МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минсельхозпрод России)
ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ
107139, Москва, Орликов пер., 1/11
Для телеграмм: Москва, 84
Минроссельхозпрод
Телекс: 417738 ЛЕН
Телефон: 975-58-50

УТВЕРЖДАЮ
Зам. руководителя Департамента
ветеринарии Министерства
сельского хозяйства и
продовольствия РФ

В.В.Селиверстов

21 октября 1999 г.

11.10.99г. N 13-7-2/1759

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями

1. Общие положения

1.1. Смешанная кишечная инфекция - остропротекающая инфекционная болезнь молодняка разных видов сельскохозяйственных животных, которая имеет полиэтиологическую природу и вызывается двумя-тремя и более видами патогенных энтеробактерий, относящимся к родам Escherichia, Citrobacter, Proteus, Morganella, Klebsiella, Salmonella. Помимо указанных микроорганизмов возбудителями болезни могут быть также бактерии других родов и семейств – Yersinia, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Clostridium и пр. Наряду с бактериальными агентами нередко (особенно на крупных фермах) болезнь обусловливают корона- и ротавирусы.

1.2. Болезнь возникает в первые дни и недели жизни животных и проявляется чаще в виде энзоотической вспышки , развитию которой способствуют различные факторы, связанные с несоблюдением

gost.e-ecolog.ru

технологических и ветеринарно-санитарных требований воспроизводства стада, а также нарушением режимов содержания и кормления молодняка.

1.3. Смешанная кишечная инфекция может протекать в кишечной (энтеритной) и септической формах. При кишечной форме возбудители болезни локализуются только в желудочно-кишечном тракте и брыжеечных лимфоузлах, регионарных пораженным участкам кишечника; при септической форме - в паренхиматозных органах, различных тканях, а также в кишечнике и брыжеечных лимфоузлах. Основными клиническими признаками болезни являются: потеря аппетита, понос, переходящий в профузный, нарастающая слабость, депрессия, учащенное дыхание и сердцебиение, обезвоживание организма (при затяжном течении); нередко наблюдается поражение центральной нервной системы (возбуждение, судороги), иногда пневмония, артриты; температура тела в пределах нормы, в отдельных случаях повышена на 0,5-1 °С, в предагональном состоянии она снижается ниже нормы.

1.4. Патологоанатомические изменения у погибших животных имеют картину катарального или катарально-геморрагического гастроэнтерита, на слизистой желудка, тонкого отдела кишечника и слепой кишки мо: встречаться язвы, нередко отмечаются множественные точечные, полосчатые и пятнистые кровоизлияния на слизистой желудка, толстого и тонкого отделов кишечника, под капсулой селезенки, эпи- и эндокарде (клапанах); иногда отмечается очаговая катаральная пневмония и отек легких, дистрофия печени; регионарные брыжеечные лимфатические узлы как правило увеличены, отечны, на разрезе розового или красно-вишневого цвета; при вскрытии черепной коробки – гиперемия кровеносных сосудов и отек ткани головного мозга. Указанные изменения могут быть в отдельных или одновременно в нескольких органах.

1.5. Диагноз на смешанную кишечную инфекцию в хозяйствах устанавливают на основании совокупности эпизоотологических данных (возраст заболевших животных, массовость поражения, стационарность и др.), клинических признаков болезни, патологоанатомической картины и результатов бактериологического (при необходимости еще и вирусологического) исследования патологического материала от больных или погибших животных.

2. Отбор материала для исследования

2.1. Для посмертной бактериологической диагностики в лабораторию направляют 2-4 свежих трупа погибших или убитых с диагностической целью больных животных (желательно не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами). В случае невозможности доставки целого трупа посылают следующий патологический материал: голову, трубчатую кость, сердце, перевязанное лигатурой вблизи разреза сосудов и аорты, селезенку, долю печени с желчным пузырем, брыжеечные лимфатические узлы, регионарные воспаленному участку кишечника, а также пораженный отрезок тонкого отдела кишечника, перевязанный с двух концов лигатурой (в отдельной таре или полиэтиленовом пакете). Указанный патологический материал исследуют в день поступления его в лабораторию.

2.2. Для прижизненной бактериологической диагностики в лабораторию направляют фекалии больных диареей животных, не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами. Пробы фекалий берут от 5-6 больных животных одной фермы в стерильные пробирки по 2-3 г непосредственно из прямой кишки с помощью прокипяченного резинового катетера. Пробирки вместе с сопроводительной запиской упаковывают в полиэтиленовый пакет или картонную коробку.

