МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ПОМОЩИ ДЕТЯМ И МАТЕРЯМ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ ГРУДНОГО МОЛОКА

г. Москва, 1984 г.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ПОМОЩИ ДЕТЯМ И МАТЕРЯМ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

По бактериологическому контролю грудного молока

г.Москва, 1984 г.

Методические рекомендации подготовлены сотрудниками:

Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Минздрава СССР (директор Покровский В.И.),

Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Минздрава РСФСР (директор Никитин Д.П),

Центрального ордена Ленина института усовершенствования врачей (ректор Ковригина М.Д),

Московского ордена Трудового Красного Знамени НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РСФСР (директор Вельтищев Ю.Е),

Главным управлением здравоохранения Мосгорисполкома.

Министерствам здравоохранения Союзных республик разрешается размножить методические рекомендации в необходимых количествах.

" Утверждаю"

Начальник Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР

СЕРГИЕВ В.П.

26.IV.64г.

"УТВЕРЖДАЮ "

Начальник Главного управления лечпрофпомощи детям и матерям Минздрава СССР

И.И.ГРЕБЕШЕВА

№ ---- от 27 апреля 64г.

11-14/9-6

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ ГРУДНОГО МОЛОКА

В настоящее время в связи с высоким уровнем заболеваемости женщин маститом в послеродовом периоде повышается возможность передачи возбудителя инфекции ребенку с грудным молоком. Этиология маститов может быть различной, однако, ведущее значение до настоящего времени остается за *S. aureus*.

В ряде случаев после проведения соответствующего лечения при сохранении у женщины лактации встает вопрос о возможности возобновления грудного вскармливания. Решение этого вопроса возможно лишь после проведения бактериологического исследования грудного молока, позволяющего установить количественный и качественный состав выделенных микроорганизмов.

Кроме того, в последние годы показана возможность выделения *S. aureus* и *S. epidermidis* в массивном количестве из грудного молока практически здоровых женщин, что может иметь значение при отборе доноров. Эпидемиологическая оценка этому явлению до настоящего времени не дана. С одной стороны, нельзя исключить того обстоятельства, что вскармливание ребенка молоком, содержащим стафилококки, может привести к возникновению у него различных, и, в первую очередь, кишечных проявлений стафилококковой инфекции. С другой стороны, далеко не во всех

случаях обнаружение в молоке этих микроорганизмов является показанием к отмене грудного вскармливания.

Общеизвестно, что в последние годы в этиологии послеродовых инфекционных заболеваний значительно возросла роль так называемых условно-патогенных представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Streptococcaceae, Pseudomonadaceae* (эндометрит, пиелонефрит, флебит, кишечные заболевания). Принципиальная возможность выделения представителей этих семейств с грудным молоком показана работами отечественных и зарубежных исследователей.

Все сказанное свидетельствует о необходимости введения критериев оценки эпидемиологической опасности микробной обсемененности грудного молока женщин с целью определения противопоказаний к возможности грудного вскармливания ребенка.

Настоящие методические указания предназначены для врачей - бактериологов санитарно-эпидемиологических станций и лечебно-профилактических учреждений, педиатров и хирургов.

Издание данного документа диктуется необходимостью унифицировать бактериологические методы исследования грудного молока и выработать единые подходы к оценке полученных данных.

ОБСЛЕДУЕМЫЕ КОНТИНГЕНТЫ

Обязательному бактериологическому контролю подлежит грудноем молоко:

I. Доноров грудного молока. Обследование проводится однократно перед зачислением женщин в группу доноров. Предварительно женщина обязана пройти клинический осмотр у врача женской консультации.

2. Женщин, переболевших любой формой мастита, а также различными инфекционно-воспалительными заболеваниями с локализацией на молочной железе и вне ее (трещины, сосков, эндо-

метрит, флебит, острые кишечные заболевания и др.) после клинического выздоровления.

3. Женщин, имеющих детей первых двух месяцев жизни с упорными диареями и тяжелыми формами гнойно-септических заболеваний (сепсис, деструктивная пневмония, остеомиелит, абсцесс, псевдофурункулез, флегмоны).

Для проведения бактериологического исследования грудного молока женщине выдается направление на бланке детского лечебного учреждения, в котором указываются: I. фамилия, имя, отчество; 2. Диагноз матери (в случае ее болезни); 3. диагноз ребенка (в случае его болезни); 4. дата выздоровления матери; 5. цель исследования.

МЕТОД ЗАБОРА МОЛОКА

Отбор проб грудного молока производится в базовой поликлинике или больнице в специально выделенном помещении, в котором должны быть лабораторный стол, холодильник, умывальник, бактерицидные лампы.

В день обследования утром женщина принимает душ и надевает чистое белье. Перед сцеживанием молока она моет руки с мылом, тщательно обрабатывает соски и околососковую область молочных желез отдельными ватными тампонами, смоченными 70^{0} этиловым спиртом (каждая железа обрабатывается отдельным тампоном). Молоко из правой и левой молочной желез исследуется также отдельно. Первые 5-I0 мл сцеженного молока выливаются, последующие 3-4 мл сцеживаются в стерильные пробирки. Пробирки закрывают стерильными ватными пробками и в таком виде доставляют в лабораторию. Следует стремиться к тому, чтобы от момента сцеживания молока до начала его исследования проходило не более 3 часов. В течение этого времени пробирки хранятся в холодильнике.

Молоко, сцеженное накануне, исследованию не подлежит. Доставленное в лабораторию молоко засевают на ряд селективных питательных сред (см. раздел схема бактериологического исследования).

ВЫДАЧА ОТВЕТА

В ответе необходимо указать:

I. Вид выделенных микробов;

2. массивность обсеменения ими молока, взятого отдельно из правой и левой грудной железы (немассивный рост - менее 250 КОЕ в I мл, массивный рост - 250 и более КОЕ в I мл). (КОЕ - *колониеобразующая единица*).

Рекомендации по вскармливанию в ответе бактериолога не даются. Окончательный ответ выдается на 4-5 день.

По просьбе педиатра предварительно может быть выдан ориентировочный ответ на 2-3 сутки.

Ориентировочный ответ выдается после определения массивности и характера роста на дифференциально-диагностических средах; определения морфологии, тинкториальных свойств, постановки *каталазного и цитохромоксидазного тестов*.

ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ВРАЧОМ-ПЕДИАТРОМ

I. Для доноров грудного молока

Женщина не может быть донором:

а) при обнаружении массивного роста *S. aureus* ;

б) при повторном выделении даже единичных колоний представителей семейства: *Enterobacteriaceae* или вида *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Для женщин, переболевших любой формой мастита, а также различными инфекционно-воспалительными заболеваниями с лока-

ливанией на молочной железе или вне ее (трещины сосков, эндометрит, флебит, острые кишечные заболевания, пиелонефрит), имеющих здоровых детей.

