды.

2.3. Оксидация углеводов (мальтозы, ксилозы, сахарозы) и других С-содержащих компонентов. Пентон 2,0; хлорид натрия 5,0 г; углевод 2,0 г; 1,6% щелочная раствор бромтиолового синего 5,0 мл; агар 12,0 *; вода до 1000,0 мл., pH 7,2-7,4. После стерилизации при 0,5 атм 15 мин, разлить среду в чашки. Посев макроколониями (12-18), инкубация при 35⁰С 18-20 часов или 30⁰С до 2 суток. При определении оксидации лактозы концентрацию последней увеличивают до 10% и длительность инкубации до 2-7 суток при 35⁰С и до 4-7 суток при 30⁰С.

2.4. Определение желатиназной активности. Питательный агар 1,2% (масляночный или обратный порошковый) 1000,0 мл; желатин 200,0 г; стерилизация при 0,5 атм 15 мин, разлить в чашки нетолстым слоем (не более 15 мл в чашку). После застыивания среды ее поверхность залить тонким слоем 2% агара на дистilledированной воде. Посев макроколониями (блочкиами) в количестве 12-18. Инкубация при 35⁰С 1-2 суток или при 30⁰С 2-3 суток. Положительный результат - зона помутнения вокруг колоний.

2.5. Определение продукции феназина (смесь пигментов - плющанина, плорубина, меланина и др.) (среда Кинг-А), Пентон 20,0 г; агар 12,0 г; глицерин 10,0 г; сульфат калия 10,0 г; хлорид магния

* Во всех случаях, при отсутствии специального указания, применяется агар-агар, но не сухой питательный агар фабричного производства.

1,4 г; вода до 1000,0 мл., рН 7,2. Посев макроколониями на чашках. Инкубация 25°C 18-24 часа. Продукция феназинов разных оттенков, от бурого (сочетание рубрина с цианином) до отчетливо зеленого или красного, в зависимости от преобладания того или иного феназина. Пиомеланин может проявляться в виде темнокоричневого или черного окрашивания, но феномен наступает обычно поздно (многда на 7-14 сутки).

2.6. Определение утилизации С и N содержащих соединению. Рассматривают два типа обменных процессов, свойственных НФМ. При первом углерод и азот утилизируются микроорганизмом в среде ограниченного минерального состава, при втором базовая среда должна быть полноценной, содержать те или иные факторы роста, высокопитательные вещества или нативные животные белки.

2.6.1. Состав базовой минеральной среды ограниченного состава может быть различным, от сложных наборов большого количества разных солей до простых, содержащих немногие органические, типа среды Козера или Симмонса. Может быть рекомендован следующий комплекс солей: Однозамещенный фосфат калия 1,5 г; сульфат магния 0,02 г; ^{фосфат алюминия 0,05 г;} хлорид натрия 0,5 г; ^{Углерод I,2 г;} 1,6% щелочной раствор бромтимолового синего 0,5 мл; вода 1000,0 мл. После растворения стерилизовать при 1,0 атм 20 мин, хранить в холодильнике, применять по мере надобности, прибавляя разные источники углеродного питания к 100,0 мл базовой среды: по 5 мл стерильных водных растворов 10% гликозы, 6,0% щелочного натрия или цитрата натрия, 10% различных углеводов. Этанол прибавлять перед разливкой в чашки в количестве 1,2% для определения кислотообразования или 0,3 мл для определения утилизации. Посев разных штаммов макроколониями (блочкиами) до 12-18-24 в чашке.

2.6.2. Базовая среда для второго типа метаболизма может быть различной для разных НФМ. Основная минеральная база аналогична ре-

используемой в п.2.6.1. Дополнительно могут быть введены метионин (0,2-0,3%), дрожжевой экстракт (0,3%), различные аминокислоты (также до 0,3%); некоторые НФМ нуждаются в полноценных средах, типа сердечно-мозгового настоя, иногда в нативных животных белках - крови, кровяной сыворотке в обычно принятых для таких сред концентрациях. Подбор для каждого НФМ необходимых компонентов сложен, затрудняет процесс идентификации; кроме ограничиться констатацией отсутствия роста и изменения реакции среды в минеральной среде с глюкозой для сахаролитов (кислая реакция в положительном случае) и с ацетатом натрия для щелочеобразователей (щелочная реакция в положительном случае).