При невозможности быстрой доставки проб фекалий в лабораторию (через 3-4 часа после взятия) их консервируют стерильным 30% -ным глицериновым раствором в соотношении 1:2 (см. приложение).

2.3. Пробы фекалий и содержимого тонкого отдела кишечника (в количестве не более 0,5 г) разводят в 10 см ^{3} стерильного 0,85%-ного раствора хлорида натрия, тщательно размешивают и затем выдерживают 10-15 минут при комнатной температуре для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость используют для посева на питательные среды не позднее 1-2 часов после приготовления взвесей. При исследовании консервированных фекалий, их тщательно размешивают, после чего разводят физиологическим раствором в 5-10 раз.

3. Выделение культур энтеробактерий, изучение их морфологических, культуральных и ферментативных свойств

3.1. Патологический материал (за исключением содержимого тонкого отдела кишечника и фекалий) засевают в пробирки с МПБ и на плотные дифференциально-диагностические среды в чашках: Эндо (или Левина) и среду Плоскирева (или висмут-сульфит агар). Содержимое тонкого отдела кишечника и фекалий засевают только на указанные выше плотные среды в чашках. Кроме того для выделения из фекалий сальмонелл неразведенные пробы фекалий засевают еще в одну из сред сбогащения (селенитовый бульон, магниевую, Мюллера или др.) в соотношении 1 : 5.

3.1.1. Посев материала в МПБ проводят пастеровской пипеткой. Посевы на плотные среды в чашках из внутренних органов и тканей, указанных в п.2.3, делают путем отпечатков разрезанной поверхностью кусочка органа из предварительно профламбированного участка на подсушенную питательную среду или вносят материал пастеровской

пипеткой на поверхность среды, а затем равномерно растирают его стеклянным шпателем.

3.1.2. Содержимое тонкого отдела кишечника, взятое путем соскоба с пораженного участка слизистой оболочки, суспендируют в 10 $см^3$ стерильного 0,85%-ного раствора хлорида натрия, затем засевают суспензию бактериологической петлей на подсушенные в термостате плотные дифференциально-диагностические среды в чашках широким частым штрихом по всей поверхности среды. Аналогичным образом проводят посев разведенных фекалий.

