МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ—ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
(С ПРАВОМ ПЕРЕИЗДАНИЯ МЕСТНЫМИ ОРГАНАМИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ)

МОСКВА — 1986

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР

«СОГЛАСОВАНО»
Зам. начальника Главного управления научно-исследовательских институтов и координации научных исследований
В. М. Христюк
2 июня 1986 г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель министра
К. И. Акулов
3 июня 1986 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ—ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
(С ПРАВОМ ПЕРЕИЗДАНИЯ МЕСТНЫМИ ОРГАНАМИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ)

МОСКВА — 1986

АННОТАЦИЯ

В методических рекомендациях представлены современные методы определения грамотрицательных потенциально патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae и группы неферментирующих бактерий — возбудителей внутрибольничных инфекций. Описаны способы отбора проб, выделения и идентификации этих микроорганизмов из объектов окружающей среды и патологического материала при текущем санитарно-бактериологическом контроле и целенаправленных исследованиях в лечебных стационарах.

Методические рекомендации предназначены для бактериологических лабораторий санитарно-эпидемиологических станций и лечебно-профилактических учреждений.

Московский НИИ гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана
Директор — академик АМН СССР **А. П. Шицкова**

Институт хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР
Директор — академик АМН СССР **М. И. Кузин**

II МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова
Ректор — профессор **В. Н. Ярыгин**

МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского
Директор — засл. деятель науки РСФСР профессор **А. М. Сазонов**

Санитарно-эпидемиологическая станция Москворецкого района г. Москвы
Главный врач — канд. мед. наук **В. А. Соловьев**

Методические рекомендации составили: доктор мед. наук **В. В. Владавец**, канд. мед. наук **Г. М. Трухина, М. Н. Смирнова**, профессор **И. И. Колкер**, канд. биол. наук **О. К. Борисова, Н. В. Гаврилова**, канд. мед. наук **С. С. Белокрысенко**, канд. мед. наук **С. К. Канарейкина**, канд. мед. наук **В. В. Якименко.**

Рецензенты — зав. эпидемиологическим отделом МосгорСЭС **Э. А. Телешевская**, зав. кафедрой эпидемнологии Ленинградского сан.-гиг. ин-та профессор **Р. Х. Яфаев**, зав. бактериологической лабораторией Ленинградской горСЭС канд. мед. наук **В. В. Карцев.**

© МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского.

ВВЕДЕНИЕ

Внутрибольничные гнойно-септические заболевания представляют собой актуальную проблему современного здравоохранения. Они снижают эффективность лечения в стационарах, увеличивают сроки госпитализации, повышают летальность, наносят значительный экономический ущерб. Наиболее восприимчивыми к внутрибольничным инфекциям являются больные хирургических и урологических стационаров, а также родовспомогательных учреждений.

Проведенными исследованиями была выявлена широкая циркуляция грамотрицательных бактерий в окружающей среде лечебных учреждений и их роль в формировании эпидемического процесса при внутрибольничных инфекциях. В настоящее время наиболее часто выделяются микроорганизмы родов Pseudomonas и Acinetobacter, а в родовспомогательных учреждениях— Klebsiella. Помимо этого, определенное значение имеют и другие потенциально патогенные бактерии — Proteus, Serratia, Enterobacter, Citrobacter и др. Указанные микроорганизмы обусловливают как спорадические случаи заболевания, так и вспышки внутрибольничных инфекций. В связи с этим выделение и идентификация грамотрицательных потенциально патогенных бактерий в объектах окружающей среды стационаров и в патологическом материале приобретают все большую значимость и являются необходимыми для правильной этиологической расшифровки внутрибольничных инфекций, назначения больным адекватной антибактериальной терапии и своевременного проведения профилактических мероприятий в лечебных стационарах.

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Бактериологический контроль за объектами окружающей среды в лечебных стационарах осуществляется санитарно-эпидемиологическими станциями при плановых обследованиях в порядке текущего санитарного надзора. Кратность бактериологического контроля со стороны СЭС — не реже 1 раза в квартал. Бактериологические лаборатории лечебных учреждений контролируют соблюдение противоэпидемического режима не

реже 1 раза в месяц. Забор проб патологического материала у больного проводят по указанию лечащего врача. По эпидемическим показаниям — при возникновении гнойно-септических заболеваний (внутрибольничных инфекций) — бактериологический контроль проводят внепланово.

Объектами исследования являются:

— воздушная среда;
— предметы обихода;
— аппаратура;
— кожа рук обслуживающего персонала;
— патологический материал.

2. ОТБОР ПРОБ НА ИССЛЕДОВАНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Исследование воздушной среды

Бактериологическому контролю подлежит воздух следующих объектов: операционных, перевязочных, палат, отделений реанимации и интенсивной терапии.