Кормить нельзя в следующих случаях:

а) при обнаружении в молоке массивного роста *S. aureus*

б) при повторном выделении даже единичных колоний представителей семейства *Enterobacteriaceae* или вида *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Для матерей, дети которых больны гнойно-септическими заболеваниями или диареями различной этиологии.

При отсутствии у ребенка кишечных поражений кормить нельзя:

а) при обнаружении в молоке массивного роста *S. aureus*

б) при повторном выделении даже единичных колоний представителей семейства *Enterobacteriaceae* или вида *Pseudomonas aeruginosa*.

При наличии у ребенка кишечных поражений кормить нельзя:

а) при обнаружении в молоке массивного роста стафилококков любого вида;

б) при повторном выделении единичных колоний представителей семейства *Enterobacteriaceae* или вида *Pseudomonas aeruginosa*.

Если результаты анализов из правой и левой молочных желез отличаются, то тактика врача определяется данными худших показателей.

Следует иметь в виду, что окончательно решать вопрос о возможности грудного вскармливания в каждом конкретном случае, выходящем за рамки изложенного выше, имеет право педиатр.

Для уменьшения обсемененности молока микробами из рода *Staphylococcus* матери следует рекомендовать прием 1% спиртового раствора хлорофиллипта по 25-30 кап. 3 раза в день в

течение 10-14 дней с последующим повторным бактериологическим анализом молока. Дети за этот период переводятся на искусственное вскармливание в соответствии с возрастом, а матери рекомендуется сцеживать молоко. После повторного анализа молока, который проводится через 10-14 дней, вновь решается вопрос о возможности возобновления грудного вскармливания в соответствии с критериями, изложенными выше.

На период прекращения кормления грудью (10-14 дней), по усмотрению педиатра, можно рекомендовать материнское пастеризованное молоко.

Молоко пастеризуют в молочных бутылочках емкостью не более 200,0 мл предварительно прокипяченных в течение 15-ти минут. Бутылочки с налитым в них грудным молоком закрывают стерильными ватными пробочками и помещают в кастрюлю с водой. (уровень воды в кастрюле должен быть выше уровня молока в бутылочке). Воду нагревают до кипения и кипятят в течение 5 минут. Бутылочки с молоком после пастеризации остужают и хранят в холодильнике при +4°С не более суток. Перед кормлением молоко подогревают на водяной бане.

СХЕМА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ГРУДНОГО МОЛОКА

Первый день

Исследуемые пробы молока в количестве 0,2 мл засевают на селективные солевые среды (желточно-солевой или молочно-солевой агар) для выделения микробов рода *Staphylococcus* на среду Эндо для выделения представителей семейства *Enterobacteraceae* и вида *Ps. aeruginosa* *.

---

* При подозрении на возможность обнаружения в молоке представителей других семейств микроорганизмов производится посев дополнительно на кровяной или шоколадный агар.

Чашки Петри с засеянным материалом помещают на 18–20 часов в термостат при 37°С.

Второй день.

Просмотр чашек, фиксация в журнале характера и массивности роста колоний. Производится подсчет колоний на чашке. Число выросших колоний умножается на 5 (при посеве 0,2 мл), т.к. массивность обсеменения выражается количеством колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 мл исследуемого молока. В случае наличия в 1,0 мл молока 250 КОЕ и более микробов обсемененность характеризуется как массивная, в случае менее 250 КОЕ – как немассивная. При неоднородном росте регистрируется каждая разновидность колоний отдельно на каждой дифференциально-диагностической среде.

РОД *Staphylococcus*

Колонии стафилококков на солевых средах круглые, слегка выпуклые, маслянистые, блестящие, имеют размеры от 1 до 3 мм в диаметре.

S. aureus в большинстве случаев образует золотистый пигмент различной интенсивности, но может не иметь пигмента. *S. epidermidis* и *S. saprophyticus* чаще образуют бесцветные или белые колонии. На желточно-солевом агаре значительная часть штаммов *S. aureus* образует радужный венчик вокруг колоний (положительная лецитовителлазная реакция). Для дальнейшего исследования пересевают на скошенный агар не менее 2-х колоний каждого вида. Пробирки помещают в термостат при 37°С на 18–20 часов.

СЕМЕЙСТВО *Enterobacteriaceae*

Колонии семейства *Enterobacteriaceae* на среде Эндо выпуклые с правильными очертаниями круга более или менее мутные;

они могут быть окрашенными в красный цвет с наличием металлического блеска или без него (лактозоположительные), бесцветными (лактозоотрицательными), могут приобретать розовый или серовато-тый оттенок с более или менее выраженным темным центром.

Диаметр и окраска колоний могут варьировать не только в зависимости от родовой принадлежности, но и от массивности роста. В среднем диаметр колоний составляет 1–2 мм, мелкие росинчатые бесцветные колонии характерны для *Yersinia enterocolitica* *. Колонии рода *Shigella* , неряющихся представителей рода *Proteus* , родов *Hafnia* , *Salmonella* чаще имеют небольшие размеры; *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris* дают вуалеобразный рост, а представители родов *Klebsiella* и *Enterobacter* чаще образуют сочные, слизистые розовые колонии диаметром 2–3 мм. По две колонии каждой разновидности засевают обычным порядком в пробирки с комбинизованными средами (Клиглера, Олькеницкого или трехсахарную среду, модифицированную в Московской городской СЭС). При использовании среды Клиглера одновременно делают посев тех же колоний в среду с мочевиной по Преусу или в среду Кристенсена с мочевиной. При использовании комбинированных сред в состав которых входит мочевина, дополнительный посев в названные среды с мочевиной также желателен, поскольку дает более надежные результаты, в частности при изучении представителей рода *Klebsiella* . Среды Клиглера, Олькеницкого и Московской горСЭС содержат реагенты, необходимые для выявления продукции сероводорода.

ВИД *Pseudomonas aeruginosa*

На чашках со средой Эндо *Ps aeruginosa* растет в виде мелких бесцветных колоний, отличающихся от представителей семейства *Enterobacteriaceae* положительной цитохромоксидазной активностью.

* Такие чашки необходимо дополнительно инкубировать при комнатной температуре еще 18–20 часов.

В случае наличия подобных колоний их отсевают на скошенный питательный агар. Пробирки с отсеянными культурами помещают на 18-20 час. при 37°С.