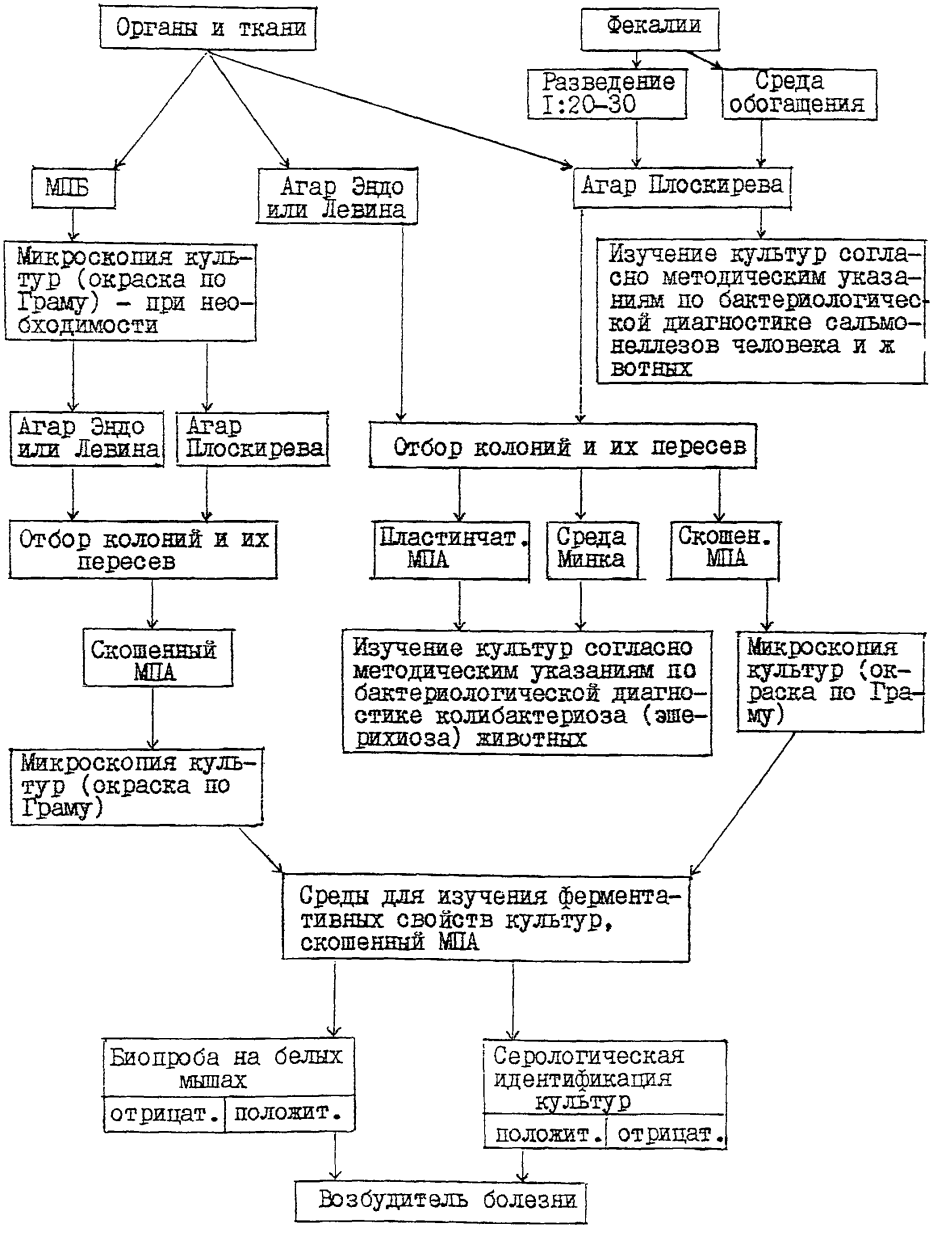
3.2. Пробирки с посевами в МПБ из внутренних органов и тканей инкубируют при температуре 37-38 °С в течение 18-24 часов. При наличии в МПБ помутнения среды культуру микроскопируют и в случае обнаружения мелких грамотрицательных палочек пересевают ее на агар Эндо (или Левина) и среду Плоскирева (или висмут-сульфит агар) в чашках, которые помещают в термостат (37-38 ° С) на 18-24 часа.

Пересев культур, полученных в МПБ, на плотные селективные среды проводят в том случае, если отсутствует рост колоний на этих средах в первичных посевах из соответствующих органов и тканей.

3.3. Чашки с посевами на агаре Эндо (или Левина) из внутренних органов, тканей или фекалий инкубируют при температуре 37-38 ° С в течение 18-24 часов. После просмотра культур пересевают колонии лактозоположительных бактерий (круглые, средних размеров S-формы, красно-малинового цвета на агаре Эндо и темно-фиолетового цвета на агаре Левина с наличием или отсутствием металлического блеска) в чашки с МПА и средой Минка в соответствии с рекомендациями, изложенными в действующих «Методических указаниях по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных».

При наличии на агаре Эндо (или Левина) роящегося налета, харак-

СХЕМА
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА СМЕШАННУЮ КИШЕЧНУЮ ИНФЕКЦИЮ



теплого для протея, пересевают его на скошенный МПА (культуры из двух-трех внутренних органов, тканей или фекалий). Чашки и пробирки с посевами инкубируют 18-20 часов при той же температуре.

3.4. Чашки с первичными посевами на агаре Плоскирева инкубируют при температуре 37-38 °С в течение 24-36 часов. После просмотра культур пересевают мелкие круглые колонии S-формы полупрозрачные, сероватого цвета с голубым оттенком в пробирки со скошенным МПА (по 1-2 колонии с культур из двух-трех внутренних органов, тканей или фекалий, каждую колонию в отдельную пробирку), которые помещают в термостат на 18-24 часа.

В том случае, если пересев проводят на комбинированную среду (Олькеницкого, Клиглера), то каждую колонию пересевают в одну пробирку с этой средой и в одну пробирку со скошенным МПА.

3.5. Суточные культуры бактерий на скошенном МПА или комбинированной среде, выделенные из внутренних органов, тканей или фекалий, микроскопируют (окраска по Граму) и при наличии в мазках однородных мелких грамотрицательных палочек, не образующих спор и капсул (бактерии вида Klebsiella pneumoniae образуют капсулу), используют для изучения ферментативных, патогенных, антигенных свойств, а также (при необходимости) определения подвижности в полужидком МПА. Для выявления у культур клебсиелл капсулы окраску мазков проводят по методу Гинса (тушью).

