УДК 637.517.92 : 576.8.07 : 006.354 Группа Н19

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

МЯСО КРОЛИКОВ
Методы бактериологического анализа

ГОСТ 20235.2—74

Meat of rabbits.
Methods of bacteriological analysis

Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 2 октября 1974 г. № 2284 срок введения установлен
с 01.07.75

Проверен в 1979 г. Срок действия продлен
до 01.07.90

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на мясо кроликов и устанавливает методы бактериологического анализа, предусматривающие определение аэробов (сальмонелл, бактерий рода Эшериши, стафилококков, стрептококков, листерий, пастерелл) и анаэробов (ботулизм, перфрингренс).

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ОБРАЗЦОВ

1.1. Отбор образцов проводят по ГОСТ 20235.0—74.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

2.1. Для проведения анализа применяют:
автоклав электрический по ГОСТ 9586—75;
котлы с паровой рубашкой;
аппарат Коха;
петлю для бактериологического анализа;
баню водяную;
весы лабораторные по ГОСТ 24104—80;
воронки стеклянные по ГОСТ 8613—75;
дистиллятор;
дуршлаг;
колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 10394—72;

Издание официальное Перепечатка воспрещена

★

Переиздание. Май, 1981 г.

gost.e-ecolog.ru

кристаллизаторы по ГОСТ 10973—75;
лоток;
лупу по ГОСТ 8309—75;
pH-метр;
микроскоп по ГОСТ 8284—78;
мясорубку бытовую;
ножницы прямые, изогнутые длиной 14 см;
нож;
осветитель ОИ-19;
пинцеты;
прибор для счета колоний;
пластинку с сеткой для счета колоний;
пеналы металлические для пипеток;
поплавки для пробирок и колб длиной 20, 45 и 75 мм и диаметром соответственно 5, 9 и 10 мм;
петледержатели;
проволоку из никелевых сплавов диаметром 0,3—0,5 мм по ГОСТ 492—73;
плитку электрическую;
пробирки стеклянные бактериологические по ГОСТ 10515—75;
пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$;
пипетки пастеровские;
скальпель;
стекла предметные по ГОСТ 9284—75;
стекло покровное по ГОСТ 6672—75;
спиртовки стеклянные по ГОСТ 10090—74;
колбы стеклянные по ГОСТ 10394—72;
стаканы стеклянные по ГОСТ 10394—72;
ступки фарфоровые с пестиками;
термостат электрический для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором до температуры 50°С и с ценой деления 0,2°С;
флаконы стеклянные вместимостью 100—250 $см^3$;
холодильник бытовой электрический с температурой в камере 4—6°С;
холодильники походные (сумки);
цилиндры измерительные вместимостью 10, 100, 500 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770—74;
часы песочные на 1, 2 и 3 мин по ГОСТ 10576—74;
чашки Петри по ГОСТ 10973—75;
шкаф сушильный лабораторный;
штативы для пробирок;
бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026—76;
вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556—75;
нитки по ГОСТ 6309—80;

марлю медицинскую по ГОСТ 9412—77;
ткань для фильтрования;
масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164—78;
масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739—78;
мел химический осажденный по ГОСТ 8253—79;
песок кварцевый для тонкой керамики по ГОСТ 7031—75;
экстракт дрожжевой;
диализат дрожжевой;
дрожжи прессованные хлебопекарные;
желчь крупного рогатого скота свежую или сухую обезвоженную;
кровь кролика свежую;
молоко обезжиренное;
мясо говяжье по ГОСТ 779—55;
печень говяжью по ГОСТ 19342—73;
аммоний хлористый по ГОСТ 3773—72;
арабинозу;
глюкозу х. ч. по ГОСТ 6038—79;
галактозу;
глицерин по ГОСТ 6259—75;
дульцит;
железо хлористое;
йод кристаллический по ГОСТ 4159—79;
калия гидрат окиси;
калий йодистый по ГОСТ 4232—74;
калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198—75;
калий хлористый по ГОСТ 4234—77;
калий двухромовокислый по ГОСТ 4220—75;
калий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 3204—76;
ксилозу;
кислоту серную по ГОСТ 4204—77;
кислоту соляную по ГОСТ 3118—77;
кислоту уксусную по ГОСТ 61—75;
кислоту карболовую;
креатин;
кислоту розоловую;
кальций хлористый кристаллический;
лактозу х. ч.;
малонат;
магний сернокислый;
маннит по ГОСТ 8321—74;
магний хлористый кристаллический по ГОСТ 4209—77;
мальтозу;
мочевину по ГОСТ 6691—77;

масло вазелиновое по ГОСТ 3164—78;
натрий-аммоний фосфорнокислый;
натрий серноватистокислый СТ СЭВ 223—75;
натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный по ГОСТ 11773—76;
натрия гидрат окиси по ГОСТ 4328—77;
натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245—76;
натрий кислый селенистокислый;
натрий лимоннокислый;
натрий двууглекислый по ГОСТ 4201—79;
натрий хлористый по ГОСТ 4233—77;
парадиметиламидобензолальдегид;
рамнозу;
сахарозу по ГОСТ 5833—75;
салицин;
соль закиси железа и аммония двойную сернокислую по ГОСТ 4208—72;
соль натриевую дезоксирибонуклеиновой кислоты;
углерод по ГОСТ 4—75;
свинец уксуснокислый по ГОСТ 1027—67 (СТ СЭВ 263—76);
спирт амиловый чистый;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67;
хинозол;
фенилаланин;
эфир серный;
индикатор Андреде;
бромтимоловый синий;
бриллиантовый зеленый;
генциан фиолетовый;
кристаллвиолет;
метиловый красный по ГОСТ 5853—51;
метиловый синий;
феноловый красный по ГОСТ 4599—73;
фенолфталеин по ГОСТ 5850—72;
фуксин основной;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72;
воду питьевую по ГОСТ 2874—73;
азур-эозин по Романовскому;
эозин;
агар висмут-сульфитный;
агар микробиологический по ГОСТ 17206—71;
бактоагар Плоскирева сухой;
синьку Леффлера;
пептон сухой для бактериологических целей по ГОСТ 13805—76;

пептон импортный чешской фирмы «Спофа» или венгерской фирмы «Рихтер»;
кровь кролика свежую;
плазму цитратную кроличью сухую;
среду Гисса сухую с индикатором ВР;
среду Левина сухую;
сыворотки поливалентные и монорецепторные О и Н — агглютинирующие;
сыворотки антиботулинические;
среду Эндо сухую.

3. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

3.1. Подготовка и стерилизация посуды и материалов.

3.1.1. Вся посуда для бактериологического анализа перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и высушена.

3.1.2. Пробирки должны быть закрыты ватными пробками и завернуты в бумагу; горлышки колб и флаконов закрывают ватной пробкой, а сверху — бумажным колпачком, который обвязывают ниткой.

3.1.3. Пробки для пробирок и колб готовят из ваты, обвертывают слоем марли и завязывают ниткой на свободном конце.

3.1.4. Чашки Петри укладывают в металлические пеналы или завертывают в бумагу. Между крышками и дном чашек, предназначенных для разливки среды Эндо, можно положить кружки фильтровальной бумаги диаметром на 1—2 см больше диаметра чашки.

3.1.5. В конце пипетки, который берется в рот, вкладывают кусочек ваты. Пипетки помещают в металлические пеналы по 6—10 шт. в каждый или завертывают в бумагу.

3.1.6. Подготовленную посуду стерилизуют сухим паром в течение 1 ч в сушильном шкафу при температуре 160±5°С.

При отсутствии сушильного шкафа посуду стерилизуют в течение 30 мин в автоклаве при температуре 126±2°С.

3.1.7. Стерильную посуду вынимают из сушильного шкафа после его охлаждения до температуры ниже 60°С и хранят в плотно закрытых шкафах или ящиках лабораторных столов.

3.2. Приготовление питательных сред, реактивов, красок

3.2.1. *Приготовление мясной воды*

Говяжье или конское мясо освобождают от костей, жира и сухожилий, измельчают на мясорубке и заливают холодной водой из расчета 1000 см³ воды на 500 г мяса. Смесь воды с измельченным мясом медленно нагревают до кипения и кипятят в течение 1,5 ч. Небольшое количество смеси (до 5 л) можно кипятить на

открытом огне при частом помешивании во избежание пригорания частичек мяса. Большое количество смеси лучше кипятить в котлах с паровой рубашкой. Для определения готовности мясной воды сначала фильтруют небольшое количество смеси в пробирку через бумажный фильтр. Если жидкость прозрачная — вода готова.

Затем жидкость и весь сок из вареного мяса отжимают через ткань, доливают кипяченой водой до первоначального объема, разливают в чистую посуду (колбы, бутыли) и стерилизуют 20 мин в автоклаве при температуре 120°С.

3.2.2. *Приготовление мясо-пептонного бульона*

К 1000 мл мясной воды, приготовленной по п. 3.2.1, добавляют 10 г сухого пептона и 0,5 г хлористого натрия, кипятят в течение 30 мин, после чего доводят уровень воды до первоначального объема. Затем фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают pH 7,0—7,2 насыщенным раствором двууглекислого натрия или 10%-ным раствором гидрата окиси натрия, 15—20 мин стерилизуют при температуре 120°С. Если после стерилизации в мясо-пептонном бульоне выпадает осадок, его фильтруют вторично и снова стерилизуют. Вторичную стерилизацию для предотвращения выпадения осадка проводят при более низкой температуре.