Третий-четвертый день

РОД *Staphylococcus*

У отсеянных на скошенный питательный агар культур стафилококка в первую очередь изучают морфологию и отношение к окраске по Граму. При наличии в мазках грамположительных кокков правильно-округлой формы, располагающихся гроздьями, кучками неправильной формы или тетрадами, у них определяют плазмокоагулирующую активность в реакции коагуляции плазмы (РПК). Если культура дает пигментированный рост, типичную морфологию, положительную лецитовителлазную реакцию и РПК, она идентифицируется как *S. aureus* и не требует дальнейшего изучения. Если культура не обладает лецитовителлазной активностью, но коагулирует плазму, то при наличии у нее пигмента и типичной морфологии она может быть также идентифицирована как

Если культура обладает лицитовителлазной активностью, но не коагулирует плазму, необходимо повторно поставить РПК. В случае повторного отрицательного результата РПК необходимо определить наличие 1-2 дополнительных видовых признаков: продукцию ДНК-азы, фибринолизина, хлопьеобразующего фактора, ферментацию маннита в аэробных условиях, лизоцимную активность (бактериологу предоставляется право выбора теста). Для ускорения получения ответа повторную постановку РПК и определение других видов их признаков можно проводить параллельно. Культура не коагулирующая плазму, но при типичной морфологии обладающая 2-3 перечисленными свойствами, может быть идентифицирована как *S. aureus* (коагулазонегативный вариант).

В том случае, если культура не относится к виду *S. aureus*, можно думать о принадлежности ее к *S. epidermidis* или *S. saprophyticus*. В этом случае ставят реакции, позволяющие провести межвидовую идентификацию двух указанных видов; определяют способность микроба ферментировать маннит в аэробных условиях, продуцировать фасфатазу и определяют его отношение к новобиоцину (см.приложение). Если исследуемая культура не ферментирует маннит в аэробных условиях, обладает фосфатазой и чувствительна к новобиоцину, то ее следует отнести к *S. epidermidis*. Если исследуемая культура ферментирует маннит в аэробных условиях, не обладает фосфатазой и устойчива к новобиоцину, то она относится к *S. saprophyticus*. Если культура отличается от типичных представителей этих видов стафилококков по одному свойству, она может рассматриваться как вариант того же вида.

СЕМЕЙСТВО *Enterobacteriaceae*

Предварительная идентификация представителей семейства *Enterobacteriaceae* проводится по результатам посева в комбинированные углеводные среды и среды с мочевиной (по Преусу или Кристенсену).

Микробы семейства *Enterobacteriaceae* дают на поверхности скошенной части комбинированной среды влажный, однородный опалесцирующий рост без пигментообразования (за исключением некоторых представителей рода *Serratia*, образующих розово-красный пигмент). Облигатным свойством всех представителей этого семейства является ферментация глюкозы с образованием кислых продуктов, что проявляется в изменении окраски столбика среды (цвет зависит от используемого в среде индикатора, а также интенсивности кислотообразования). Окраска столбика среды не меняется, если выделены такие представители семейства *Enterobacteriaceae*, которые

одновременно с ферментацией глюкозы способны гидролизовать мочевину (на среды Олькеницкого, на трехсахарной среде в модификации МосгорСЭС). В этих случаях кислые продукты ферментации глюкозы нейтрализуются щелочными продуктами гидролиза мочевины.

Неизменная окраска столбика среды, не содержащей мочевины (Клиглера), свидетельствует о выделении микробов, не относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*. Наряду оценкой кислотообразования в столбике учитывают наличие разрывов среды (отслаивания ее от стенок или дна пробирки), что говорит о ферментации глюкозы с образованием газообразных продуктов (*Escherichia, Salmonella, Citrobacter,* и др. (см.табл.I).

Почернение, появляющиеся в средней или в нижней части столбика, имеет место при образовании выделенным микробом сероводорода, что свойственно представителям родов *Salmonella, Citrobacter, Edwardsiella, Proteus (spp. vulgaris, mirabilis) Jersinia.*

Способность ферментировать лактозу (или сахарозу в трехсахарной среде) оценивают по изменению окраски скошенной части комбинированной среды. Обычно лактозоположительными бывают представители родов *Escherichia, Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter*. Ферментация лактозы чаще коррелирует с ферментацией сахарозы. В неясных случаях следует проверить эти свойства путем посева культур в среды Гисса с соответствующими углеводами.

Таким образом, на третий день исследований по результатам посева в комбинированную среду с мочевиной или (лучше) в комбинированную среду и среду с мочевиной по Преду (или по Кристенсену) возможен учет четырех признаков, характеризующих выделенную культуру. После регистрации результатов и микроскопии окрашенных по Граму мазков (представители семейства *Enterobacteriaceae* – грамотрицательные, бесспоровые мелкие палочки) возможно предположительное заключение о родовой принадлежности выделенных микро-

бов (см. табл. I). Для идентификации родовых групп семейства *Enterobacteraceae*, сходных по указанным выше признакам, используют дополнительные тесты, минимально необходимые для установления родовой принадлежности микробов из семейства *Enterobacteraceae* (см.нижнюю часть табл. I). Посев в среду с мочевиной (по Преусу или по Кристенсену) не повторяют, если он был использован на I-ом этапе).

В случае выделения лактозоотрицательной, безгазовой культуры, не гидролизующей мочевины и не образующей сероводород к числу дополнительных родовых тестов следует добавить ацетатный (для идентификации представителей рода *Escherichia* и представителей рода *Shigella*). Если по предварительным данным не исключена принадлежность культуры к роду *Hafnia* или *Jersinia* целесообразно сделать посев в 2 пробирки со средой Кларка, одну из которых оставить до следующего дня при комнатной температуре (см.табл.I)*.

Дополнительным признаком в пользу выделения *Hafnia* может быть особенно бурное образование каталазы (проба с I-3% H_2O_2 на предметном стекле) в сравнении с представителями других родов семейства *Enterobacteraceae*.

Также на четвертый день учитывают результаты посева на цитратную среду Симонса, индолообразование, тест на фенилаланиндезаминазу, гидролиз мочевины (в среде Преуса или Кристенсена), ставят реакцию с метиловым красным и реакцию Фогеса-Проскауэра с культурой на среде Кларка, выращенной при 37°С, а в случае предположения о выделении *Hafnia* и с культурой, выращенной при комнатной температуре. Для представителей рода *Hafnia*, выращенных при 22°С характерна отрицательная реакция с метиловым красным, в отличие от положительной реакции, которая отмечается с культурами, выращенными при 37°С.

* Все тесты следует воспроизводить в соответствии с указаниями, данными в приложении.

Тест на лизиндекарбоксилазу при отрицательном результате (желтое окрашивание в опытной и контрольной пробирке) оставляют, залив стерильным вазелиновым маслом, для дальнейшей инкубации (до 4-х суток). При отсутствии роста и изменения окраски среды Симонса или ацетатной среды окончательный учет откладывают еще на сутки.