3.6. Ферментативные свойства изучают у 2-6 агаровых (в порядке исключения у бульонных) культур бактерий, выделенных из одного патологического материала, на наборе сред с углеводами и индикатором Андреде или полужидких средах с индикатором ВР, куда входят среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом, мальтозой, а также на средах с мочевиной, сернокислым железом (определение сероводорода), агаре

Симонса, в бульоне Хоттингера или МПБ (определение индола), мясо-пептонной желатине, среде с фенилаланином.

При использовании комбинированной среды Олькеницкого или Клиглера учитывают изменения, вызываемые представителями разных родов энтеробактерий в этой среде, после чего данную культуру изучают по другим необходимым биохимическим тестам.

Засеянные пробирки инкубируют при температуре 37-38 °С.

Предварительные результаты изучения ферментативных свойств культур учитывают через 24 часа, окончательные результаты – через 48 часов. Изучение ферментативных свойств культур энтеробактерий можно проводить также с помощью тест-системы для биохимической идентификации энтеробактерий. Родовую и видовую принадлежность культур устанавливают по показателям таблицы.

Следует учитывать, что у бактерий рода Proteus встречаются нероящиеся штаммы, образующие при росте на плотных питательных средах мелкие круглые колонии S-формы сероватого цвета. Важными признаками родовой идентификации таких штаммов является их способность дезаминировать фенилаланин и разжижать желатин.

При наличии у культур отклонений от основных показателей таблицы используют дополнительные тесты: реакции с метилротом и Фогес-Проскауэра, наличия образования оксидазы, определение подвижности и др.

4. Серологическая идентификация культур бактерий

4.1. Серологическую идентификацию культур эшерихий и сальмонелл проводят в соответствии с действующими "Методическими указаниями по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных" и "Методическими указаниями по лабораторной диагностике сальмонеллезов человека и животных, обнаружению сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды".

Дифференциальные признаки энтеробактерий по ферментативным свойствам

№ п/п	Тесты	РОДЫ И ВИДЫ БАКТЕРИЙ											
		Escherichia coli	Citrobacter		Enterobacter		Klebsiella pneumoniae	Salmonella (подрод 1)	Proteus			Morganella morganii	Yersinia enterocolitica (t° 22-25°C)
			freundii	diversus	aerogenes	cloacae			vulgaris	mirabilis	myxofaciens		
	Основные												
1	Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ (к)
2	Лактоза	(±)	(±)	(±)	(±)	(±)	+	-	-	-	-	-	-
3	Сахароза	±	±	±	+	(±)	+	-	+	±	+	-	+
4	Маннит	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
5	Мальтоза	±	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
6	Рост на агаре Симонса	-	+	+	+	+	+	(±)	±	+	±	-	-
7	Образование индола	(±)	-	+	-	-	±	-	+	-	-	+	±
8	Образование сероводорода	-	+	-	-	-	-	(±)	+	+	-	-	-
9	Расщепление мочевины	-	±	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
10	Разжижение желатины	-	-	-	±	- (+)	-	-	+	+	+	-	-
11	Дезаминирование фенилаланина	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	Дополнительные												
1	Реакция с метилротом	+	+	+	-	-	±	+	+	+	+	+	-
2	Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	-	+	+	±	-	-	±	+	-	+
3	Подвижность	±	(±)	(±)	+	+	-	(±)	+	+	+	(±)	+

Обозначения: «+» – ферментация сахара (КГ), образование индола , расщепление мочевины и т.д.

«-» – отсутствие ферментации сахара, образования индола, расщепления мочевины и т.д.

«±» - различные показатели

«(-)» – отдельные штаммы не вызывают ферментации сахара, образования индола и т.д.

«(+)»- замедленное разжижение желатины

Культуры названных бактерий относят к возбудителям болезни на основании показателей, указанных в этих методических указаниях.

4.2. Для серотипирования культур морганелл, выделенных из патологического материала, применяют набор нативных морганеллезных агглютинирующих серогрупповых сывороток. Серологическую типизацию культур осуществляют в соответствии с наставлением по применению указанных сывороток, утвержденным Департаментом ветеринарии МСХиП РФ 28.04.1997 г. При выделении культур морганелл патогенной серологической группы их относят к возбудителям болезни и у таких культур патогенные свойства в биопробе на белых мышах не определяют.