2.7. Определение уреазной активности. Может быть использована синтетическая минеральная среда (п.2.6.1.) с заменой источника азотного питания мочевиной в количестве 0,1% и уменьшением содержания глюкозы до 0,1%. Определение в чашках посевом макроколоний. При интенсивной уреазной реакции деление подлежащего слоя среды наступает уже через 3-4 часа после посева, в умеренной реакции - через 16-18 часов. Целесообразно после 3-4 часовом инкубации при 30-35°C чашки до следующего утра оставлять при комнатной температуре.

2.8. Определение металлического блеска. Сухой питательный агар порошковый Дагестанского производства 2060; пентон 10,0; вода до 1000,0 г. После стерилизации при I эти 20 мл внести 100,0 мл стерильного снятого молока, 50,0 мл 10% водного раствора хлорида трифенилтетразола (ТТХ) (самостерилизуется при комнатной температуре в течение 2-3 суток), смешать и разлить в чашки, по 20-25 мл. Посев макроколониями. После инкубации при 35-37°C в течение 22-24 часов на поверхности макроколоний появляются золотистые вкрашения. При данном составе среды - реже вся поверхность макроколоний покрыта золотистым налетом. При отрицательном результате следует

поддерживать посевы на среду при комнатной температуре 2-3 суток.

3. Реакции и реактивы.

3.1. Оксидазные реакции.

3.1.1. Реакция оксидазы по Ковачу. Реактив: тетраметил-пара-фениллендиамин хлорид 0,5 г; вода 100,0 мл. Реактив наносить платиновой или никромовой петлей на колонию (макроКолонии). Положительная реакция - порозование, а затем окрашивание в глубокий фиолетовый цвет. Альтернативно - пропитать фильтровальную бумагу реактивом и наносить на нее микробную массу из макроКолонии. Положительный результат тот же.

3.1.2. Реакция Цитохромоксидазы по Гэби и Хедли. Реактивы: А) алфа-нафтол 1,0 г; этанол 100,0 мл; Б) диметил-пара-фениллендиамин хлорид (или оксалат) 2,0 г; вода 100,0 мл. Реактивы хранить раздельно в холодильнике, смешивать небольшими порциями непосредственно перед употреблением. Способы применения те же, что в п.3.1.1. Результат - при положительной реакции колония или микробная масса на фильтровальной бумаге приобретает синий (ультрамариновый) цвет.

3.1.3. Реакции оксидазы по Ковачу рекомендована специально для неферментирующих микроорганизмов; реакция цитохромоксидазы по Гэби и Хедли - как для неферментирующих, так и преимущественно для ферментирующих микроорганизмов (аэромонад, плазмонад, вибриков). В СССР распространен в основном метод Гэби и Хедли (цитохромоксидаза), непревильно трактуемый некоторыми как реакции оксидазы, хотя последний термин должен быть применен к реакции с тетраметил-пара-фениллендиамином. Некоторые микроорганизмы дают различные реакции с тем и другим реактивом (см.таблицу I).

3.2. В некоторых случаях возникает необходимость определить принадлежность изучаемой культуры к грамотрицательной группе. С

Таблица № I.

Систематизированная идентификация грамотрицательных неферментирующих цитохромоксидаза-отрицательных микроорганизмов.

Микроорганизмы	Основные ключевые признаки								Дополнительные признаки							
	Цитохромоксидаза	Ферментация/неферментация	Окисление/разложение макроэтилового спирта	Положительность	Кетогидраты	Окисление ДОЖ лактозы	Нитраты	Свободный азот	Утилизация С в минеральной среде с глюкозой	Утилизация С в минеральной среде с ацетатом натрия	Утилизация С в положительной среде	Рост при 42°C	Утилизация сахара	Гемолиз	Липиды	Пигмент
<i>Bordetella pertussis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	коричневый
<i>Acinetobacter Lwoffii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	+	±	0	+	0	0	Pс	
<i>A. baumanniticus</i> <i>V. alcaligenes</i>	0	0	0	+	P ⁰	0	0	0	-	+	0	+	+	+	+	
<i>Acinetobacter anitratus</i>	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	
<i>A. baumanniticus</i> <i>V. baumanniticus</i>	0	+	0	P ⁰	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	
<i>Xanthomonas</i> <i>Z. sp.</i>	0	+	0	+	P	0	0	0	0	0	+	0			желтый	
<i>Pseudomonas</i> <i>Zimnochroales/</i> <i>halophilic</i>	0	2	0	+	+	0	P ⁰	0	0	+	0	+	0	+	желтый или 0	
<i>Flavobacterium</i> <i>meningosepticum</i>	I	+	0	+	P ⁰	+	±	0	0	0	+	0	0		25° 37° 0 желтый	
<i>Pseudomonas</i> <i>cepacia</i>	0	+	0	+	P ⁰	0	P ⁰	0	P ⁰	+	P	+			желтый или лиловый	
ферментирующие грамотрицательные микроорганизмы	P	+	+	P	A	Z	L	M	C	H	E					

1) Реакция по Ковачу положительно; 2) Может быть замедленная ферментация. P=различно; P⁺=частично положительно; P⁰=частично отрицательно.