Определение по минимальному набору дифференцирующих тестов четырех родовых групп (*Escherichia, Edwardsiella, Hafnia Serratia*), каждая из которых представлена согласно классификации Берги (русский перевод УШ издания, 1980г.) одним видом, позволяет одновременно сделать заключение о виде выделенной культуры *Escherichia coli, Edwardsiella tarda, Hafnia alvei, Serratia marcescens*. Эти подвергают на этом этапе серологическому изучению с поливалентными и ОК-групповыми агглютинирующими сыворотками. При положительных результатах (пробах на стекле) ставят два ряда развернутой реакции агглютинации с живой (для выявления К-антигена) и кипяченой в течение I часа культурой (для определения О-групповой принадлежности) в соответствии с общеизвестными рекомендациями.

идентифицируют по биохимическим реакциям в соответствии с табл. Наличие красного и розового пигмента подтверждает принадлежность культуры к виду *S. marcescens*, но его отсутствие не исключает такого же заключения. Серологическую характеристику указанных бактерий не дают, ввиду отсутствия производственного выпуска соответствующих сывороток.

Ответы о выделении представителей родов *Escherichia, Hafnia Serratia, Ed-wardsiella* в подавляющем большинстве случаев могут быть даны на четвертый день. В табл.I приведены биохимические реакции одного вида из рода *Klebsiella Klebsiella pneum.* Идентификации этого вида (также в типичных случаях) заканчиваются на

четвертый день. Определение К-антигена пока еще не обеспечено производственным выпуском антикапсульных сывороток.

В этот же день культуры, относимые по совокупности биохимических реакций к родам Shigella, Salmonella, Citrobacter, Proteus, испытывают в реакциях с родовыми агглютинирующими сыворотками. Одновременно продолжается биохимическое изучение их в дополнительных тестах, позволяющих провести внутриродовую идентификацию в семействе Enterobacteriaceae (см.табл.2).

В связи с неразработанностью внутриродовой идентификации Erwinia ответ по этой группе ограничивают определением рода.

вид Pseudomonas aeruginosa

На третий день исследования изучают морфологию и отношение к окраске по Граму культур, подозрительных на принадлежность к виду Pseudomonas aeruginosa. В случае обнаружения грамотрицательной цитохромоксидазоположительной культуры, усилия бактериолога должны быть направлены на выявление пигмента пиоцианина. Для этой цели исследуемую культуру засевают на чашку Петри со специальными средами (питательный агар с глицерином или со "средой А") и ставят в термостат на 18–20 час при 37°С. Если через сутки изучаемая культура дает пигментированный рост, обладающий запахом фиалок, и "радужным" лизисом, то можно дать ответ о выделении Pseudomonas aeruginosa. Для подтверждения наличия пигмента пиоцианина ставят пробу с хлороформом. Появление синего окрашивания подтверждает наличие пиоцианина. Определенная часть Ps aeruginosa не образует пиоцианина. Для подтверждения принадлежности беспигментных вариантов к виду Ps. aeruginosa следует поставить ряд дополнительных тестов. Если изучаемая культура дает "радужный" лизис, растет при $t°$ 42°С и при pH-5,6 не растет на 6,5% концентрации NaCl и окисляет глюкозу, то

на 5-е сутки может быть выдано заключение о выделении *Ps aeruginosa*.

Пятый день.

СЕМЕЙСТВО *Enterobacteriaceae*

Учитывая биохимические тесты внутриродовой идентификации (по табл.2), при необходимости повторно оценивают тест на лизиндекарбоксилазу, результаты посева на среду Симонса, ацетатную среду (посевы третьего дня исследования). В случае постановки развернутых рядов агглютинации с *E coli* учитывают результаты.

На основании всей совокупности использованных тестов делают заключение о родовой и видовой принадлежности выделенных культур, а при изучении серологических характеристик о принадлежности к той или иной О-серогруппе или серовару*.

---

* При несоответствии совокупности биохимических характеристик выделенных культур данным, приведенным в таблицах I и 2, проверяют чистоту культуры, а также ее принадлежность к семейству *Enterobacteriaceae* в тесте на цитохромоксидазу (лучше с индикаторными бумажками С Б).

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ГРУДНОГО МОЛОКА

I. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВ

Желточно-солевой агар (ЖСА). К растопленному и остуженному до 45–50°С питательному агару (ПА) с 7,5% *NaCl* (pH 7,2–7,4) добавляют 20% по объему стерильной желточной взвеси (1 желток куриного яйца на 200 мл физиологического раствора). Для лучшего эмульгирования желательно использовать колбы со стеклянными бусами. После тщательного перемешивания среду разливают в стерильные чашки Петри. ЖСА можно хранить в холодильнике в течение нескольких дней.

Молочно-солевой агар (МСА). К растопленному и остуженному до 45–50°С ПА с 7,5% *NaCl* (pH 7,2–7,4) добавляют IO% по объему стерильного молока. Тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри. Среду можно хранить в холодильнике несколько дней.

2. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РОДА

Проба на каталазу. На предметное стекло наносят каплю 3% перекиси водорода и эмульгируют в ней исследуемую культуру. Образование пузырьков газа свидетельствует о наличии каталазной активности.

Способность роста при 45°С проверяют на ПА, разлитом в чашки Петри. Посев испытуемых культур проводят штрихами на секторе чашки. Петля не должна содержать большого количества культуры, поэтому для посева рекомендуется использовать взвесь агаровой культуры в физиологическом растворе. Учет через 24–48 часов инкубации при 45°С. В зависимости от интенсивности роста результаты оцениваются +, ± и –.

Способность роста на среде с 10% $NaCl$ изучают на плотной питательной среде с 10% $NaCl$. Посев и учет проводят так же, как и при постановке предыдущего теста.

3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ

Реакция плазмокоагуляции ставится в соответствии с "наставлением по применению плазмы кроличьей цитратной, выпускаемой предприятием по производству бактерийных препаратов Белорусского ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии".

Определение ДНК-азной активности. К растопленному 1,5% ПА (pH 8,6) добавляют ДНК из расчета 2 мг на 1 мл среды. ДНК предварительно растворяют в 5 мл стерильной дистиллированной воды, к которой добавляют несколько капель 2 N $NaOH$. Все тщательно перемешивается и прогревается 1,5 часа в кипящей водяной бане (или стерилизуют текучим паром 30 минут). Перед разливом в чашки добавляют к среде $CaCl_2$ из расчета 0,8 мг на 1 мл среды (1,2 мл 10% стерильного раствора $CaCl_2$ на 150 мл агара). Посев культур производят на поверхность подсохшей среды бляшками. После 18-20 часовой инкубации при 37°С поверхность среды орошают 5-7 мл 1 N HCl, выдерживают 5-10 минут, сливают кислоту и учитывают результаты. Полимерная ДНК образует видимый на глаз преципитат. Вокруг культур, образующих ДНК-азу, - прозрачные зоны. Можно орошать посевы 3 N HCl с добавлением метиленовой сини. Это дает возможность более быстрого и отчетливого чтения результатов.