4.3. Ускоренное обнаружение эпизоотических штаммов морганелл в первичных смешанных культурах, полученных после посева патологического материала на среду Плоскирева, с одновременной серологической типизацией их осуществляют в реакции нейтрализации антител (РНАт) в соответствии с "Методическими указаниями по ускоренной индикации эпизоотических штаммов морганелл в реакции нейтрализации антител", утвержденными Департаментом ветеринарии МСХиП РФ 24.03.1999 г. Для постановки РНАт применяют набор агглютинирующих морганеллезных серогрупповых сывороток, указанный в п.4.2, и набор морганеллезных эритроцитарных диагностикумов, которые используют в соответствии с "Наставлением по применению набора диагностикумов морганеллезных эритроцитарных", утвержденному Департаментом ветеринарии МСХиП РФ 24.03.1999 г. При обнаружении в реакции нейтрализации антител эпизоотических штаммов морганелл серогрупп О1, О16, О26, О29, О33, О45, О49, "13" выделение чистых культур данных бактерий и изучение их морфологических, культурально-биохимических и патогенных свойств не проводят.

5. Определение патогенных свойств культур бактерий

5.1. Патогенные свойства определяют у культур бактерий, относящихся к родам Proteus, Citrobacter, Klebsiella, а также родам Escherichia и Morganella, не имеющих адгезивные антигены и не типируемых по О-антигену, в биопробе на белых мышах.

5.2. Для определения патогенных свойств бактерий используют агаровые культуры вышеуказанных микроорганизмов, выделенные из двух внутренних органов и тканей погибших или фекалий больных животных. С каждой из двух культур одного вида бактерий готовят смывы стерильным физиологическим раствором, устанавливают взвесь бактерий в концентрации 1 млрд микробных клеток/см^3 (10 единиц по оптическому стандарту мутности), после чего их смешивают в равной пропорции.

5.3. Взвесями культур каждого вида бактерий заражают по три белые мыши массой 14-15 г внутрибрюшинно в дозе 0,5 млрд микробных клеток. Культуру признают патогенной в случае гибели двух и более мышей в течение трех суток после заражения и относят ее к возбудителю болезни.

5.4. При выделении культур энтеробактерий, относящихся к одному виду того или иного рода, указанного в п.1.1, из селезенки, крови сердца, костного, головного мозга (не менее, чем из двух перечисленных органов и тканей) свежего трупа животного патогенные свойства этих культур в биопробе на белых мышах не определяют и их серологическую типизацию не проводят; такие культуры относят к возбудителю болезни.

6. Учет результатов бактериологического исследования

6.1. Бактериологический диагноз на смешанную кишечную инфекцию молодняка сельскохозяйственных животных устанавливают на основании выделения из патологического материала культур,

принадлежащим к двум и более родам энтеробактерий, указанных в п.1.1, и относящихся к возбудителям болезни по одному из показателей, изложенных в п.п.4.1,4.2,5.3,5.4.

6.2. Результаты бактериологического исследования формулируют: «Из присланного патологического материала (указать какого) выделены возбудители смешанной кишечной инфекции (указать какие виды бактерий, типы адгезивных антигенов у энтеропатогенных эшерихий, серогруппу в случае серотипирования культур эшерихий и морганелл)».

6.3. При необходимости определяют антибиотикочувствительность каждого вида выделенной культуры возбудителя кишечной инфекции в соответствии с действующими «Методическими указанию по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных».

6.4. Общий срок бактериологического исследования патологического материала до 7 суток.

Методические указания разработаны Л.С. Кавруком, С.В. Бритовой, А.Б. Кононенко (ВНИИ ветсанитарии, гигиены и экологии), В.А. Седовым, Л.А. Тарановой (Центральная научно-методическая ветлаборатория Минсельхозпрода РФ).

С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают силу "Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями", утвержденные ГУВ Министерства сельского хозяйства и продовольствия СССР 12 ноября 1991г .

05 10 99

Приложение

Рецепты приготовления реактивов, питательных сред и методы определения ферментативных свойств культур бактерий

1. Глицериновый раствор для консервирования фекалий

Состав: Глицерин нейтральный - 300 $см^3$

Натрий хлористый - 5 г

Вода дистиллированная - 700 $см^3$

Раствор стерилизуют при 1 атм (121 °С) в течение 20 мин или прогревают в водяной бане (100 °С) в течение 30-40 мин.