3.2.3. *Приготовление физиологического раствора*

В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 8,5 г химически чистого хлористого натрия. Раствор доводят до кипения, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют 20 мин в автоклаве при температуре 120°С.

3.2.4. *Приготовление мясо-пептонного агара*

К 1000 мл мясо-пептонного бульона, приготовленного по п. 3.2.2, перед стерилизацией добавляют 20 г агара и кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения.

Мясо-пептонный агар, охлажденный до температуры 50—55°С, осветляют яичным белком (из расчета один белок на 1000 см³ мясо-пептонного агара), помещают в автоклав, не завинчивая крышку автоклава, или в аппарат Коха на 1 ч, чтобы белок свернулся и, оседая, увлек за собой взвешенные частицы. Горячий мясо-пептонный агар фильтруют через ватно-марлевый фильтр и устанавливают pH 7,0—7,4. Разливают во флаконы и пробирки и 20 мин стерилизуют в автоклаве при температуре 120°С.

3.2.5. *Приготовление питательного агара*

К 100 см³ дистиллированной воды добавляют 5 г порошка агара, тщательно размешивают и кипятят на слабом огне до полного расплавления агара в закрытой посуде при периодическом помешивании во избежание пригорания, фильтруют, разливают в про-

бирки или флаконы и 20 мин стерилизуют при температуре 120°С или по 30 мин текучим паром трое суток подряд.

3.2.6. *Приготовление среды Левина*

К 100 мл расплавленного мясо-пептонного агара с pH 7,0—7,4, приготовленного по п. 3.2.4, добавляют 2 см³ 0,5%-ного водного раствора предварительно подогретой на водяной бане метиленовой сини, 1,5 см³ 2%-ного раствора эозина, 2 г лактозы и 0,2 г двузамещенного фосфорнокислого калия. Растворы красок готовят на дистиллированной воде и стерилизуют 1 ч при температуре 100°С. После добавления всех компонентов в указанном порядке среду тщательно перемешивают, разливают в чашки и подсушивают. Среда должна быть красно-фиолетового цвета.

3.2.7. *Приготовление среды Мюллера*

Для приготовления среды Мюллера вначале готовят растворы серноватистокислого натрия и Люголя.

В мерный цилиндр с 50 г серноватистокислого натрия добавляют до 100 см³ дистиллированной воды. Полученный раствор стерилизуют текучим паром.

Для приготовления раствора Люголя в 100 см³ дистиллированной воды растворяют 25 г кристаллического йода, 20 г йодистого калия.

Для приготовления среды Мюллера в стерильную колбу помещают 4,5 г х. ч. мела и стерилизуют сухим жаром, наливают 90 см³ мясо-пептонного бульона, приготовленного по п. 3.2.2, стерилизуют 30 мин при температуре 120°С, после чего стерильно добавляют 2 см³ раствора Люголя и 10 см³ раствора серноватистокислого натрия. Среду взбалтывают и разливают в колбы.

3.2.8. *Приготовление среды Кауфмана*

К 100 мл стерильной среды Мюллера, приготовленной по п. 3.2.7, добавляют 1 см³ 0,1%-ного водного раствора бриллиантовой зелени и 5 см³ стерильной желчи крупного рогатого скота. Смесь хорошо взбалтывают, но не стирилизуют.

3.2.9. *Приготовление селенитовой среды*

Среду готовят из двух основных растворов — А и Б.

Раствор А состоит из 5 г пептона чешской фирмы «Спофа» или венгерской фирмы «Рихтер», 7 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия, 3 г однозамещенного фосфорнокислого натрия, 4 г х. ч. лактозы, 100 см³ дистиллированной воды pH 6,9—7,1. Раствор стерилизуют 30 мин при температуре 112°С.

Раствор Б состоит из 10%-ного раствора кислого селенистокислого натрия, приготовленного на стерильной воде. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

При изменении серии любого из входящих в среду компонентов (пептона, кислого селенистокислого натрия, фосфатов) производят предварительную подтитровку, для чего экспериментально опреде-

ляют точную пропорцию фосфорнокислого двузамещенного безводного натрия и фосфорнокислого однозамещенного натрия, которая с используемыми образцами пептона и селенистокислого натрия дает pH не выше 6,9—7,1, что регулируется изменением соотношения фосфатов.

Для приготовления селенитовой среды к 50 см³ раствора А стерильно добавляют 2 см³ раствора Б. Среду разливают в стерильные пробирки по 5—7 см³, но не стерилизуют.

3.2.10. *Приготовление хлористомагниевой среды «М» (модифицированной)*

Среду готовят из трех основных растворов А, В и С.

Для приготовления раствора А в 90 см³ дистиллированной воды растворяют 0,42 г пептона, 0,7 г хлористого натрия, 0,15 г однозамещенного фосфорнокислого натрия, 2 мл дрожжевого диализата.

Для приготовления раствора В в 9 см³ дистиллированной воды растворяют 3,6 г кристаллического хлористого магния.

Раствор С состоит из 0,09 см³ 5%-ного водного раствора бриллиантовой зелени.

Для приготовления хлористомагниевой среды «М» (модифицированной) растворы А, В и С смешивают и стерилизуют 30 мин при температуре 112,5°С.

Концентрированную среду готовят, удваивая содержание всех компонентов, кроме дистиллированной воды.

При отсутствии дрожжевого диализата допускается применять дрожжевой экстракт.

3.2.11. *Приготовление дрожжевого экстракта*

В 2000 мл дистиллированной воды растворяют 1000 г прессованных хлебопекарных дрожжей. Полученную суспензию стерилизуют 30 мин текучим паром, затем отстаивают в холодильнике при температуре 4—6°С в течение пяти-шести суток.

Жидкость над осадком декантируют, приливают 2,5 см³ 0,01%-ного раствора кристаллвиолета, разливают во флаконы или пробирки и вновь стерилизуют при температуре 100°С в течение 30 мин. Экстракт хранят в холодильнике при температуре 4—6°С в течение двух недель.

3.2.12. *Приготовление среды Эндо*

К 100 мл холодной дистиллированной воды прибавляют 5 г порошка сухой среды Эндо, тщательно размешивают, нагревают при помешивании до полного расплавления агара, кипятят на слабом огне 3—5 мин, не допуская пригорания. Горячую среду фильтруют через рыхлый ватный, предварительно смоченный дистиллированной водой и отжатый фильтр и вновь доводят до кипения.

После остывания среду разливают в стерильные чашки Петри слоем 4—5 мм и после застывания подсушивают в термостате. Чашки со средой, во избежание ее покраснения, нельзя оставлять

на солнечном свету. Среду готовят непосредственно перед анализом.

3.2.13. *Приготовление среды Плоскирева*

В 100 см³ холодной дистиллированной воды тщательно размешивают 6 г порошка сухой среды Плоскирева, нагревают при помешивании до полного расплавления агара, кипятят на слабом огне 2—3 мин, не допуская пригорания, до образования быстро оседающей крупнопузырчатой пены. Горячую среду разливают в стерильные чашки Петри слоем 4—5 мм и оставляют их открытыми на 40 мин для остывания и подсушивания, после чего чашки закрывают крышками или картонками и среда готова к посеву.

3.2.14. *Приготовление висмут-сульфитного агара*

В 100 см³ холодной дистиллированной воды тщательно размешивают 6 г порошка сухого висмут-сульфитного агара, кипятят на слабом огне 3—5 мин при закрытой крышке или пробке, не допуская пригорания.

После остывания среду разливают в стерильные чашки Петри слоем 4—5 мм, предварительно взболтав для равномерного распределения остатка. Чашки Петри оставляют открытыми на 40 мин для остывания и подсушивания.

3.2.15. *Приготовление среды Гисса*

К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 1 г пептона, 0,5 г хлористого натрия и нагревают до растворения, затем фильтруют до тех пор, пока раствор не станет совершенно прозрачным. Устанавливают pH 7,0, прибавляют 0,5 г углерода и 1 см³ индикатора Андреде.

Среду разливают по 5 см³ в пробирки с поплавками и стерилизуют 20 мин при температуре 110°С. Среда должна быть бесцветной или соломенно-желтого цвета, без розового оттенка. Можно использовать готовые среды Гисса.

Для приготовления индикатора Андреде к 100 см³ дистиллированной воды добавляют 16 см³ 1 н. раствора гидрата окиси натрия и 0,5 г кислого фуксина. Раствор стерилизуют 5 мин при температуре 110—112°С. Среду хранят в склянке из темного стекла.

3.2.16. *Приготовление пептонной воды*

К 1000 см³ дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 5 г хлористого натрия, кипятят до растворения пептона, фильтруют и устанавливают pH 7,2—7,4, после чего стерилизуют 30 мин при температуре 120°С.

3.2.17. *Приготовление среды Кристенсена*

К 100 см³ расплавленного мясо-пептонного агара (pH 7,2), приготовленного по п. 3.2.4, добавляют 0,5 мл 10%-ного водного раствора хлористого железа, стерильно разливают в пробирки столбиком и немедленно охлаждают.