Модификация метода определения ДНК-азной активности (метод А.А.Трояшкина). В реакции используется натриевая соль ДНК производства Олайнского завода химреактивов Латвийской ССР. Предварительно готовят рабочий раствор ДНК. С этой целью к 100 мг ДНК добавляют 10 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 0,2 N раствора $NaOH$. Для лучшего растворения ДНК пробирку

нагревают на водяной бане, либо оставляют на ночь при 37°С. I мл рабочего раствора ДНК добавляют к I0 мл расплавленного 2% питательного агара (pH=7,2-7,4), смесь тщательно перемешивают. стерилизуют текучим паром в течение 30 минут или при 0,5 атм - 20 мин. Срок хранения I-2 месяца. При постановке опыта столбики агара с ДНК растапливают, добавляют 0,I мл стерильного I0% раствора $CaCl_2$, перемешивают и выливают на слой хорошо подсушенного питательного агара, предварительно разлитого в чашки Петри, снова подсушивают и засевают. Методика посева и учета результатов та же, что и в классической методике.

Фибринолитическая активность. Стерильную человеческую плазму (из свежей крови с антикоагулянтом) добавляют к расплавленному 2% питательному агару в концентрации I5-20%, тщательно перемешивают и прогревают в течение 4-5 минут на водяной бане при 65-70° до помутнения среды, обусловленного свертыванием фибрина. Среду разливают в чашки и после ее застывания засевают исследуемые культуры бляшками. Результаты учитываются через 24 часа инкубирования посевов при 37°С по образованию вокруг бляшек прозрачных зон, обусловленных лизисом фибрина.

Реакция хлопьеобразования. На предметное стекло наносят каплю цитратной плазмы человека или кролика и растирают в ней исследуемую культуру. Параллельно для контроля культуру растирают также в капле физиологического раствора. При наличии в контроле равномерной мути, а в плазме - хлопьев, реакцию считают положительной. Хлопьеобразование можно также наблюдать при постановке реакции коагуляции.

Лизоцимная активность. К I,5-2% питательному агару (прозрачному) добавляют убитую I5-минутным кипячением культуру *Micrococcus lysodeikticus* из расчета 2 млрд клеток на I мл агара. После тщательного перемешивания среду разливают в чашки, подсушивают

и испытуемые штаммы засевают бляшками. Учет через 24–48 часов инкубации при 37°С. Просветление вокруг бляшек свидетельствует о лизисе *M lysodeikticus*, а следовательно о продукции лизоцима. При сохранении чашек в течение 3–5 суток зоны лизиса становятся больше и отчетливее.

Фосфатазная активность. К 2% питательному агару (pH=5,2) добавляют паранитрафенилфосфат (0,05%). Среду разливают в чашки, подсушивают и исследуемые культуры засевают бляшками. Через 24 часа инкубации при 37°С реакция учитывается по появлению желтого окрашивания среды вокруг колоний.

Ферментация маннита в аэробных условиях. Испытание проводят на плотной питательной среде следующего состава: 2% ПА – 100 мл, маннит (химически чистый) – I мл; I,6% бромтимолблау (спиртовой раствор) – 0,3 мл. После стерилизации среду разливают в стерильные чашки Петри. Готовая среда должна быть сине-зеленоватого цвета (pH 7,2–7,4). Посевы испытуемых культур производят на сектора чашки радиальными полосами. Всего на чашку засевают не более 6 культур. Учет через 24 часа после инкубации при 37°С.

Пожелтение среды вокруг полосы свидетельствует о ферментации глицерина. Желтое окрашивание самой полосы расценивается как слабая или сомнительная реакция (+). Это пожелтение не следует путать с пигментообразованием культуры. Реакцию проще учитывать, подложив под чашку белый лист бумаги.

Чувствительность к новобиоцину.

Определение проводят методом диффузии в агар (с дисками). На подсушенную поверхность ПА в чашке Петри наносят I,5–2 мл смыва I8–20 часовой агаровой культуры испытуемого штамма, соответствующего по густоте 5 ед. по оптическому стандарту мутности. Взвесь распределяют по всей поверхности агара в чашке, избыток жидкости

удаляют и после 10-15 минутного просушивания на агар накладывают диск с новобиоцином. Учет результатов (определение диаметра зоны задержки роста) производят через 18-24 часа инкубации при 37°С. При диаметре зоны задержки роста 15 мм и менее культуру считают резистентной к новобиоцину.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ТЕСТЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА

В современных бактериологических лабораториях с указанными целями обычно используются так называемые комбинированные питательные среды, на которых определяют сразу несколько диагностических признаков. Из многочисленных модификаций этих сред в нашей стране шире всего применяют среду Олькеницкого, трехсахарную среду в модификации Московской городской СЭС и Клиглера.

Трехсахарная среда Олькеницкого

Рецепт		Приготовление раствора индикатора
Питательный агар pH 7,2-7,4	1000мл	
Лактоза х.ч.	1,0 г	фенол рот 0,1 г растворяют в 25 мл стерильной дистиллированной воды. Раствор можно хранить в холодильнике до 10 дней.
Соль Мора х.ч.	0,2 г	
Гипосульфат х.ч.	0,3 г	
Сахароза х.ч.	10,0 г	
Глюкоза х.ч.	1,0 г	
Мочевина х.ч.	10,0 г	
Фенол рот 0,4% водн.р-ра	4,0 мл	

ПРИГОТОВЛЕНИЕ

Соль Мора и гипосульфит растворяют предварительно в дистиллированной воде в пробирках, углеводы и мочевину также растворяют отдельно в дистиллированной воде в колбе на водяной бане. Все ингредиенты добавляют к расплавленному агару, размешивают и фильтруют через стерильную марлю, устанавливают pH 7,2-7,4;

вносят индикатор и разливают по 5–6 мл в пробирки.

Стерилизация при 0,5 атм – 20 минут, или текучим паром 3 дня подряд по 20 минут. Среду охлаждают в скошенном положении для получения столбика высотой 2,5 см и косяка длиной 4 см. Готовая среда бледно-розового цвета.

Посев уколом в столбик и штрихом по скошенной поверхности.

Инкубация 37°С 18–20 часов.

Кислотообразование вызывает появление желтой окраски, разложение мочевины (щелочение) – покраснение, образование сероводорода приводит к почернению в столбике.

Трехсахарная среда с мочевиной, гипосульфитом и солью Мора (пропись Московской гор.СЭС).