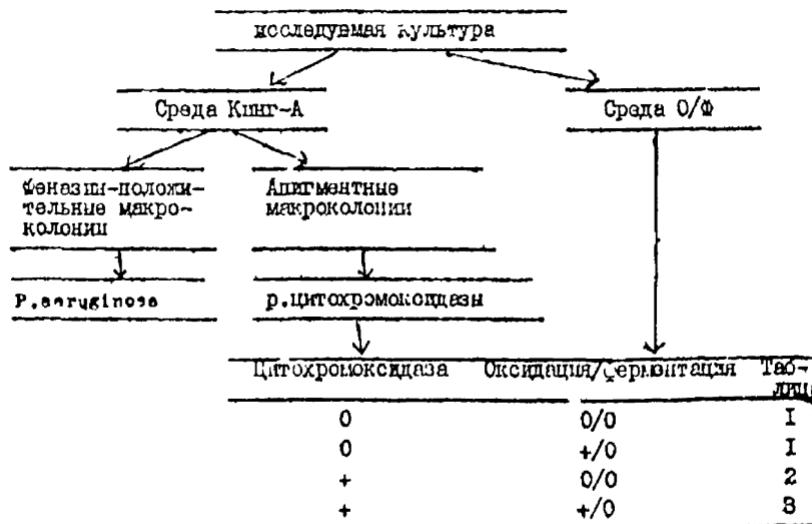
этой цели, микробную массу с свежей агаровой культурой петлей вносят в 3% водный раствор КОН. Грамотрицательные микроорганизмы после нескольких секунд перемешивания массы в растворе ослизывают и за пять дней тянутся трудно отрывающиеся нити. Этот феномен отсутствует у грамположительных микроорганизмов.

4. Систематизированные таблицы ключевых признаков НФМ.

4.1. Обоснование систематизации и подбора ключевых признаков.

При отборе ключевых признаков были учтены основные, имеющие медицинское и санитарное значение, неферментирующие микроорганизмы. Лишь немногие из включенных в набор признаков у некоторых НФМ нестабильны, являясь решающими в отношении других НФМ (например оксидации мальтозы, продукция свободного азота). Принятый набор обеспечивает надежную идентификацию большинства НФМ и лишь для уточнения некоторых необходимы дополнительные тесты.

4.2. Схема последовательной первичной идентификации неферментирующих микроорганизмов.



4.3. Систематизация признаков выявила три основных группы НФМ:

I. Питохромоксидаза-отрицательные, делящиеся на подгруппы

Ia. Не оксидирующие глюкозу (несахаролиты);

Ib. Оксидирующие глюкозу (сахаролиты).

2. Питохромоксидаза-положительные, но не оксидирующие глюкозу.

3. Питохромоксидаза-положительные, оксидирующие глюкозу (сахаролиты).

В подгруппах первой группы и в 2 и 3 группах дальнейшая дифференциация проведена по двум другим решающим ключевым признакам — оксидация мальтозы и подвижности. Комбинации этих четырех решавших ключевых признаков выявляют подгруппу третьего порядка, каждая состоит из немногих видов, дифференциация которых по остальным ключевым признакам и, в отдельных случаях, по дополнительным тестам, не составляет труда. (таблица 2, 3)

4.4. Пользование таблицами. Из п.4.1 следует, что после получения чистой культуры НФМ с селективно-дифференциальной среды и отсева ее на среду Кинг-А для выделения и исключения из дальнейшего изучения феназин-образующих (пигментных). Р.вегенероза, рекомендуется посев макроколониями в чашке, определяется отношение к реакции цитохромоксидазы. Одновременно с посевом на среду Кинг-А производится посев в среду О/Ф. Эти два теста — р.цитохромоксидазы и оксидативно-ферментативная реакция, позволяют определить принадлежность изучаемого микроорганизма к той или иной группе уже через сутки после инкубации при 35-37⁰С или через двое суток после инкубации при 30⁰С. Остальные ключевые признаки могут быть определены одновременно, но в целях экономии труда и сред предпочтительно на втором этапе выявить отношение к мальтозе, подвижность и характер роста на нитратной среде (при 42⁰С и при 35-37⁰С), учитывая диффузное помутнение среды при положительной нитратазной реакции, рост на поверхности среды в виде плотного

Таблица №2

Таблица №2
Систематизированная идентификация Грамотрица гельных нефформенирующих цианоксидаз-демажетильных масел харофилов.