3.2.18. *Приготовление среды Христенсена с мочевиной*

К 1000 см³ дистиллированной воды прибавляют 1 г пептона, 5 г хлористого натрия, 1 г глюкозы, 2 г фосфорнокислого однозамещенного калия, 6 см³ фенолового красного (1 : 500) и 20 г мочевины и нагревают до полного растворения солей.

Среду фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают pH 6,8—6,9, разливают в пробирки по 5—6 см³ и стерилизуют на водяной бане по 15—20 мин трое суток подряд. Готовая среда бесцветная. Особое внимание необходимо обращать на pH среды.

3.2.19. *Приготовление среды для реакции с метилротом и Фогес-Проскауэра*

В 1000 см³ горячей дистиллированной воды растворяют 5 г двузамещенного фосфорнокислого натрия, 7 г пептона, 5 г глюкозы, фильтруют и устанавливают pH 6,9—7,0. Среду разливают в пробирки по 5 см³ и стерилизуют в водяной бане по 15 мин ежедневно трое суток подряд. Готовая среда должна быть бесцветной и прозрачной.

3.2.20. *Приготовление индикатора бромтимолблау*

В 40 см³ дистиллированной воды растворяют 1 г бромтимолблау, нагревают до кипения и добавляют 25 см³ 0,1 н. раствора гидрата окиси калия, в результате чего жидкость приобретает зеленоватый оттенок. Затем дистиллированной водой доводят объем до 500 см³. Индикатор хранят в темной склянке с притертой пробкой.

3.2.21. *Приготовление агара Симмонса*

В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 5 г хлористого натрия, 0,2 г сернокислого магния, 1,5 г фосфорнокислого натрия-аммония, 2 г двузамещенного фосфорнокислого калия, 5 г нейтрального лимоннокислого натрия, 20 г агара-агара. Раствор фильтруют, добавляют 40 см³ раствора бромтимолблау (1 : 500). Среду разливают в пробирки по 5—6 см³, стерилизуют при температуре 121°С в течение 20 мин, после чего скашивают. Готовая среда должна быть оливкового цвета.

3.2.22. *Приготовление фенилаланинового агара*

К 1000 мл дистиллированной воды прибавляют 3 г дрожжевого экстракта, 2—1 г *DL* или L-фенилаланина, 1 г двузамещенного фосфорнокислого натрия, 5 г хлористого натрия, нагревают при постоянном помешивании до полного растворения добавленных компонентов. Затем устанавливают pH 7,2—7,4 и добавляют 12 г агара. После добавления агара среду кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. Приготовленный агар фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют 10—15 мин в автоклаве при температуре 121°С. После стерилизации питательную среду скашивают.

3.2.23. *Приготовление полужидкого агара*

К мясо-пептонному бульону, приготовленному по п. 3.2.2, добавляют 0,5% агара. Среда должна иметь pH 7,0—7,2. Среду стерилизуют 20 мин при температуре 120°С.

3.2.24. *Приготовление плазмы крови*

В пробирку вносят 2 см³ 5%-ного раствора лимоннокислого натрия и 8 см³ только что полученной крови кролика. Цитратную кровь ставят на 18—20 ч в холодильник при температуре 4—6°С или подвергают центрифугированию при 3000 об/мин в течение 15 мин. В результате чего над осадком эритроцитов образуется прозрачный слой жидкости желтоватого цвета — плазмы, которую разводят физиологическим раствором 1 : 4.

3.2.25. *Приготовление дефибринированной крови*

В колбу со стеклянными бусами сливают 8 см³ только что взятой крови кролика и непрерывно встряхивают в течение 10—15 мин, в результате чего находящийся в крови фибрин выпадает в осадок и обволакивает бусы. Дефибринированную кровь сливают в другую колбу или пробирку. Слитая дефибринированная кровь утрачивает способность свертываться.

3.2.26. *Приготовление среды с безоксирибонуклеиновой кислотой*

В стерильный растопленный 2%-ный мясо-пептонный агар, приготовленный по п. 3.2.4 или по п. 3.2.5, добавляют натриевую соль дезоксирибонуклеиновой кислоты из расчета 2 г на 1 см³ среды. Перед добавлением дезоксирибонуклеиновой кислоты растворяют в дистиллированной воде, содержащей три—пять капель 1 н. раствора гидрата окиси натрия. Среду стерилизуют 30 мин в водяной бане. В среду добавляют хлористый кальций из расчета 0,8 мг на 1 см³, разливают в чашки и подсушивают на воздухе. Среда должна иметь pH 8,6.

3.2.27. *Приготовление кровяного агара*

К 100 мл расплавленного стерильного мясо-пептонного агара, приготовленного по п. 3.2.4 и охлажденного до температуры 45°С, стерильно прибавляют 5—10 см³ дефибринированной стерильно взятой крови лошади, кролика или барана. Готовую среду разливают в стерильные чашки Петри, дают ей застыть и подсушивают в термостате при температуре 37°С. Слой агара должен быть равномерно окрашен в красный цвет.

3.2.28. *Приготовление среды Китт-Тароцци*

500 г говяжьей печени режут на куски массой по 30—40 г, заливают водой и кипятят в течение 15—20 мин. Воду сливают, куски печени разрезают на кусочки массой 1,5—3,0 г, заливают водой, подщелоченной двууглекислым натрием до pH 7,2—7,4, и кипятят в течение 10—15 мин, не допуская бурного кипения. Общее количество добавленной воды 1000 см³. Затем печень промы-

вают в дуршлаге под струей воды в течение 1 ч и два-три раза дистиллированной водой.

Кусочки печени раскладывают во флаконы, заливают водой и стерилизуют 20 мин при температуре 120°С.

Для приготовления среды Китт-Тароцци пробирки заполняют на 1,0—1,5 см кусочками печени, заливают мясо-пептонным бульоном, приготовленным по п. 3.2.2, с добавлением 1 г глюкозы. Высота слоя бульона 6—7 см в обычных пробирках, 9—10 см — в высоких. На поверхность среды в пробирке перед стерилизацией наслаивают 0,5—1 см³ вазелинового масла. Стерилизуют 20 мин при температуре 120°С.

3.2.29. *Приготовление среды Вильсона-Блэра*

На дистиллированной воде готовят 20%-ный раствор серноватистокислого натрия и 8%-ный раствор хлористого железа. Оба раствора кипятят.

100 см³ 3%-ного мясо-пептонного агара, приготовленного по п. 3.2.4 или п. 3.2.5, растапливают на водяной бане и добавляют 1 г глюкозы, 10 см³ 20%-ного раствора серноватистокислого натрия и 1 см³ 8%-ного раствора хлористого железа. Среду разливают в пробирки по 7 см³.

3.2.30. *Приготовление кровяного агара Цейсслера*

К 100 см³ мясо-пептонного агара, приготовленного по п. 3.2.4 или п. 3.2.5, добавляют 1 г глюкозы, устанавливают pH 7,2, разливают во флаконы по 100 см³ и стерилизуют 30 мин при температуре 112°С. Перед употреблением к расплавленной и охлажденной до температуры 45°С среде прибавляют 20 см³ свежевзятой дефибринированной крови кролика. Среду разливают в чашки Петри.

3.2.31. *Приготовление молока по Тукаеву*

К 1%-ной пептонной воде прибавляют 5—6 см³ обезжиренного молока, среду подвергают дробной стерилизации по 30 мин при температуре 100°С трое суток подряд.

3.2.32. *Приготовление среды «Лакмусовое молоко»*

Обезжиренное молоко стерилизуют в течение 15—20 мин при температуре 112°С. Не допускается к применению стерилизованное молоко коричневого цвета и с карамелизованным сахаром.

Перед употреблением к 200 см³ стерилизованного молока добавляют примерно 1 см³ лакмусовой настойки до получения сиреневатого окрашивания и 1 см³ солянокислого цистеина до конечной концентрации цистеина 0,08%.

Смесь асептически разливают по пробиркам высоким столбиком, кипятят на водяной бане в течение 15—20 мин и охлаждают. Среду готовят перед проведением анализов.

Для приготовления солянокислого цистеина 1 г цистеина растворяют в 0,25 см³ 1 н. раствора соляной кислоты.

3.2.33. *Приготовление лакмусовой настойки*

К 10 см³ этилового 96° спирта добавляют 1 г лакмуса и выдерживают трое суток в термостате при температуре 37°С, ежесуточно сливая окрашенный спирт и заливая новой порцией этилового спирта, после чего лакмус подсушивают в термостате, заливают дистиллированной водой и выдерживают при комнатной температуре в течение суток. Настойку фильтруют и хранят в темной склянке.

3.2.34. *Приготовление реактива Эрлиха*

В 50 см³ этилового 96° спирта растворяют 4 г парадиметиламидобензолальдегида, затем медленно добавляют 50 см³ концентрированной соляной кислоты. Реактив хранят в склянке из темного стекла при температуре 4—8°С.

3.2.35. *Приготовление реактива Ковача*

В 75 см³ амилового спирта растворяют 5 г парадиметиламидобензолальдегида, затем медленно добавляют 25 см³ концентрированной соляной кислоты. Реактив хранят в склянке из темного стекла при температуре 4—8°С.