2. Среда с мочевиной (по Преусу)

Состав: Бульон Хоттингера или

мартеновский бульон - 1000 $см^3$

Агар-агар - 15 г

Глюкоза - 5 г

50% водный раствор мочевины - 20 $см^3$

0,2% раствор бромтимолблау - 12 $см^3$

Приготовление: к стерильному расплавленному агару на бульоне Хоттингера или мартеновском бульоне с pH 6,9-7,0 добавляют глюкозу, растворы мочевины и индикатора бромтимолблау. Расплавленную среду разливают в стерильные пробирки по 5 $см^3$ и стерилизуют однократно текучим паром 20 мин. Перед употреблением среду скашивают. Готовая среда имеет зеленовато-оливковый цвет.

При расщеплении мочевины среда приобретает синий цвет, при отсутствии расщепления мочевины она окрашивается в желтый цвет.

3. Цитратный агар Симонса

Для определения способности бактерий усваивать цитратно-аммонийные соли используют коммерческую сухую среду, которую

готовят согласно указаниям на этикетке препарата, или агар Симонса, приготовленный на основе жидкой среды Козера.

Состав среды Козера:

Натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный ($NaNH_4\ HPO_4 \times 4H_2O$) - 1,5 г

Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) - 1 г

Магний сернокислый ($MgSO_4 \times 7H_2O$) - 0,2 г

Натрий лимоннокислый ($Na_3C_6H_5O_7 \times 5H_2O$) - 3 г

Дистиллированная вода - 1000 $см^3$

Для приготовления агара Симонса к 1$дм^3$ среды Козера добавляют 20 г агар-агара и 10 $см^3$ индикатора бромтимолблау. Последний готовят из расчета: бромтимолблау 1 г; 0,1 N раствор NaOH – 25 $см^3$ (для получения указанного раствора к 100 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 0,4 г NaOH), дистиллированная вода – 475 $см^3$.

Среду нагревают до полого расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, затем разливают в пробирки по 5 $см^3$ и стерилизуют при 0,5 атм в течение 15 мин. Готовая среда имеет зеленовато-оливковый цвет. Перед употреблением среду скашивают.

Бактерии, способные усваивать цитратно-аммонийные соли, дают рост на агаре Симонса с изменением его в синий цвет. При отсутствии указанного свойства роста культуры не происходит и цвет среды не изменяется.

4. Среда для определения сероводорода

К 1 $дм^3$ расплавленного стерильного 1,7%-ного МПА добавляют 0,2 г сернокислого железа ($FeSO_4x7H_2O$), 0,3 г серноватистокислого натрия-тиосульфата ($Na_2S_2O_3x5H_2O$), 1 г лактозы, 12 $см^3$ 0,2% водного раствора фенолрота. После размешивания компонентов среду разливают в стерильные пробирки по 6-7 $см^3$ и стерилизуют текучим паром в течение

20 мин. Готовая среда имеет бордово-красный цвет. Перед употреблением среду скашивают так, чтобы она имела столбик размером 2,5-3 см.

Среду засевают агаровой культурой бактерий вначале на скошенную поверхность, а затем уколом в столбик. В случае образования сероводорода среда в столбике окрашивается в черный цвет. При отрицательном результате почернения среды не наступает.

5. Реактивы для обнаружения индола

5.1. Реактив Эрлиха

Состав: Пара-диметиламинобензальдегид - 1 г

Спирт этиловый 96° - 95 $см^3$

Соляная кислота концентрированная - 20 $см^3$

Приготовление и хранение: альдегид растворяют в спирте, затем добавляют кислоту; хранят реактив в закрытом темном флаконе.

5.2. Реактив Ковача

Состав: Пара-диметиламинобензальдегид - 5 г

Спирт амиловый - 75 $см^3$

Соляная кислота концентрированная - 25 $см^3$

Приготовление и хранение: альдегид растворяют в спирте при нагревании в водяной бане (50-55 °С), после остывания смеси добавляют кислоту; хранят реактив при температуре 4-6 °С.