Микроорганизмы	Основные физиологические признаки										Признаки
	Цитохромоксидаза:	Оксидаза/терпен:	Оксидаза/кетогеноз:	Оксидаза/альбумин:	Оксидаза/жир:	Оксидаза/углеводы:	Оксидаза/аминокислоты:	Оксидаза/аминные кислоты:	Оксидаза/углеводы:	Оксидаза/углеводы:	
<i>Bacillus atlanticus</i>	+	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0	Нитратаза
<i>Candida utilis</i>	+	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0	Свободный азот:
<i>Bacillus cereus</i>	+	0/0	0	0	0	P	0	0	+	+	Утилизация С-атомов из нейтральной среды:
<i>Microbacterium</i>	+	0/0	0	0	0	+0	0	+	+	+	Утилизация С-атомов из глюкозы
<i>Bacillus cereus</i>	+	0/0	0	0	0	P+	0	0	0	0	Утилизация С-атомов из жира
<i>Escherichia coli</i>	+	0/0	0	0	0	+0	0	0	+	+	Нагрица
<i>Escherichia coli</i>	+	0/0	0	0	0	+0	0	0	+	+	Нитритаза
<i>Zoogloea illinoiensis</i>	+	0/0	+	0	0	+0	0	0	+	P	Нитратаза
<i>Escherichia coli</i>	+	0/0	0	+	0	0	0	0	+	0	0
<i>Escherichia coli</i>	+	0/0	0	+	0	0	0	0	+	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	0/0	+	0	0	0	0	0	+	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	0/0	+	0	0	0	0	0	+	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	0/0	0	+	0	0	0	+	+	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	0/0	0	+	0	0	0	+	+	0	0
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	0/0	0	+	0	P	0	+	+	+	0
<i>Bacillus branntbacter</i>	+	0/0	0	+	0	I	0	0	+	+	0
<i>Acetobacter xylosoxidans</i>	+	0/0	0	+	0	+P	0	+	+	+	0
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	+	0/0	0	+	0	0	0	+	+	0	0
<i>Pseudomonas</i>	+	0/0	0	+	0	0	0	0	+	+	0
<i>Escherichia coli</i>	+	0/0	0	+	0	0	0	0	+	0	P ⁰

1) Только в средах, обогащенных сывороткой крови или со смесью кишечных бактерий, к проаг. 2) Принимающее свечи-выделение.

10⁵

Таблица № 3
Систематизированная идентификация грамотрицательных неферментирующих цитохромоксидаз-положительных сахаролитов

Микроорганизмы	Основные и ключевые признаки								Дополнительные признаки						
	Цитохромоксидаза	Оксидазы/пероксидазы	УГРПДГЛУД	Положительность	Лактаза	Оксидазы/ДФДЛактозы	Нагротаза	Свободный азот	Углекислота С в минеральной среде с гликоэном	Углекислота С в минеральной среде с ацетатом натрия	Углекислота С в полноценной среде	Рост при 42°C	Углекислота этапола	Золотистый блеск	Пигмент
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	+	0	0	P	0	+	+	+	+	+	0	+	+		
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	+	0	0	+	P ¹	+	+	+	+	0	0	0			
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	Бледно-желтый
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	0	2	P	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	феназин или 0
<i>Pseudomonas putida</i>	+	0	P ⁰	10	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0	флуоресценк
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	0	1	P	0	+	+	+	+	+	0	*	0		флуоресценк
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	0	1	P	0	+	+	+	+	+	0	+	0		бледно-желтый
<i>Paracoccus denitrificans</i>	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0		
<i>Alcaligenes aquamarinus</i>	+	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+				
<i>Zoogloea ramigera</i>	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+					
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	P	0			
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	оранжево-кремовый

1) Примуцистственно-окрашено-виделение
2) Продуцирующие капоулу-неподвижные

кольца при отрицательной интратазной реакции и продуцирован свободного азота), после чего при некоторых комбинациях этих признаков становится излишними остальные тесты, либо намечается необходимость в проведении лишь некоторых из них, а иногда и использование рекомендемых дополнительных тестов.