3.2.36. *Приготовление реактива для определения сероводорода*

В 100 см³ дистиллированной воды растворяют 20 г уксуснокислого свинца и 1 г двууглекислой соды. В этом растворе пропитывают полоски фильтровальной бумаги (1×2 см) и высушивают их при температуре 18—23°С.

3.2.37. *Приготовление реактива для реакции с метилротом*

В 300 см³ этилового спирта растворяют 0,1 г метилового красного, затем смешивают с 500 см³ дистиллированной воды.

3.2.38. *Приготовление реактива для реакции Фогес-Проскауэра*

В 500 см³ дистиллированной воды растворяют 200 г гидрата окиси калия. Креатин добавляют на кончике скальпеля в одну пробирку перед употреблением. Креатин хранят в сухом месте.

3.2.39. *Приготовление насыщенного спиртового раствора метиленовой сини*

В 100 см³ этилового 96° спирта растворяют 8—9 г метиленовой сини. Раствор фильтруют.

3.2.40. *Приготовление спирто-водного раствора метиленовой сини*

К 30 см³ дистиллированной воды добавляют 1 см³ насыщенного спиртового раствора.

3.2.41. *Приготовление метиленовой сини (Леффлера)*

К 100 см³ дистиллированной воды добавляют 20 см³ насыщенного спиртового раствора метиленовой сини и 1 см³ 1%-ного спиртового раствора гидрата окиси калия.

3.2.42. *Приготовление фуксин-насыщенного спиртового раствора*

8—9 г основного фуксина высыпают во флакон, заливают 100 см³ этилового 96° спирта и ставят на 18—24 ч в термостат

с температурой 37°С. Флаконы периодически взбалтывают. В течение указанного времени значительная часть краски растворяется и на дне флакона остается осадок, свидетельствующий о насыщении раствора.

Насыщенный раствор хранят во флаконах из темного стекла.

Из насыщенного спиртового раствора готовят фуксин-спиртоводный раствор. Для этого к 1 см³ насыщенного раствора прибавляют 9 см³ дистиллированной воды.

3.2.43. *Приготовление фуксина Циля-Карболового*

1 г основного кристаллического фуксина Циля растирают в ступке с 5 г кристаллической карболовой кислоты и 0,5 см³ глицерина. Во время растирания небольшими порциями прибавляют 10 см³ этилового 96° спирта. После того, как краска полностью разотрется, прибавляют при постоянном помешивании 100 см³ дистиллированной воды. Раствор краски фильтруют. Фуксин Циля стойкий и его хранят во флаконах из темного стекла с притертой пробкой.

Перед работой к одной части карболового фуксина Циля прибавляют девять частей дистиллированной воды.

3.2.44. *Приготовление кристаллвиолета и генциан фиолетового для окраски по Граму*

В 100 см³ этилового 96° спирта растворяют 1 г кристаллвиолета и 1 см³ глицерина.

Краску наливают в лоток. Фильтровальную бумагу нарезают полосками шириной 2,0—2,5 см и длиной 30—50 см. Полоску погружают на несколько секунд в краску так, чтобы она окрасилась с обеих сторон. Окрашенные полоски вынимают пинцетом, дают краске стечь и подвешивают на шпагате для высушивания. Бумагу сушат на воздухе при температуре 18—23°С. Высушенные полоски бумаги разрезают на кусочки размером 2×2 см и хранят в банке из темного стекла.

3.2.45. *Приготовление раствора Люголя*

В 10 см³ дистиллированной воды растворяют 2 г йодистого калия. Затем прибавляют 1 г кристаллического йода. Раствор выдерживают несколько часов до полного растворения йода, после чего прибавляют 290 см³ дистиллированной воды.

3.3. *Приготовление препаратов*

3.3.1. Поверхность паренхиматозных органов тазобедренных мышц и пораженных участков мяса кролика стерилизуют, прикладывая раскаленный шпатель или обжигая тампоном, смоченным в спирте. Затем вырезают стерильными ножницами кусочки размером 1,5×1,0×1,5 или 2,0×1,5×2,5 см и прикладывают поверхностями срезов к предметному стеклу по три отпечатка на двух предметных стеклах. Препараты высушивают на воздухе, фиксируют, окрашивают по Граму, Романовскому—Гимза и метиленовой синь-

кой (в зависимости от характера патологических изменений и предполагаемого диагноза). Мазки микроскопируют.

3.3.2. *Приготовление мазков из культуры*

3.3.2.1. Метод раздавленной капли

На середину предметного стекла наносят петлей для бактериологических испытаний или пипеткой каплю анализируемой культуры, осторожно покрывают ее покровным стеклом, чтобы под ним не образовалось пузырьков воздуха и жидкость не выступала за края покровного стекла.

3.3.2.2. Для приготовления мазков требуются чистые обезжиренные предметные стекла (капли воды на поверхности чистого сухого стекла должны расплываться, а не принимать шаровидную форму). Чтобы приготовить мазок из культуры с плотной средой, на предметное стекло наносят небольшую каплю стерильного физиологического раствора или водопроводной воды, затем при соблюдении асептики открывают пробирку или чашку Петри и, захватив немного материала прокаленной и остуженной бактериологической петлей, размешивают его в этой капле. Полученную взвесь растирают на площади 1 см². Материал из жидкой среды берут пипеткой или бактериологической петлей и готовят препарат аналогичным образом непосредственно на стекле.

Приготовленный препарат высушивают на воздухе. Если высушиваемые препараты содержат патогенный материал, их накрывают стеклянным колпаком. После приготовления мазка петлю прожигают на пламени горелки, а пипетку опускают в сосуд с дезинфицирующим раствором. Для фиксации мазок трижды медленно проводят через пламя спиртовой или газовой горелки. При излишнем нагревании сильно изменяется структура клеток и мазок плохо окрашивается, при недостаточной фиксации мазок можно смыть при последующей обработке. Фиксацию можно проводить, погружая мазки в фиксирующие жидкости — на 5 мин в метиловый спирт, на 15—20 мин в этиловый 96° спирт, на 5 мин в ацетон, на 10—15 мин в смесь равных объемов абсолютного спирта и эфира по Никифорову. После фиксации препарат высушивают на воздухе.

3.3.3. *Окраска препаратов*

3.3.3.1. *Окраска мазков по Граму*

При окраске по Граму на фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги и наливают карболовый генциан фиолетового на 2 мин, после чего снимают бумажку, сливают краску и, промывая водой, наливают на мазок раствор Люголя (мазок чернеет). Через 1 мин его сливают и наливают этиловый спирт на 0,5—1 мин, причем препарат нужно покачивать и менять спирт.

Затем мазок промывают водой и дополнительно окрашивают разведенным фуксином в течение 1—2 мин. Краску сливают, промывают водой, обсушивают фильтровальной бумагой.

Окраску по Граму можно применять в видоизменении Синева, согласно которому вместо карболового генциан фиолетового применяют раствор следующего состава: 1 г кристаллвиолета, 100 см³ этилового 96° спирта, 1 см³ глицерина (необязательно). Кристаллвиолет можно заменить равным количеством метиллвиолета или генциан фиолетового.

Для окрашивания мазков на фиксированный мазок накладывают полоску фильтровальной бумаги, пропитанной спиртовым раствором кристаллвиолета, и наносят несколько капель воды, которая полностью впитывается бумагой, последняя плотно прилегает к стеклу. Выдерживают 2 мин, затем бумажку удаляют пинцетом и дальнейшую окраску производят по Граму.

3.3.3.2. *Окраска спор*

Мазок, приготовленный по п. 3.3.2, окрашивают при нагревании 1—2 мин карболовым фуксином Циля, до появления паров, промывают водой и обесцвечивают погружением в 2%-ный раствор азотной кислоты в спирте или 1%-ный водный раствор серной кислоты.

Обесцвечивать нужно так, чтобы на препарате не было видно следов красителя. Затем промывают водой и докрашивают водным раствором метиленового синего. Споры окрашиваются в красный цвет.

3.3.3.3. *Окраска капсул методом Михина*

Фиксированный мазок окрашивают в течение 2—3 мин синькой Леффлера при подогревании (до появления паров), после чего краску быстро смывают водой и мазок высушивают между листками фильтровальной бумаги. Бактерии окрашиваются в темно-синий цвет, капсулы — в светло-розовый.

3.3.3.4. *Окраска капсул методом Романовского-Гимза*

Краску Романовского-Гимза фабричного изготовления перед окрашиванием мазков растворяют из расчета одна капля краски на 1 см³ дистиллированной воды. Разведенную краску наливают в чашку Петри, на дно которой кладут две тонкие стеклянные палочки или спички. Мазок, предварительно зафиксированный метиловым спиртом, после высушивания кладут намазанной поверхностью вниз и наливают краску до соприкосновения с мазком. Мазки окрашивают в течение 30—40 мин, затем препарат промывают водой и высушивают на воздухе в вертикальном положении. Микробы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, капсулы — в красно-фиолетовый.

4. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

4.1. Определение аэробов

4.1.1. Наряду с бактериоскопией мазков-отпечатков проводят посев паренхиматозных органов, пораженных мышц кусочками размером 1,5×1,0×1,5 или 2,0×1,5×2,5 см путем контакта их с поверхностью элективных сред (Эндо, Плоскирева, Левина, висмут-сульфитный агар), а на мясо-пептонный агар путем посева взвеси материала на его поверхность. Для приготовления взвеси из глубины пораженных мышц и органов берут пробу массой 1—3 г, тщательно растирают в ступке с небольшим количеством стерильного песка, добавляют стерильный физиологический раствор или стерильную воду для разведения материала 1 : 10. Затем стерильной пипеткой берут 0,2—1 см³ взвеси и переносят на поверхность мясо-пептонного агара, приготовленного по п. 3.2.4. Внесенный материал стерильным шпателем равномерно распределяют по всей поверхности среды. Чашки с посевами помещают в термостат и выдерживают 16—24 ч при температуре 37°С, а посевы на висмут-сульфитном агаре — 48 ч. Посевы просматривают невооруженным глазом или под микроскопом с увеличением в 8—10 раз.

4.1.2. Одновременно с посевами на твердые среды проводят посевы материала на среды обогащения. Анализ проводят по следующей методике. При соблюдении асептики из образца вырезают пробы массой по 25 г (две из мышц и две из паренхиматозных органов), помещают их отдельно в стерильные ступки. Пробы хорошо измельчают и вносят в 225 см³ одной из сред: Мюллера, Кауфмана, селенитового бульона, хлористомагниевой. Посевы выдерживают 16—24 ч при температуре 37°С. Затем из сред обогащения проводят посев на элективные среды и помещают на 16—48 ч в термостат с температурой 37°С.

В зависимости от результатов бактериоскопии и характера роста на твердых питательных средах в дальнейшем проводят анализ проб из образцов на основании определенных при этом отдельных видов микробов.

4.1.3. *Определение сальмонелл*

4.1.3.1. Сущность метода заключается в определении сальмонелл на элективных средах и установлении биохимических и серологических свойств сальмонелл.

Биохимические свойства сальмонелл определяют на средах, содержащих углеводы и многоатомные спирты. Под действием ферментов, выделяемых микробами, одни среды остаются неизменными и их цвет не меняется, в то время как другие углеводы и многоатомные спирты расщепляются, образуя кислые продукты, которые изменяют цвет индикатора и соответственно цвет среды.

Некоторые сальмонеллы продуцируют и выделяют протеолитические ферменты, которые расщепляют белки до продуктов глубокого распада — индола и сероводорода.

Серологические свойства определяют в реакции агглютинации с агглютинирующими сыворотками. Поливалентную агглютинирующую сыворотку применяют для дифференциации культур рода Salmonella от других возбудителей кишечных инфекций.

На средах с лактозой (Эндо, Левина, Плоскирева) колонии сальмонелл бесцветные, на висмут-сульфитном агаре — черные с металлическим блеском, на месте снятой колонии остается черный след. Черное окрашивание среды зависит от восстановления солей бактериями.

4.1.3.2. Проведение анализа

Если наблюдается обильный рост однородных колоний (чистая культура), то эту культуру используют для анализа. В случае сомнений в чистоте культуры проводят ее пересев на скошенный мясо-пептонный агар. Посевы помещают на 24 ч в термостат с температурой 37°С.

При обнаружении характерных колоний на сальмонеллы из небольшой части колонии делают мазок, окрашивают по Граму и определяют подвижность в раздавленной капле. Бактерии сальмонелл представляют собой неспорообразующие маленькие палочки с закругленными концами, по Граму окрашиваются отрицательно. Бактерии из рода сальмонелл подвижны, но из них галлинарум и пуллорум неподвижны.

Для изучения биохимических свойств проводят посев на короткий пестрый ряд, состоящий из сред Гисса с лактозой, глюкозой, сахарозой и маннитом.

Часть подозрительной колонии снимают бактериологической петлей и размешивают в 0,5—1 $см^3$ физиологического раствора. Полученную взвесь засевают пастеровской пипеткой на указанные среды и помещают на 12—16 ч в термостат с температурой 37°С, после чего посевы просматривают и учитывают ферментативные свойства микробов. Бактерии сальмонеллезной группы не разлагают лактозу и сахарозу, не меняют окраску среды.

Бактерии сальмонеллезной группы расщепляют глюкозу с образованием кислоты и газа, а маннит — с образованием кислоты. Вследствие образования кислоты меняется цвет среды.

Для определения индола и сероводорода посев производят в пептонную воду. Подозрительную на сальмонеллу колонию растирают в 0,5—1 л физиологического раствора. Полученную взвесь засеивают пастеровской пипеткой на указанную среду и помещают на 24 ч в термостат с температурой 37°С.

Для определения индола в пробирку с суточной культурой осторожно по стенке добавляют 5—10 капель реактива Эрлиха.

При наличии индола не позднее чем через 5 мин в пограничном слое образуется ярко-красное кольцо, при отсутствии — кольцо остается светло-желтого цвета. Сальмонеллы индола не образуют.

Для определения индолообразования пользуются также реактивом Ковача. К 24-часовой культуре добавляют 0,2—0,3 см³ реактива и взбалтывают. Результаты учитывают через 10 мин; реактив поднимается на поверхность среды и при наличии индола окрашивается в темно-красный цвет.

Для определения сероводорода в пробирку с анализируемой культурой под пробки помещают полоски фильтровальной бумаги, смоченные уксуснокислым свинцом и высушенные. Полоски фильтровальной бумаги не должны соприкасаться с питательной средой. Посевы выдерживают в термостате одни—трое суток при температуре 37°С. Если культура выделяет сероводород, то бумажка, смоченная раствором уксуснокислого свинца, чернеет от образующегося сернистого свинца. Сальмонеллы выделяют сероводород.

Для полной биохимической типизации бактерий сальмонелл проводят посев на расширенный пестрый ряд (табл. 1).

При наличии в препаратах палочек, характерных для сальмонелл и других грамотрицательных бактерий, культуру анализируют в реакции агглютинации на предметном стекле с поливалентной О-сывороткой.

Поливалентную агглютинирующую сыворотку применяют для дифференциаций культур рода Salmonella от других возбудителей кишечных инфекций, а монорецептурные О- и Н-сыворотки — для идентификации сальмонеллезных культур.

Предварительно культуры испытывают в реакции агглютинации на предметном стекле с поливалентной сывороткой.

Отрицательная реакция с поливалентной сывороткой означает, что испытуемая культура не принадлежит к роду Salmonella пяти основных групп (B, C_1, C_2, $Д_1$, E_1) и последующий анализ с О- и Н-агглютинирующими сыворотками не проводят.

Положительная агглютинация анализируемой культуры дает основание отнести ее к роду Salmonella одной из пяти основных групп (B, C_1, C_2, $Д_1$, E_1). Такую культуру окончательно идентифицируют в реакций агглютинации с О- и Н-сыворотками, устанавливая в культуре наличие лишь основных, имеющих дифференциальное значение антигенов (табл. 2).

Идентификацию сальмонеллезных культур проводят в следующем порядке. Сначала культуру испытывают в реакции агглютинации с одной из О-сывороток, которую выбирают для кролика. При отрицательной реакции с первоначально взятой О-сывороткой культуру испытывают в реакции агглютинации с остальными четырьмя групповыми О-сыворотками и на основании положительной реакции агглютинации относят культуру к одной из групп.

Таблица 1

Группа	Тип	Лактоза	Глюкоза	Маннит	Сахароза	Мальтоза	Адонит	Дульцит	Арабиноза	Ксилоза	Рамноза	Мочевина	Инозит	Образование индола	Образование сероводорода
B	Sal. abortus (equi)	—	+	+—	+	—	+	—+	+	V+	+	—	—	—	—
	Sal. abortus ovis	—	+	+	+	—	+	V	×	V	×+	—	—	—	×+
	Sal. typhi murium (Breslau)	—	+	+	+	+	+	+	+	V	V	—	V	—	×
	Sal. paratyphi B	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+—	—	—	—	+++
	Sal. abortus bovis	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—	+
	Sal. heidelberg	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+
C_1	Sal. cholerae suis	—	+	+	+	—	—	×	+	+	+	—	+	—	+
	Sal. cholerae suis var Künzendorf	—	+	+	+	—	—	+	—	+	—	—	—	—	+
C_2	Sal. newport	—	+	+	+	—	—	×	+	+	—	—	—	—	+
	Sal. bonariensis	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—	+
$Д_1$	Sal. enteritidis Gärtneri	—	+	+	+	—	—	V	V	V	V	—	—	—	+
	Sal. gallinarum	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+
	Sal. pullorum	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+
E_1	Sal. anatum	—	+	+—	+	+	—	+	+	+	+	—	+	—	+
	Sal. london	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	—	+

Условные обозначения:

«—» — отрицательный результат;
«—+» — отрицательный, иногда положительный результат;
«+» — положительный результат;
«+—» — положительный, редкие типы отрицательные;
«V» — различные биохимические типы;
«X» — поздний или непостоянный положительный или отрицательный результат.