Применение реактивов: к двухсуточной культуре бактерий в бульоне Хоттингера добавляют 0,5 $см^3$ реактива Эрлиха или Ковача, пробирки встряхивают и через 1-2 мин учитывают результаты. В случае образования индола верхний слой жидкости приобретает красно-малиновый цвет, при отрицательной реакции он окрашивается в желтый цвет.

5.3. Индикаторные бумажки для определения индола

Предварительно готовят следующий реактив:

Пара-диметиламинобензальдегид - 5 г

Ортофосфорная кислота концентрированная - 10 $см^3$

(H_3PO_4)

Спирт этиловый 96 ° - 50 $см^3$

Полученный реактив переливают в эмалированный металлический кювет, в который помещают кусочки фильтровальной бумаги. Смоченные реактивом бумажки высушивают на воздухе при комнатной температуре, затем нарезают полосками размером 0,7-0,8 х10-12 см. Бумажки имеют желтый цвет. Хранят их в банке из темного стекла, закрытой резиновой или корковой пробкой.

Для приготовления индикаторных бумажек можно использовать реактив Эрлиха или Ковача.

Применение: после посева изучаемой культуры бактерий в бульон Хоттингера или МПБ помещают в пробирку полоску индикаторной бумажки, верхний конец которой прижимают ватной пробкой. Нижний конец бумажки должен быть на расстоянии не менее 2-3 см от поверхности среды. Засеянные пробирки инкубируют в термостате в течение двух суток. При наличии индолообразования нижний конец индикаторной бумажки окрашивается в красно-малиновый цвет, при отрицательной реакции цвет бумажки не изменяется.

6. Среда с фенилаланином

Для определения способности бактерий дезаминировать фенилаланин используют коммерческую сухую среду, которую готовят по прописи, указанной на этикетке, или среду приготовленную по следующему рецепту:

Дрожжевой экстракт сухой - 3 г

DL-фенилаланин - 2 г

(или L-фенилаланин – 1 г)

Натрий фосфорнокислый

двузамещенный ($Na_2HPO_4x12H_2O$) - 1 г

Натрий хлористый (NaCl) - 5 г

Агар-агар - 12 г

Вода дистиллированная - 1000 $см^3$

Компоненты растворяют в воде при нагревании, pH не устанавливают, среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки по 3-4 $см^3$ и стерилизуют при 0,5 атм в течение 15 мин. После стерилизации среду скашивают.

Применение: к одно-двухсуточной культуре на среде с фенилаланином в наклонном положении добавляют 10-12 капель 10% раствора хлорного железа ($FeCl_3x6H_2O$). При положительной реакции через 2-3 мин культура окрашивается в зелено-синий или зеленовато-голубой цвет, при отрицательной реакции цвет культуры не изменяется.

7. Среда Кларка для реакций с метилротом и Фогес-Проскауэра

Состав: Пептон ферментативный - 5 г

Калий фосфорнокислый двузамещенный ($K_2HPO_4x3H_2O$) - 5 г

Глюкоза - 5 г

Вода дистиллированная -1000 $см^3$

Приготовление: после растворения компонентов в воде устанавливают pH среды 6,9-7,0, затем кипятят ее 2-3 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 5 $см^3$ и стерилизуют при 0,5 атм в течение 15 мин.

Применение: для постановки реакции с метилротом из пробирки с двухсуточной культурой бактерий в среде Кларка отсасывают в чистую сухую пробирку 2,5 $см^3$ жидкости, добавляют к ней 8-10 капель индикатора метилрота, пробирку встряхивают, после чего учитывают реакцию. Изменение цвета культуры зависит от величины pH : розовое

окрашивание (при pH ниже 5,0) означает положительную реакцию, желтое окрашивание (при pH выше 6,0) – отрицательную реакцию, светло-оранжевое окрашивание (при pH 5,0-6,0) – сомнительную реакцию.

Состав индикатора метилрота:

Метиловый красный	- 0,01 г
Спирт этиловый 96°	- 30 $см^3$
Вода дистиллированная	- 20 $см^3$

Приготовление: навеску краски растворяют в спирте, затем добавляют воду и смесь размешивают. Хранят индикатор в темном месте под притертой пробкой.

Для постановки реакции Фогес-Проскауэра к 2,5 $см^3$ культуры бактерий добавляют вначале 1 $см^3$ 6%-ного спиртового раствора α-нафтола, а затем 0,4 $см^3$ 40%-ного водного раствора КОН, пробирку тщательно встряхивают и спустя 3-5 мин учитывают результаты. При наличии в культуре ацетилметилкарбинола она окрашивается в розовый цвет – положительная реакция, окраска культуры в желтый цвет свидетельствует об отрицательной реакции, при сомнительной реакции культура окрашивается в светло-оранжевый цвет.