4.6. При массовых исследованиях могут быть выявлены культуры, не укладывающиеся в предлагаемый набор признаков. В зависимости от обстоятельств, такие варианты подлежат дополнительному изучению (если это вызвано необходимости), либо исключаются в таких случаях, когда с той же селектиро-дифференциальной среды сняты другие колонии, полностью отвечающие той или иной комбинации ключевых признаков и, следовательно, идентифицируемых как той или иной НОМ.

5. Ориентир основных неферментирующих микроорганизмов

5.1. Выложенный в таблицы набор не исчерпывает обилия неферментирующих микроорганизмов, обитающих в окружающей среде. Отобрали лишь имеющее медицинское и (или) санитарное значение НОМ, а также сапрофиты или фитопатогены, от которых их нужно дифференцировать. Характеристика включенных в таблицы НОМ и их ключевые признаки даны в соответствии с литературными данными последних лет и на основании собственного материала. В таблицах представлены роды *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, отдельные представители родов *Bordetella*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* а также *Zoosporea*.
Xanthomonas, *Paracoccus*. В таблицы не включены провизорные группы "M6" и "M6" в роде *Moraxella*, "V4-1", "V4-2", "V4-3" (*Agrobacter radiobacter*) в роде *Achromobacter*, "D6", "D6-2" в роде *Bordetella*, как имеющие лишь единичные ключевые признаки, отличающие их от легализированных видов.

5.2. Род *Pseudomonas* включает 265 видов, из которых по основным свойствам характеризуются 32, не считая фитопатогенных и морских псевдомонад. В таблице включены наиболее часто встречающиеся и имеющие медицинское значение или симулянтические их 10 видов сахаролитов и 6 несахаролитов. Наиболее широкий интерес представляет группа флуоресцирующих псевдомонад — *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. putida*, которые дифференцируются на основании ключевых признаков — глубокой редукции нитратов-нитритов с освобождением свободного азота при 42°C и при 35°C, халатиназной реакции, росте на средах Кинг-А и "блеск". Эти же тесты, как и некоторые дополнительные, могут служить ориентиром после определения основных ключевых признаков — р.цитохромоксидазы, окисление глюкозы и мальтозы, и для остальных представителей рода.

5.3. *Acinetobacter salosaccharicus*. В практических целях удобнее изменять номенклатуру этого единственного вида рода *Acinetobacter*, считая его подвиды за самостоятельные виды: *A.lwoffii*, *A.acitratius*, *A.haemolyticus* (с двумя вариантами — *haemolyticus* и *alcaligenes*). Все они цитохромоксидаза-отрицательны, неподвижны, утилизируют в минеральной среде этанол и, в зависимости от вида, глюкозу и (или) ацетат натрия. Ключевые признаки для *A.acitratius* — окисление 10% лактозы, для *A.haemolyticus* — гемолиз, гидролиз желатина и продукция лецитиназы, для *A.lwoffii* — отсутствие всех этих свойств, но способность утилизировать ацетат натрия и этанол в минеральной среде.

5.4. Род *Moraxella* представлен 7 видами. Общие ключевые признаки: р.цитохромоксидазы положительна, подвижность и окисление глюкозы и других углеводов отсутствует. *M.saloensis* и *M.gethralis* способны утилизировать ацетат натрия в минеральной среде без дополнительных ростовых факторов, различаясь по способ-

ности ассимилировать цитрат натрия, а *M. atlanticus* не утилизирует ни тот, ни другой источник. *C. M. bovis* и *M. lacunata* расщепляют желатин, но последняя для проявления этой активности требует добавления к среде кровяной сыворотки или солей жирных кислот с высоким содержанием атомов углерода (бутират, капрат). *M. bovis* обладает выраженной гемолитической активностью, а при использовании "шоколадного" агара гемолитическую активность проявляет и *M. lacunata*, которая, в отличие от *M. bovis* продуцирует митратазу, как и *M. nonlactic acidens* и в меньшей степени *M. phenylpyruvica*. Последняя деаминирует фенилаланин и триптофан. Спорным является наличие фенилаланин-десминазы у *M. urethralis*. И, наконец, *M. bovis* и *M. lacunata* разжижают свернутую кровяную сыворотку. Провизорная группа "M5" будучи сходной с *M. osloensis* по большинству ключевых признаков, отличается по отсутствию способности утилизировать ацетат натрии в инициальной среде. Группа "M6" отличается от прочих видов моракселлы по отсутствию каталазы.