Таблица 2

Группы	Тип	О-антигены (соматические)	Н-антигены (жгутиковые)	
			I фазы	II фазы
B	Sal. abortus (equi)	4	—	enx
	Sal. abortus ovis	4	c	1,6
	Sal. typhi murium (Breslau)	4,5	*i*	1,2
	Sal. paratyphi B	4,5	*b*	1,2
	Sal. abortus bovis	4	*b*	enx
	Sal. heidelberg	4,5	*r*	1,2
C_1	Sal. cholerae suis	7	c	1,5
	Sal. cholerae suis Var. Künzendorf	7	—	1,5
C_2	Sal. newport	8	*eh*	1,2
	Sal. bonariensis	8	*i*	enx
$Д_1$	Sal. enteritidis Gärtner (diblin)	9	*gp*	—
	Sal. gallinarum	9	—	—
	Sal. pullorum	9	—	—
E_1	Sal. anatum	3,10	*eh*	1,6
	Sal. london	3,10	*lv*	1,6

Культуру анализируют в реакции агглютинации с Н-сыворотками I и II фазы. В выборе сывороток для реакции исходят из антигенной структуры сальмонелл той группы, к которой отнесена определенная культура с учетом животного, от которого она выделена.

На основании положительной реакции агглютинации с определенными О- и Н-сыворотками анализируемую культуру относят к одному из серотипов.

Для проведения реакции агглютинации на предметное стекло наносят каплю неразведенной поливалентной О-сыворотки. Платиновой петлей берут анализируемую 20-часовую культуру, выращенную на мясо-пептонном агаре, приготовленном по п. 3.2.4 или п. 3.2.5. Для агглютинации с поливалентной и О-сыворотками с верхней части агара, а для агглютинации с Н-сыворотками — из нижней части пробирки вблизи конденсационной воды.

Культуру тщательно растирают на стекле у границы капли сыворотки с последующим смешиванием со всей каплей.

В положительных случаях О-агглютинация наступает медленно, а агглютинат имеет вид плотных с трудом разбиваемых комочков и зернышек. Н-агглютинация наступает быстрее и агглютинат имеет вид крупных рыхлых легко разбивающихся хлопьев.

Агглютинат в реакции с поливалентной сывороткой имеет смешанный характер (хлопья, зернышки, комочки).

При отрицательной реакции культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки распределяется в ней в виде гомогенной взвеси.

Реакцию агглютинации проводят при хорошем освещении с использованием лупы.

4.1.3.3. Обработка результатов

Обнаружение подвижных (кроме Sal. gallinarum, Sal. pullorum), грамотрицательных, не разлагающих лактозу и сахарозу, разлагающих глюкозу и маннит, выделяющих сероводород, не образующих индола, обладающих положительной агглютинацией с поливалентной монорецепторным О- и Н-агглютинирующими сыворотками бактерий указывает на бактерии рода Salmonella.

4.1.4. *Определение бактерий рода Эшерихи*

4.1.4.1. Сущность метода заключается в способности бактерий рода Эшерихи на средах с лактозой (Эндо, Левина, Плоскирева) разлагать лактозу с образованием кислоты, вызывающей окрашивание колоний в зависимости от индикатора среды и дальнейшей дифференциации бактерий по их биохимическим свойствам от других сходных микроорганизмов. Но есть отдельные бактерии рода Эшерихи, которые обладают способностью разлагать лактозу, вследствие чего цвет среды не меняется.

На среде Эндо колонии бактерий рода Эшерихи могут быть красными с металлическим блеском или без блеска, розовыми с красным центром или белыми; на среде Плоскирева — кирпично-красными с глянцевой поверхностью; на среде Левина — темно-фиолетовыми блестящими.

4.1.4.2. Проведение анализа

Из колоний, характерных для бактерий рода Эшерихи, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Бактерии рода Эшерихи — маленькие палочки с закругленными концами, по Граму окрашиваются отрицательно.

Для определения подвижности культуры и ее сохранения проводят посев в столбик 0,5%-ного полужидкого агара.

Для более четкого проявления особенности роста прокол среды делают у стенки пробирки и помещают на 24 ч в термостат с температурой 37°С.

Бактерии рода Эшерихи обладают активной подвижностью, вследствие чего в столбике полужидкого агара отмечается выраженное равномерное помутнение полужидкого агара.

Неподвижные формы микробов растут только по ходу прокола среды.

При наличии колоний, характерных для бактерий рода Эшерихи, их дифференцируют от других микроорганизмов Enterobacteriaceae по биохимическим свойствам, указанным в табл. 3.

Таблица 3

Дифференцирующие тесты	ТРИБЫ				
	Escherichieae	Edwardsielleae	Salmonelleae	Klebsielleae	Proteeae
Образование сероводорода	—	+	+	—	+—
Расщепление мочевины	—	—	—	±	+—
Образование индола	+—	+	—	—	+—
Реакция с метилротом	+	+	+	—	+
Реакция по Фогес-Проскауэра	—	—	—	+	—
Использование цитратов	—	—	+	+	±
Дезаминирование фенилаланина	—	—	—	—	+

Условные обозначения:
«+» — положительная реакция;
«—» — отрицательная реакция;
«+—» — реакция положительная, реже отрицательная;
«±» — положительная реакция, может быть отрицательной.

Для определения сероводорода анализируемую культуру засевают уколом в столбик среды Кристенсена и помещают на 24—48 ч в термостат с температурой 37°С.

Бактерии рода Эшерихи сероводорода не образуют и среда не меняет цвет.

Микроорганизмы, образующие сероводород, окрашивают среду в черный цвет.

Для установления способности бактерий рода Эшерихи расщеплять мочевину, производят посев культуры в среду с мочевиной (среда Христенсена) и выдерживают 24 ч в термостате при температуре 37°С. Бактерии рода Эшерихи не расщепляют мочевину и цвет среды не меняется. При наличии бактерий, расщепляющих мочевину, реакция среды становится резко щелочной и среда приобретает малиновый цвет.

Индол определяют с реактивом Ковача по п. 3.2.35. Бактерии рода Эшерихи чаще образуют индол.

Для определения интенсивности кислотообразования и способности рода Эшерихи продуцировать ацетилметилкарбинол (реакция Фогес-Проскауэра) проводят посев анализируемой культуры в две пробирки со средой, приготовленной по п. 3.2.19, и помеща-

ют на 24—96 ч в термостат с температурой 37°С. Затем в одну пробирку прибавляют пять-шесть капель раствора метиленового красного.

При сильном кислотообразовании среда становится ярко-красной, при слабом — красно-оранжевой. При отрицательной реакции среда становится желтой.

Бактерии рода Эшерихи разлагают глюкозу с образованием кислоты.

Для определения ацетилметилкарбинола ставят реакцию Фогес-Проскауэра. К трех-, четырехсуточной культуре прибавляют 0,5 см³ реактива Фогес-Проскауэра и на кончике скальпеля креатин. Содержимое пробирки взбалтывают и выдерживают 4 ч при температуре 18—24°С.

В результате образования ацетилметилкарбинола на глюкозе цвет среды из слабо-розового переходит в красный; отсутствие изменений в цвете среды рассматривают как отрицательный результат. Бактерии рода Эшерихи не образуют ацетилметилкарбинола.

Для определения способности бактерий рода Эшерихи использовать цитраты культуру засевают на скошенный агар Симмонса, посевы выдерживают 24 ч в термостате с температурой 37°С.

Кишечная палочка не растет на среде и не меняет ее цвета, а цитратассимиллирующие микробы растут хорошо, подщелачивают среду, тем самым вызывая ее окрашивание в синий цвет.

Для определения способности бактерий дезаминировать фенилаланин производят обильный посев культуры в пробирки со скошенным фенилаланиновым агаром и выдерживают 4—24 ч в термостате с температурой 37°С, после чего на косяки с культурой добавляют по четыре-пять капель 0,5 см³ раствора хлорида окиси железа. При дезаминировании фенилаланина среда окрашивается в зеленый цвет. Бактерии рода Эшерихи не дезаминируют фенилаланин и цвет среды не меняется.

4.1.4.3. Обработка результатов

Обнаружение подвижных грамотрицательных палочек, дающих сильное кислотообразование, образующих индол, не расщепляющих мочевину, не дезаминирующих фенилаланин, не использующих цитраты, не образующих сероводород и ацетилметилкарбенол указывает на бактерии рода Эшерихи.

4.1.5. *Определение бактерий листерий и пастерелл*

4.1.5.1. Сущность метода заключается в выделении бактерий листерий и пастерелл, дифференциации их по культурно-морфологическим, биохимическим свойствам и биологической пробе.

4.1.5.2. Проведение анализа

Для проведения анализа из пораженных мышц готовят препараты-отпечатки по п. 3.3.1, окрашивают по Граму и Романовскому-Гимза и микроскопируют.

Одновременно производят посев с анализируемых мышц на мясо-пептонный агар, приготовленный по п. 3.2.4, и на мясо-пептонный бульон с добавлением к нему 2 г глюкозы. Посевы выдерживают в течение 24 ч в термостате при температуре 37°С, после чего производят учет роста колоний.

Из колоний, характерных для листерий и пастерелл, готовят мазки, окрашивают их по Граму, Романовскому-Гимза и микроскопируют. Характеристика возбудителей по культурально-морфологическим свойствам приведена в табл. 4.