Рецепт

Среда Гисса с лактозой и индикатором ВР (сухая) –	45,0 г
Глюкоза х.ч.	I,I г
Сахароза х.ч.	I0,0 г
Мочевина х.ч.	I0,0 г
Гипосульфит х.ч.	I,0 г
Соль Мора х.ч.	0,2

Дистиллированной воды до I000,0 мл

Среду разливают в пробирки по 5–7 мл

Стерилизация при 0,5 атм 20 мин

Посев уколом в столбик и штрихом по косяку.

Инкубация при 37°С 18–20 часов.

Результаты: лактозо- и сахарозоположительные культуры вызывают изменение окраски косяка в голубой (до интенсивно синего) цвета; культуры, ферментирующие глюкозу, вызывают аналогичное изменение окраски столбика среды; а при газообразовании – разрывы среды. Культуры, гидролизующие мочевину (*Klebsiella-pneumoniae Proteus* , кроме *Proteus inconstans*), не вызывают изменения

окраски при ферментации углеводов, т.к. щелочные продукты гидролиза мочевины нейтрализуют кислые продукты ферментации углеводов.

Образование H_2S регистрируется по появлению почернения в столбике.

В случае затруднений в оценке отношения к лактозе, глюкозе, сахарозе или др. субстратам, входящим в комбинированные среды, а также для более развернутого изучения сахаролитической активности применяют гиссовские среды с отдельными углеводами.

Для наиболее широко применяемых углеводов выпускаются сухие среды Гисса с индикатором ВР (водный голубой плюс розоловая кислота). Индикатор работает в диапазоне pH 4,5-8,0. Газообразование оценивается по появлению пузырьков газа у поверхности или разрывам толщи агара.

Колебания в плотности среды могут, порой, затруднять оценку газообразования.

Среды Гисса с углеводами

Основой для Гисса служит 1% пептонная вода с 0,5% NaCl при pH 7,2.

Наиболее употребительным индикатором является индикатор Андреде (с кислым фуксином), добавляемый в количестве 1%. Среды можно готовить в виде полужидких (в этом случае добавляют 0,4% агар-агара) или жидких сред (при необходимости в пробирки при этом помещают так называемые "поплавки").

Глюкозу, лактозу, сахарозу и маннит добавляют к питательной основе в концентрации 1%. Другие углеводы и многоатомные спирты (дульцит, салицин и др.) могут использоваться в концентрации 0,5%. Глюкозу, маннит, дульцит, адонит, инозит можно добавлять к основе среды до стерилизации (1 атм 15 мин). Дисахариды (лактоза, сахароза), а также арабинозу, рамнозу и ксилозу рекомендуется стерилизовать путем фильтрации 10% водных растворов или при 120°

10 минут, после чего добавлять к стерильной основе среды. При изготовлении среды с повышенной концентрацией лактозы (2-10%) это особенно следует учитывать.

Примечание

При хранении Гиссовских сред может происходить их подщелачивание (с 7,2 до 8,2 к 15 суткам хранения).

Определение индолообразования

1. Посев в 2% пептонную воду, инкубация 24-48 часов, испытание с реактивом Ковача (добавляют 0,5 мл реактива и слегка встряхивают) В присутствии образующегося индола появляется красное окрашивание.

2. Посев в 1% пептонную воду, инкубация 1-3 суток, выявление с бумажками, пропитанными раствором парадиметиламино-бензальдегидом или реактивом Ковача.

Вместо пептонной воды возможно использование бульона на перевare Хоттингера или триптическом перевare казеина.

Триптический перевар* казеина разводят до содержания 120-140% мг аминного азота, добавляют NaCl из расчета 4г на 1 литр среды, устанавливают pH 7,3-7,5. Стерилизуют обычным порядком.

Индикаторные бумажки для определения индола.

Парадиметиламинобензальдегид	5,0 г
Ортофосфорная кислота	10,0 мл
Метиловый спирт	50,0 мл

Раствором смачивают фильтровальную бумагу, высушивают, нарезают полосками, хранят в темной склянке.

Реактив Ковача

Амиловый спирт	150 мл
Соляная кислота (концентрированная)	- 50 мл
Парадиметиламинобензальдегид	- 10 г

(в сухом виде может быть слегка окрашен).

---

* перевар предварительно проверяют на содержание триптофана (см. Руководство под ред. Г.Я.Синая и О.Г.Биргера. М., Медгиз, 1949, стр.84) и отсутствие индола.

Приготовление. Альдегид растворяют в спирту и затем медленно добавляют кислоту. Рекомендуется готовить в небольших количествах и хранить в холодильнике.

Среда С лонса

Рецепт

Фосфорнокислый натри.. аммоний	I,5 г	без агар-агара Среда Козера
Сернокислый магний	0,2 г	
Однозамещенный фосфорнокислый калий	I,0	
Лимоннокислый натрий нейтральн.	3,0 г	
Дистиллированная вода	I000,0 мл	
Агар-агара	29,0 г	

Индикатор

I,5% спиртовый раствор бромтимолового синего	I0,0 мл	(придает готовой среде зеленую окраску)
или		
5% водного раствора фенолрот	20,0 мл	(придает готовой среде желто-оранжевую окраску

Приготовление. Все соли растворяют сначала в небольшом объеме дистиллированной воды, соединяют с размоченным предварительно в дистиллированной воде агар-агаром, доводят до объема I000 мл, устанавливают pH 7,2.

Добавляют в соответствии с прописью раствор индикатора, фильтруют и разливают по 5-7 мл в пробирки.

Стерилизация I атм (I20°) - I5 минут.

Скашивание среды производят таким образом, чтобы получить столбик высотой 2,5 см и скошенную поверхность (косяк) длиной 4 см. Это имеет значение для оптимизации сроков учета результатов посева.

Посев производят минимальной дозой культуры (I6-I8 часовой агаровой культуры или из суспензии ее в физиологическом растворе). Массивный посев может приводить к ложно положительным результатам.

Инкубация при 37°.

Учет через 18–20 часов, при отрицательных результатах – до 4 суток.

Среда с мочевиной (по Преусу)

Стерильный 1,5% питательный агар на мартеновском бульоне

pH 7,0	100 мл
Глюкоза х.ч.	0,5 г
50% раствор мочевины	2,0 мл
0,2% раствор бромтимолового синего	1,2 мл

Среду разливают в стерильные бактериологические пробирки по 4–5 мл и стерилизуют 1 раз текучим паром 15 минут.

Ацетатная среда

Рецепт

NaCl	5,0 г
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 г
$(NH_4)\ H_2PO_4$	1,0 г
KCl	2,0 г

или

K_2HPO_4	1,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл
агар-агар	15,0 г

Бромтимолблау 1,6% спиртового раствора – 2 мл

Приготовление. Агар-агар растворяют при нагревании в дистиллированной воде, добавляют соли и устанавливают pH 7,2–7,4 (добавлением нескольких капель 20% р-ра NaOH). Затем добавляют ацетат и индикатор.