5.5. *Achromobacter xylosoxidans*, входящий в группу цитохромоксидаза-положительных несахаролитов, единственным в этой группе коситирует ксилозу, особенно четко при 10% концентрации последней. Провизорные группы этого рода "Vd-1", "Vd-2" и "Vd-3" (*Agrobacter radiobacter*) отличаются от *A. xylosoxidans* по энергичной уреазной активности, последние две по оксидации сахарозы, мальтозы и маннита.

5.6. *Flavobacterium menippeovigilans* отличается от сходной с ним по другим признакам *Pseudomonas aeruginosa* по отсутствию оксидации сахарозы, а от сходных видов рода *Achromobacter* и провизорной группы "I" по оксидации маннита. Для этого НСМ, как и для *P. maltophilia* и *P. aeruginosa* характеров двойное отношение к оксидазной реакции: они положительны по оксидазе и отрицательны по цитохромоксидазе.

5.7. Виды рода *Bordetella* в зависимости от катехор-
моксидазной реакции расположены в первой и второй таблицах. Отличия
их от сходных НМ других родов даны в таблицах. Вид *B. pertussis*
исключен из таблицы, как требующий особых методов культивирования.
Для *B. bronchiseptica* характерна высокая уреазная активность
(гидролиз мочевины в первые 4 часа инкубации) и отсутствие утилизации
цитата натрия в минеральной среде (потребность в дополнитель-
ных факторах роста), в отличие от провизорной группы "Г-2е",
носимой рацидальной цитрат натрия. Провизорная группа "Г-е" отличает-
ся от *B. bronchiseptica* по редукции нитрата до образования
свободного азота.

5.8. Наиболее распространенный и изученный вид рода *Aleli-*
zaden - *A. faecalis*, отличается от сходных с ним *P. acidovirans*
по утилизации цитата натрия, а от *B. bronchiseptica* по от-
сутствию уреазной активности. Виды *A. odogena* и *A. lecaneficans*
объединены в таблице 2 с *A. faecalis*, поскольку ключевыми
признаками этих видов (по Вагану - синонимов *A. faecalis*
служат нитратазная активность и выделение при редукции нитрата,
(*A. lecaneficans*) или нитрита (*A. odogena*) свободного
азота. Однако, нитратаза обнаружена и у 43-82% *A. faecalis*
свеже выделенные штаммы которого могут также выделять свобод-
ный азот. Виды *A. paragatica*, *A. enterophitica* и *A. aquimarinina*
необычны по оксидации глюкозы, а последний и мальтозы, и включены
в таблицу 3 как подлежащие дальнейшему изучению в позиций их
принадлежности к роду *Pseudomonas* (сходство в строении
ДНК).

ЗАКЛЫЧЕНИЕ

В целях облегчения идентификации выделенных при исследовании объектов окружающей среды грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов (НМ), представляющих медицинский (эпидемиологический) и санитарный (гигиенический) интерес, предлагается наиболее существенные ключевые признаки, систематизированные по основным решениям ключевым признакам на группы: 1. Цитохромоксидазо-фагоцидателей НМ; 2. Цитохромоксидаза-положительных не окисляющих глюкозу (несахаралитов) НМ и 3. Цитохромоксидаза-положительных, окисляющих глюкозу (сахаралитов) НМ, с подразделением в каждой группе на основе окисления мальтозы и подвижности на подгруппы и с последующим использованием других ключевых признаков. Применение такой систематизированной идентификации, основанной на избогащом наборе тестов, позволит ориентироваться в большом количестве разнообразных по своим свойствам НМ и дифференцировать их от сапрофитарных и хемолитстрофических НМ, обитающих в воде и почве.

Достаточность данного набора ключевых признаков для идентификации основных, имеющих медицинское и санитарное значение неферментирующих микроорганизмов, обоснована изучением большого количества штаммов НМ, выделенных на протяжении трех лет из воды и поверхностных водоемов, сточных жидкостей и объектов окружающей среды в лечебных учреждениях.

Ограниченный набор приспособленных для идентификации НМ методов и питательных сред, не требующих специального лабораторного оборудования, дефицитных, импортных или дорогостоящих реактивов и материалов, может быть использован не только в лабораториях научно-исследовательских институтов и кафедр гигиенического и эпидемиологического профиля, но и в санитарно-эпидемиологических организациях по соответствующим показаниям.

л 44478-1 от 20.10.86 г. № 14866 Тип ГС

Типография Министерства здравоохранения СССР