Таблица 4

Наименования показателей	Характеристика возбудителей	
	листереллеза	пастереллеза
Морфология в препаратах-отпечатка из материала	Мелкие, часто полиморфные палочки, расположенные одиночно, в виде римской цифры V или частокола	Мелкие палочки с закругленными концами, биополярно окрашивающиеся
Рост на мясо-пептонном агаре	Вначале, как и рожистые колонии, через 3—4 суток помутнение колоний	Такие же, как и рожистые колонии
Окраска по Граму	Положительная	Отрицательная
Подвижность	Подвижные	Неподвижные
Морфология в мазках из культуры	Короткие, прямые, овоидные палочки, иногда почти кокки, располагаются одиночно или кучками	Биполярность отсутствует
Рост на мясо-пептонном бульоне	Равномерное помутнение среды, при встряхивании получаются муаровые волны	Равномерное помутнение, затем просветление с образованием слизистого осадка, при встряхивании поднимающегося в виде косички

Для получения чистой культуры производят посев на скошенный мясо-пептонный агар. Посевы выдерживают в течение 24 ч в термостате при температуре 37°С, после чего проверяют культуру на чистоту путем микроскопии.

Для определения образования индола и сероводорода производят посев на пептонную воду, а для определения биохимических свойств производят посев на желатин и молоко.

Сероводород и индол определяют по п. 4.1.3.2.

Для определения каталазной пробы в пробирку с культурой на мясо-пептонном бульоне, выдержанной в течение 12—24 ч в термостате при температуре 37°С, добавляют 1 см³ 10%-ного раствора перекиси водорода.

При наличии каталазы жидкость вспенивается.

Для того, чтобы выделить бактерии листерий производят глазную пробу: в конъюнктивальный мешок морской свинки вводят одну-две капли смыва физиологическим раствором суточной культуры с мясо-пептонного агара и тщательно втирают в слизистую оболочку глаза морской свинки. Через 24 ч появляется отек века, гиперимия, слезотечение, через 36—72 ч веки опухают и из глаза выделяется гнойный эксудат.

Материалом для подкожного заражения лабораторных животных (кроликов, белых мышей) является 0,2—0,5 см³ чистой культуры возбудителя, животные обычно погибают через 24—48 ч.

Дифференциация листерий и пастерелл по биохимическим свойствам представлена в табл. 5.

Таблица 5

Наименование показателей	Листерии	Пастереллы
Разжижение желатина	—	—
Свертывание молока	—	—
Образование сероводорода	—	+
Образование индола	О	+
Реакция на каталазу	+	О
Действие на морских свинок	+	О

Условные обозначения:
«+» — положительный результат;
«—» — отрицательный результат;
«О» — анализы не проводятся.

4.1.5.3. Обработка результатов

Обнаружение в препаратах-отпечатках мелких палочек, расположенных одиночно в виде римской цифры пять или в виде частокола, грамположительных подвижных, а в мазках из культуры — коротких овоидных палочек, не образующих сероводород и при заражении ими морских свинок в конъюнктивидный мешочек глаза вызывающих опухоль глаза и выделение гнойного эксудата указывает на возбудителя листериоза.

Обнаружение в препаратах-отпечатках коротких палочек с закругленными концами и хорошо выраженной биполярностью, а в мазках из культуры — неспорообразующих палочек, грамотрицательных, неподвижных и не имеющих биполярности, гибель лабораторных животных через 24—48 ч после заражения культурами указывает на возбудителя пастереллеза.

4.1.6. *Определение стафилококков*

4.1.6.1 Сущность метода заключается в выделении стафилококков, установлении их патогенности в реакции коагулирования крови кролика и определении дезоксирибонуклеазной активности.

4.1.6.2. Проведение анализа

Для проведения анализа из пораженных мышц готовят препараты, производят посев на мясо-пептонный агар по п. 4.1.1.

Из колоний, характерных для стафилококков, готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Стафилококки по Граму окрашиваются положительно, имеют шарообразную форму, располагаются группами различной величины, напоминающие гроздья винограда, иногда поодиночке. После микроскопирования делают пересев на скошенный мясо-пептонный агар и помещают на 18—24 ч в термостат с температурой 37°С, после чего культуру определяют на патогенность в реакции плазмокоагуляции. Плазму крови кролика, приготовленную по п. 3.2.24, разливают в две стерильные пробирки, в одну из них вносят петлю стафилококковой культуры, другая пробирка служит для контроля. Внесенную культуру тщательно размешивают, после чего обе пробирки выдерживают 2—10 ч в термостате при температуре 37°С. Если в указанное время коагуляции не произошло, то пробирки оставляют на 18 ч при комнатной температуре. Если через 18 ч плазма не свернулась, то анализируемую культуру стафилококков относят к коагулазоотрицательной.

При получении положительной реакции плазмокоагуляции считают, что в посевах обнаружен патогенный стафилококк.

Для определения дезоксирибонуклеазной активности стафилококков производят посев на среду, приготовленную по п. 3.2.26, и выдерживают 18—20 ч в термостате при температуре 37°С, после чего прибавляют 5 $см^3$ 1 н. раствора соляной кислоты. Через 2 — 3 мин ее сливают, а через 7—10 мин определяют результат реакции.

Положительной реакцией считают образование прозрачной зоны вокруг колонии, содержащей продукты расщепления ДНК, которые не осаждаются соляной кислотой.

4.1.6.3. Обработка результатов

Обнаружение грамположительных, расположенных гроздями или поодиночке кокков, способных коагулировать плазму крови

кролика и выделять ДНК-азу указывает на патогенные стафилококки.

4.1.7. *Определение стрептококков*

4.1.7.1. Сущность метода заключается в определении характерных колоний на кровяном агаре.

4.1.7.2. Проведение анализа

Для проведения анализа производят посев на мясо-пептонный агар, приготовленный по п. 3.2.4. На мясо-пептонном агаре стрептококки образуют мелкие круглые плоские прозрачные, а затем мутнеющие колонии. Из колоний делают мазки и окрашивают по Граму. Стрептококки располагаются в мазках цепочкой длиной всего 2—3 кокка, иногда 5—8 кокков, окрашиваются положительно. Для получения чистой культуры делают пересев на сахарный бульон. Посевы помещают на 24 ч в термостат с температурой 37°С.

Стрептококки на бульоне дают придонный рост, бульон остается прозрачным.

Через 24 ч производят пересев культуры с бульона на чашки Петри с кровяным агаром, приготовленным по п. 3.2.27. Посевы выдерживают 18—24 ч в термостате при температуре 37°С.

По характеру роста на кровяном агаре стрептококки делятся на гемолитические, дающие вокруг колоний зону гемолиза; зеленяющие, образующие колонии зеленого цвета без резкого гемолиза; не изменяющие кровяного агара.

4.1.7.3. Обработка результатов

Обнаружение грамположительных расположенных цепочками кокков, вызывающих гемолиз на кровяном агаре, указывает на патогенные стрептококки в мясе кролика.

4.2. Определение анаэробов

4.2.1. *Определение Cl. perfringens.*

4.2.1.1. Сущность метода заключается в специфическом росте Cl. perfringens в лакмусовом молоке с цистеином и на среде Вильсон-Блера, на кровяном агаре, а также определении подвижности. Cl. perfringens развивается при температуре 47°С и образует в лакмусовом молоке губчатый красновато-синеватый сгусток.

На среде Вильсон-Блера отмечается сильное газообразование и помутнение среды за счет восстановления сернистокислого натрия в сульфат натрия, который взаимодействует с хлористым железом и образует черный осадок сернистого железа.

4.2.1.2. Проведение анализа

Для определения Cl. perfringens готовят препараты-отпечатки по п. 3.3.1, окрашивают по Граму и метиленовым синим и микроскопируют.

В препаратах обнаруживают короткие толстые палочки с закругленными концами, грамположительные. При окраске метиле-

новым синим обнаруживают наличие капсул. Одновременно из материала готовят взвесь по п. 4.1.1 и производят посев в две пробирки со средой Китт-Тароцци. Полученную взвесь в количестве 2—3 см³ вносят в каждую пробирку. Перед посевом среду прогревают на водяной бане 20 мин при температуре 80°С для удаления кислорода. Одну из засеянных пробирок также прогревают на водяной бане для уничтожения аэробной микрофлоры. Посевы помещают на пять суток в термостат с температурой 37°С. За появлением роста микроорганизмов наблюдают ежедневно. Развитие Cl. perfringens в среде начинается с появлением равномерной мути по всей толще столбика, отступая от его поверхности на 0,5—1,0 см. Прорастание спор и деление клеток сопровождаются выделением газа. Среда при развитии в ней Cl. perfringens дает сырный запах. Муть в среде постепенно исчезает, культура остается на дне в виде небольшого осадка. В мазках из 18-, 24-часовой культуры наблюдаются грамположительные палочки. В мазках, приготовленных из осадка, наблюдаются толстые палочки с закругленными концами, со спорами, расположенными группами параллельно друг к другу по две, одиночно или цепочкой.

Подвижность клеток определяют микроскопированием в раздавленной капле. Клетки Cl. perfringens неподвижны.

При обнаружении в среде Китт-Тароцци характерных для Cl. perfringens палочек производят посев в лакмусовое молоко с цистеином, среду Вильсон-Блера и на кровяной агар. Посевы помещают на 18—24 ч в термостат с температурой 47°С.

Посев на среду Вильсон-Блера производят следующим образом. Среду расплавляют и охлаждают до температуры 45°С. Посев производят пастеровской пипеткой вглубь так, чтобы не попали пузырьки воздуха.

Посевы на чашках Петри с глюкозо-кровяным агаром (по Цейсслеру) выдерживают в анаэростате при температуре 37°С.