Среду разливают в стерильные пробирки по 5,0–7,0 мл.

Стерилизация однократная, текучим паром 20–30 минут, скашивают как среду Симонса.

Цвет готовой незасеянной среды голубовато-зеленый.

Неиспользованная среда может храниться в холодильнике I-2 месяца (при условии замены ватных пробок корковыми).

Посев. Производят из суспензии (бактериологическая петля I8-часовой агаровой культуры в I мл физиологического р-ра). При посеве материала непосредственно из колоний его следует брать с поверхности колонии, не допуская соприкосновения петли с питательной средой.

Результаты. При наличии роста (положительный результат) среда становится синей.

Единственным источником углерода в среде является уксуснокислый натрий (или калий).

Среда для выявления декарбоксилаз аминокислот

Рецепт	
Пептон	0,5
Дрожжевой экстракт	3,0 г
или аутолизат дрожжей	I2,0-I5,0 мл
или диализата дрожжей -	I2,0-I5,0 мл
Глюкоза х.ч. -	I,0 г
Бромтимоблау I,6% спиртовой раствор -	I,0 мл
Дистиллированная вода -	I000 мл

* Вместо них можно брать мясную воду - 400 мл, соответственно уменьшив объем дистиллированной воды до 600 мл (прописью Всес. эшерихиозного центра, 1972)

Приготовление. Основа среды делится на 4 части, к одной из них добавляют I% L - лизина, ко второй части - I% L - аргинина, к третьей I% L -орнитина, четвертая часть используется как контрольная (без добавления аминокислот). При использовании DL - аминокислот их добавляют в концентрации 2%, т.к. энтеробактерии проявляют активность в отношении L -изомеров.

Все порции разливают по 2-3 мл в серологические пробирки** Стерилизация при II2° 30 минут.

** целесообразно иметь специальные партии пробирок для каждой из используемых аминокислот.

Готовая среда имеет светло-зеленый цвет.

Посев производят минимальными дозами с косяка 16-18 часовой агаровой культуры в среды с аминокислотами и в среду без аминокислот. За рубежом принято заливать засеянную среду стерильным вазелиновым маслом (слоем 5-10)мм).

Инкубация при 37° до 4 дней с ежедневным учетом. Большинство положительных реакций у энтеробактерий выявляется на первые-вторые сутки. При удлинении сроков инкубации свыше суток заливка маслом обязательна.

Результат. При декарбоксилировании аминокислот - положительном результате - среда приобретает синий цвет за счет накопления щелочных продуктов. При отрицательном результате цвет среды желтый, в контрольной пробирке должна быть желтая окраска среды (в результате подкисления среды за счет ферментации глюкозы).

а) Добавление глюкозы имеет значение для достижения оптимальной для декарбоксилирования реакции среды в результате ферментации глюкозы при росте энтеробактерий. Разные энтеробактерии имеют оптимальную декарбоксилазную активность при pH в пределах 3,5-5,5.

б) Используемые препараты аминокислот:

L - лизин дигидрохлорид
L - аргинин моногидрохлорид
L - орнитин дигидрохлорид

| или соотв. DL

Тест на выявление дезаминазы фенилаланина

Рецепт

Дрожжевой экстракт -	3,0 г
L - фенилаланин	1,0 г
или	
DL - фенилаланин -	2,0
Na_2HPO_4	1,0
NaCl	5,0
Агар-агар	12,0

Дистиллированная вода - 1000,0

Приготовление и стерилизация

Среду разливают по 3–4 мл в серологические пробир и, стерилизуют при 120° 10 мин и скашивают обычным образом.

Посев испытуемых культур производят массивной дозой, инкубация при 37° 20–24 часа.

Для оценки результатов на поверхность выросшей культуры наносят 4–5 капель 10% раствора $FeCl_3$

Результаты: положительная реакция - от интенсивно зеленого до светло зелёного окрашивания косяка и свободной жидкости - наблюдается у протеев, (палочка Моргана - дает слабо положительные реакции), отрицательная реакция - без изменения окраски.

Под влиянием фенилаланиндезаминазы, присущей протеям, происходит превращение фенилаланина в фенилпировиноградную кислоту, карбоксильная группа которой реагирует с солью железа ($FeCl_3$) и дает зеленое окрашивание.

Среда с малонатом натрия

Рецепт

Дрожжевой экстракт - 30,0 мл

(или по сухому остатку - 1,0 г)

$(NH_4)_2SO_4$ - сульфат аммония - 2,0 г

K_2HPO_4 - 0,6 г

KH_2PO_4 - 0,4 г

$NaCl$ - 2,0 г

$CH_2COONHCOONa$ - малонат натрия - 3,0 г

Глюкоза х.ч. - 0,25 г

Дистиллированная вода - 1000,0 мл

Бромтимолблау 0,2% водный раствор - 12 мл

Приготовление. Растворяют при подогревании плотные части, фильтруют через бумажный фильтр и добавляют раствор индикатора. Среду разливают по 2 мл в стерильные серологические пробирки и

стерилизуют при 112° 30 мин. Готовая среда имеет зеленый цвет.

Посев. Культуру берут с молодого агарового косяка или лучше 6-часовую бульонную.

Инкубация при 37° 48 часов.

Учет через 24 и 48 часов.

Результаты: Положительный изменение цвета среды из зеленого в голубой. Отрицательный-без изменения окраски.

Среда Кларка

(для определения интенсивности кислотообразования за счет глюкозы и образования ацетил-метилкарбинола - ацетоина)

Рецепт

Пептон - 5,0 г

Глюкоза х.ч. - 5,0 г

K_2HPO_4 - 5,0 г

(двуосновной фосфорнокислый калий)

Дистиллированная вода 1000,0 мл

Все ингредиенты растворяют в небольшом (80-100 мл) объеме дистиллированной воды при подогревании на водяной бане в течение 20 минут. Раствор охлаждают до 20°, фильтруют, доводят дистиллированной водой объем до 1000 мл и разливают в бактериологические пробирки по 5 мл.

Стерилизация дробная, 3 дня подряд текучим паром.

Посев обычным порядком, инкубация при 37° от 1 до 3 сут.

Реакция с метиловым красным для определения интенсивности кислотообразования за счет глюкозы.

К 2,5-3 мл 1-3 суточной испытуемой культуры на среде Кларка добавляют 5 капель р-ра метилрот (приготовление индикатора см. ниже)*.

---

* Метилрот 0,01 г растворяют в 30,0 мл этилового спирта и доводят затем до объема 50,0 мл дистиллированной водой.