Состав реактивов для реакции Фогес-Проскауэра:

а) α-нафтол ($C_{10}H_8O$)	- 30 г
Спирт этиловый 96°	- 500 $см^3$
б) Калий гидроокись (КОН)	- 120 г
Вода дистиллированная	- 300 $см^3$

8. Среды для предварительной идентификации культур лактозоотрицательных бактерий

8.1. Среда Олькеницкого

Состав: Лактоза	- 10 г
Сахароза	- 10 г

Глюкоза	- 1 г
Аммоний-железо (11) сульфат	- 0,2 г
($FeSo_4$ x$(NH_4)SO_4$ x6H_2O)	
Натрий тиосульфат	- 0,3 г
($Na_2S_2O_3$ x5H_2O)	
Мочевина	- 10 г
Феноловый красный	
(0,4% водный раствор)	- 4 $см^3$
Агар питательный сухой	- 25 г
Вода дистиллированная	- 1000 $см^3$

Приготовление: компоненты растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды нагретой до температуры 45-50 °С; сухой питательный агар расплавляют в отдельной посуде в остальной части дистиллированной воды при нагревании, затем смешивают растворы солей и расплавленного агара, фильтруют через марлевый фильтр, устанавливают pH 7,2-7,4, после чего добавляют раствор индикатора и тщательно размешивают его; готовую среду разливают в пробирки по 6-7 $см^3$ и стерилизуют текучим паром дробно в течение трех суток ежедневно по 20 мин. Стерильную среду скашивают таким образом, чтобы столбик был не менее 2-2,5 см. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет.

Применение: для посева используют агаровую культуру бактерий, которую засевают бактериологической петлей вначале на поверхность скошенной части среды (косяка), затем уколом в столбик. Засеянные пробирки инкубируют при 37-38 °С в течение 24-48 часов.

В культурах, ферментирующих только глюкозу, столбик окрашивается в желтый цвет, косяк имеет розовый цвет. В культурах, ферментирующих глюкозу, а также лактозу и сахарозу или только один из последних двух сахаров, столбик и косяк окрашиваются в желтый

цвет. Культуры, расщепляющие мочевину, окрашивают столбик и косяк в красный цвет; при образовании сероводорода столбик (или часть его) приобретает черный цвет. Газообразование устанавливают по наличию трещин и разрывов в столбике среды.

Среда Клиглера

Агар Клиглера готовят из сухой коммерческой среды согласно рецепту, указанному на этикетке.

При отсутствии готовой среды ее приготовляют по следующему рецепту:

Лактоза	- 10 г
Сахароза	- 10 г
Глюкоза	- 1 г
Железо сернокислое ($FeSO_4 x7H_2O$)	- 0,2 г
Натрий тиосульфат ($Na_2S_2O_3 x5H_2O$)	- 0,08 г
Натрий сульфит (Na_2SO_3)	- 0,04 г
Феноловый красный (0,2% раствор в 50% этиловом спирте	- 12 $см^3$
Агар питательный сухой	- 20 г
Вода дистиллированная	- 1000 $см^3$

Порядок и последовательность растворения компонентов среды, величина pH, объем готовой среды в пробирках и режим стерилизации такие же, как и при приготовлении среды Олькеницкого. Готовая среда имеет буровато-красный или оранжево-красный цвет.

Применение: условия посева культур бактерий, время инкубирования пробирок и характер изменений в столбике и на косяке среды аналогичны тем, которые наступают в среде Олькеницкого.

Лист ознакомления с документом

ФИО, должность	Наименование подразделения	Дата ознако-мления	Подпись	Изм.1	Изм.2	Изм.3
				Дата ознаком-ления /подпись	Дата ознаком-ления /подпись	Дата ознаком-ления /подпись
Скоморина Ю.А. Зав. отд	отдел бактериолог	23.10.17				
Кремлева А.А. з/з	отдел бак-гии	23.10.17				
Хожевникова Л.В. в/в	отдел бак-гии	23.10.2017				
Степанова С.Т. в/в	отдел бак-гии	23.10.17				

gost.e-ecolog.ru