При отсутствии анаэростатов можно использовать чашечный метод или метод Виньяля-Вейона.

При использовании чашечного метода в среду, приготовленную по Цейсслеру, вносят 0,25—0,5 см³ анализируемой взвеси. Среду осторожно взбалтывают без образования пены и наливают в крышку стерильной чашки Петри, после чего на почти застывший агар помещают вторую половину чашки Петри так, чтобы дно плотно соприкасалось с поверхностью залитого агара. Края чашки заливают парафином или замазывают пластилином. Чашки помещают на 18—24 ч в термостат с температурой 37°С. Выросшие колонии рассматривают с помощью лупы.

При использовании метода Виньяля-Вейона засеянный материал набирают в стеклянную трубку (пастеровские пипетки длиной 20 см и диаметром 0,75 см), один конец которой закрыт ватой,

а другой оттянут. Среду набирают не более чем на $^3/_4$ длины трубки, после чего оттянутый конец трубки запаивают. Трубки со средой помещают в термостат с температурой 37°С. На вторые—пятые сутки посевы в трубках просматривают и отмечают рост отдельных колоний. При наличии газа столбик агара разрывается.

По истечении срока термостатирования учитывают результат роста:

в пробирках с лакмусовым молоком Cl. perfringens бурно ферментирует молоко с образованием губчатого сгустка красновато-сиреневого цвета в верхней части пробирки, при этом сыворотка становится прозрачной;

на среде Вильсон-Блера через 18 ч отмечается образование в глубине агара черных колоний, разрывающих среду вследствие газообразования;

на кровяном агаре образуются круглые; влажные серовато-оливковые или зеленые с зоной гемолиза колонии.

4.2.1.3. Обработка результатов

Обнаружение неподвижных грамположительных палочек, вызывающих бурную ферментацию молока с образованием губчатого сгустка красновато-сиреневого цвета, черных колоний на среде Вильсон-Блера, серовато-оливковых или зеленых колоний с зоной гемолиза указывает на Cl. perfringens в мясе кролика.

4.2.2. В случае отсутствия Cl. perfringens анализ продолжают для выявления чистых культур анаэробов и их дифференциации по признакам, указанным в табл. 5.

4.2.3. *Определение Cl. botulinum*

4.2.3.1. Сущность метода заключается в выделении Cl. botulinum и определении специфического действия ботулинических токсинов при постановке реакции нейтрализации противоботулинической сывороткой на лабораторных животных (мышах).

4.2.3.2. Проведение анализа Cl. botulinum

Для определения Cl. botulinum готовят препараты-отпечатки по п. 3.3.1 и окрашивают по Граму и метиленовым синим, после чего микроскопируют.

Обнаружение в препаратах-отпечатках грамположительных толстых палочек с закругленными концами, палочек со спорами, имеющих вид пламени свечи или теннисной ракетки, указывает на возможность Cl. botulinum.

Взвесь готовят по п. 4.1.1 и делают посев в две пробирки со средой Китт-Тароцци. Среду предварительно кипятят в течение 20 мин. Взвесь вносят в каждую пробирку по 2—3 см^3. После посева одну из пробирок прогревают в течение 15 мин при температуре 80°С для уничтожения вегетативной микрофлоры. Посевы помещают на 24—92 ч в термостат при температуре 37°С. За ростом бактерий наблюдают ежедневно. Если возбудители ботu-

Таблица 6

Название микробов	Морфология микробов	Подвижность	Расположение спор и их форма	Форма колоний		Характер роста на молоке
				в столбике агара	на кровяном агаре	
Cl. perfingens	Толстая, грубая, иногда короткая палочка, в организме человека и животного образует капсулы	—	Спорообразование в организме наблюдается очень редко; споры расположены центрально или субтерминально	Дискообразные, чечевицеобразные, в редких случаях мохнатые	Круглые, влажные, серовато-оливковые или зеленые с зоной гемолиза	Образует буроватого цвета сгустки с отслоением сыворотки
Cl. oedematiens	Толстая, длинная палочка с закругленными концами; иногда образует цепочки	+	Овальной формы, расположены субтерминально	Пушистые колонии с уплотненным центром и тонкими пушинками по периферии	Шероховатые, выпуклые, по периферии зона гемолиза	Молоко свертывается медленно, нехарактерно
Cl. Septicum	Тонкая, с закругленными концами, часто образует длинные нити	+	Центральное или субтерминальное	Хлопьевидные, с древовидно разветвляющимися отростками	В виде извитых нитей и завитков с зоной гемолиза	Свертывается медленно и нехарактерно
Cl. histolyticum	Мелкая, с закругленными концами	+	Субтерминальное, овальной формы	Мелкие, плотные, ветвистые, темно-желтого цвета	Мелкие, гладкие, напоминающие капли росы, без гемолиза	Быстрая пептонизация без заметного свертывания
Cl. tetani	Тонкая, мелкая с закругленными концами	+	Терминальное, круглой формы (форма барабанных палочек)	Имеет сходство с комочками ваты	Нежный налет в виде переплетающихся нитей	—

Условные обозначения: «+» — подвижные; «—» — неподвижные.

лизма находятся в вегетавной форме, то будет наблюдаться рост в непрогретой пробирке. В случае наличия споровых форм рост будет наблюдаться как в прогретой пробирке, так и в непрогретой.

Рост Cl. botulinum характеризуется газообразованием и помутнением среды.

Для приготовления мазков пастеровской пипеткой берут культуру со дна пробирки. Мазки окрашивают по Граму и микроскопируют.

Возбудитель ботулизма имеет вид палочек с закругленными концами различной длины и ширины (в зависимости от типа), часто коротких цепочек. Клетки со спорой имеют вид ракетки, отделившиеся споры — овальные. Клетки в молодом возрасте грамположительные. При старении культуры (четырех и более суток) появляются грамотрицательные палочки.

Для проведения биологической пробы при определении ботулинического токсина анализируемый материал растирают в ступке со стерильным физиологическим раствором 1 : 4 и оставляют при комнатной температуре на 1—2 ч, после чего центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15—20 мин. Полученную надосадочную жидкость можно хранить в холодильнике при температуре 4±2°С и испытывать по мере необходимости. Пробы ставят на мышах.

Анализ на ботулинический токсин в мясе проводят следующим образом. Вначале ставят реакцию нейтрализации со смесью противоботулинических сывороток. Смешивают разные объемы моновалентных сывороток типа А, В, С, Е, F и 0,6 см³ полученной смеси добавляют в пробирку к 2,4 см³ исследуемого центрифугата. В другую (контрольную) пробирку к 2,4 см³ исследуемого центрифугата добавляют 0,6 см³ физиологического раствора. Содержимое пробирок перемешивают и выдерживают в течение 30 мин при температуре 18—24°С. Для биологической пробы анализируемый центрифугат вначале отбирают из контрольной, а затем из опытной пробирки по 1 см³ и вводят двум белым мышам массой по 16—18 г каждая. Осадок центрифугата сохраняют в холодильнике для дальнейшего исследования.

Наблюдение за животными ведут на протяжении 2, 4, 6, 24 ч в течение четырех суток.

При наличии ботулинического токсина две контрольные мыши (которым вводился несмешанный с сывороткой центрифугат) болеют, а иногда погибают, у мышей, которым вводился смешанный с сыворотками центрифугат, признаков заболевания ботулизмом не наблюдается.

В случае гибели контрольных и опытных мышей реакцию нейтрализации повторяют с экстрактом мяса, разведенным в 5, 10, 20 раз, что дает возможность избавиться от веществ, вызывающих нехарактерную гибель мышей.

Если в центрифугате обнаружен ботулинический токсин, то для определения типа токсина ставят развернутую реакцию нейтрализации с моновалентными типоспецифическими антитоксическими диагностическими сыворотками.

Для этого в шесть пробирок разливают по 2,4 см³ фильтрата, затем в каждую пробирку добавляют по 0,6 см³ сыворотки типа A, B, C, E и F, а в шестую контрольную пробирку добавляют 0,6 см³ физиологического раствора. Приготовленную смесь выдерживают в течение 30 мин при температуре 18—24 или 37°С, после чего вводят по 1 см³ каждой смеси внутрибрюшно двум мышам. Для взятия пробы из каждой пробирки используют чистый шприц. Результаты учитывают в течение четырех суток через 4—6 ч, затем через 24 ч. Выживают мыши, получившие смесь токсина и гомологической сыворотки, остальные мыши погибают.

Типовую принадлежность определяют по типам сывороток, нейтрализующих токсин.

4.2.3.3. Обработка результатов

Обнаружение палочек, типичных по морфологии для Cl. botulinum и ботулинического токсина, указывает на заражение мяса кролика возбудителем ботулизма.

Редактор *Т. И. Василенко*
Технический редактор *Э. В. Митяй*
Корректор *Г. И. Чуйко*

Сдано в наб. 29.11.85 Подп. в печ. 29.01.86 2,75 усл. п. л. 3,0 усл. кр.-отт. 2,92 уч.-изд. л.
Тираж 10 000 Цена 15 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123840, Москва, ГСП,
Новопресненский пер., д. 3.
Вильнюсская типография Издательства стандартов, ул. Миндауго, 12/14. Зак. 5334.

gost.e-ecolog.ru