Результаты. Положительная реакция - красное окрашивание - при сдвиге pH в кислую зону, отрицательная реакция - желтое окрашивание при pH в зоне 6,0-7,0.

Слабоположительная реакция - красновато-оранжевый цвет.

Определение ацетилметилкарбинола (ацетоина)

Реакция Фогес Проскауэра

К 2,5-3 мл I-3 суточной испытуемой культуры на среде Кларка добавляют такое же количество (аа) едкой щелочи (2% р-р NaOH или KOH), встряхивают и помещают в термостат (37^{0}), желательно в наклонном положении для большей аэрации. Учет через 3-4 часа и на следующий день.

Положительная реакция - оранжеворозовое окрашивание (эозиноподобное) верхнего слоя жидкости.

Отрицательная реакция - неизменная окраска.

Модификация Барита , а - (более чувствительная).

К I мл I-3 суточной испытуемой культуры на среде Кларка добавляют 0,6 мл 5% р-ра α-нафтола в абсолютном спирте и 0,2 мл 40% KOH, в течение 5-I5 минут при положительном результате на поверхности жидкости появляется розовое или красное окрашивание.

Определение бактериальной желатиназы

Засвеченную и проявленную фотопленку разрезают на полоски размером 25x3 мм и автоклавируют при $II0^{0}$ в течение 30 мин. сложенными между кусками фильтровальной бумаги в чашке Петри.

При приготовлении новой партии полосок нужно проверить их пригодность в посевах заведомо положительного и заведомо отрицательного штамма бактерий.

Испытуемую культуру бактерий засевают в I,5-2 мл пептонной воды или бульона в узких пробирках (агглютинационных или преципитационных).

После посева в пробирку кладут полоску стерильной фотопленки

так, чтобы верхняя часть ее осталась не погруженной в среду.

Посевы ставят в термостат при 37°. Если культура разжижает желатину, погруженная часть полоски становится прозрачной, а черная пыль редуцированного серебра выпадает на дно пробирки.

Большинство бактерий, обладающих желатиназной активностью, обесцвечивает полоску в течение суток.

При отрицательных результатах посевы выдерживают в термостате до 7 суток.

Среда А для выявления пигмента пиоцианина у *P. aeruginosa*

Вода дистиллированная	I л
Пептон	20,0 г
Глицерин	I0 мл
Агар-агар	20,0 г
K_2 O_4 (безводный)	I0,0 г
(безводный)	I,4 г

Среда стерилизуется при 0,5 атм в течение 20 мин. Разливается в чашки.

Среда с глицерином

Питательный агар	I л
Глицерин	I0 мл

Посев производят на сектора чашки штрихом. На I чашку можно сеять 5-6 культур.

Межродовая идентификация в семействе *Enterobacteraceae*

(родовые группы в соответствии с "Кратким определителем бактерий Берги" М., Мир, 1980)

Таблица I

	Тест или субстрат	*Escherichia*	*Shigella*	*Salmonella*	*Citrobacter*	*Edwardsiella*	*Klebsiella* *	*Enterobacter*	*Hafnia*	*Serratia*	*Pr. Teleg*	*Yersinia* **	*Erwinia*
По результатам посева на среде Клигглера	Лактоза	+,-	-	-	(+),x	-	+	+	-,+	x	-	-	x
	Глюкоза (газ)	+,-	-	+,-	+	+	+	+	x	x	x	-	-
	Сероводород	-	-	+,-	+,-	+	-	-	-	-	+,-	-	+
	Мочевина (ориентировочно)	-	-	-	x	-	-,+	-	-	-	+,-	+	-
Дополнительные тесты для определения родовой принадлежности	Мочевина (по Преусу)	-	-	-	x	-	+	(+),-	-	x	+,-	+	-
	Индол	+,-	+,-	-	-,+	+	-,+	-	-	-	+,-	-	-
	Цитрат Симонса	-	-	+,-	+	-	+	+	x	+	x	-	+
	Фенилаланин-дезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	x
	Лизиндекарбоксилаза	+,-	-	+,-	-	+	+	-,+	+	+	-	-	-
	Тест с метиловым красным	+	+	+	+	+	-,+	-	+37° -22°	x	+	+	-
	Тест Фогеса-Проскауэра	-	-	-	-	-	+	+		x	-	+, -37° -25°	x
	Подвижность	+,-	-	+	+	+	-	+	+,-	+	+,-	-37° +(+)25°	+

Примечание: В таблице даны свойства типичных штаммов.

* Приведены свойства вида

** Приведены свойства видов

Условные обозначения: + 90% и более положительных реакций

(+) замедленно положительные реакции (более чем через 2 сут.)

\- 90% и более отрицательных реакций

x различные биохимические реакции

+,- чаще положительные, реже отрицательные реакции

-,+ чаще отрицательные, реже положительные реакции

Таблица 2

Внутриродовая идентификация в семействе Enterobacteriaceae

Тест или субстрат	Shigella				Salmonella				Citrobacter		Klebsiella			Enterobacter		Proteus					Yersinia		Примечание
	dys.	fl.	boid.	son.	I	II	III	IV	fr.	int.	pn.	oz.	rhy.	clo.	aer.	vulg.	mil.	mor.	ret.	inc.	ent.	ps.	
Лактоза	–	–	–	(+)	–	–	+,x	–			+	(+)	–								+	–	
Сахароза	–	–	–	(+)											газ						+	–	
Аданит														x	+	–	–	–	x	x			
Дульцит	x	–	x	–	+	+	–	–			x	–	–		газ								
Инозит											+			–	+	–	–	–	+	x			
Маннит	–	+	+	+												–	–	–	+,–	x			
Салицин					–	–	–	+													+	–	
Сорбит	x	x	x	x	–																		
Манонат					–	+	+	–	–	x	+	–	+	x	+								
Желатин					–	(+)	(+)	(+)						(+)	((+))	+	(+)	+	–	–			
Орнитин декарбоксилаза	–	–	–	+							–			+	+	–	–	–	–	–	+	–	
Глюкоза (газ)											+	x	–			+,–	+,–	x	–,+	x			
Индол	x	x	x	–					–	+						+	–	+	+	+			
Сероводород									+	–						+	+	–	–	–			
Мочевина											+	x	–			+	+	+	+	–			
Цитрат Симонса																							
Лизиндекарбоксилаза											+	x	–	–	–	+							
Тест с метиловым красным											–	+	+								-37°		
Тест Фогеля-Проск.											+	x	–										
Подвижность																					+,-25°		

По данным тестов межродовой дифференциации

В каждой родовой группе приведены лишь тесты, позволяющие дифференцировать виды.

Условные обозначения те же, что в таблице I.

П-102089 от 07.05.84г. Зак.839 Тир. 300

Типография Министерства Здравоохранения СССР.