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью прибора ПАБ-1 (пробоотборник аэрозольный бактериологический), выпускаемого Ленинградским заводом «Красногвардеец». Принцип действия этого прибора основывается на зарядке частиц бактериального аэрозоля при помощи коронного разряда и последующего осаждения их методом электропреципитации на специальные пластины — поддоны с плотной или жидкой питательной средой. Поддоны предварительно следует стерилизовать в сухожаровом шкафу при температуре 180°С в течение 2 часов. Плотную питательную среду разливают по 20—25 мм на поддоны асептично и равномерно, не касаясь их верхней кромки. В случае неиспользования поддонов с питательной средой они должны храниться не более 7—10 дней при +4°С и перед посевом подсушиваться.

При отборе проб в жидкие питательные среды следует строго соблюдать горизонтальное положение прибора. Объем исследуемого воздуха должен составлять от 500 до 1000 л при скорости отбора проб 125 л в минуту. Отбор воздуха в помещениях стационара производят на уровне дыхания лежащего больного.

При отсутствии прибора ПАБ-1 исследования воздуха на грамотрицательную микрофлору проводят методом седимента-

ции. Чашки Петри с элективными средами без крышек помещают на горизонтальные поверхности (стол, подоконник, тумбочка и др.) и выдерживают 2—4 часа. В месте забора используют не менее 2 чашек с одной и той же питательной средой.

Не рекомендуется для выделения из воздуха грамотрицательных потенциально патогенных бактерий использовать щелевой прибор Кротова из-за его недостаточной эффективности в этих случаях. В порядке исключения при отборе проб прибором Кротова количество исследуемого воздуха должно составлять не менее 250—500 л при скорости протягивания воздуха 25 л в минуту.

Посев воздуха проводится на модифицированную среду Эндо[1] или в жидкие среды накопления: мясопептонный бульон, 1% пептонную воду с последующим подращиванием в термостате в течение 16—18 часов при 37°С. Далее осуществляется пересев из жидких питательных сред накопления на модифицированную среду Эндо, которую выдерживают в термостате 18—24 часа при 37°С. Выросшие на среде Эндо колонии различают по их внешнему виду (размер, окраска, характер поверхности и краев). Для дальнейшего исследования выделенных микроорганизмов отбирают не менее двух колоний одного вида.

Отбор проб (смывы) с предметов обихода, аппаратуры, кожи рук обслуживающего персонала

Бактериологическому контролю подлежат следующие объекты:

— в операционных и перевязочных: операционный, перевязочный стол, стол медицинской сестры, щетки для мытья рук (чистые), поверхность раковин, таз для мытья рук, кран раковины, перчатки, кожа рук персонала;

— наркозная аппаратура: внутренняя поверхность наркозной маски, внутренняя поверхность тройника наркозного аппарата, наружная поверхность ларингоскопа, внутренняя поверхность гофрированных шлангов, внутренняя поверхность деталей клапанов вдоха и выдоха, поверхность адсорбирующего вещества (адсорбент), внутренняя поверхность увлажнителя, внутренняя поверхность воздуховодов, внутренняя поверхность интубационной трубки, наружная поверхность интубационной трубки;

— в палатах для больных: кровати, прикроватные тумбочки, дверные ручки.

[1] Питательные среды, тест-реактивы, растворы индикаторов указаны в Приложении 2.

Кроме вышеперечисленных предметов, подлежащих бактериологическому контролю, в случае необходимости могут быть подвергнуты исследованию выборочно и другие объекты. По эпидпоказаниям дополнительно проводят отбор проб с предметов, находящихся в употреблении («грязных»).

Отбор проб осуществляется методом смывов.

Смывы с поверхностей предметов обихода, аппаратуры, кожи рук обслуживающего персонала при качественной оценке результатов производят стерильным ватным тампоном на стеклянных или деревянных стержнях, вмонтированных в пробирки с 5 мл стерильной 1% пептонной водой (накопительная среда) выше ее уровня. Тампон увлажняют питательной средой, делают смыв с объекта и снова помещают в пробирку, погружая его в пептонную воду. После отбора пробы с наркозной аппаратуры тампон помещают в пробирку с 5 мл стерильного мясопептонного бульона.

Посевы с объектов в среде накопления инкубируют при 37°С в течение 16—18 часов (для наркозной аппаратуры — 10—12 суток) и осуществляют пересев на модифицированную среду Эндо.

При количественной оценке результатов смывы производят тем же способом, что и при качественном методе исследования, применяя 0,1% пептонную воду. Смывы отбирают с поверхности площадью 100 см², при контроле более мелких предметов — с поверхности всего предмета. После отбора проб смывы в пробирках встряхивают на Шуттель-аппарате в течение 10—15 мин или ручным способом. Затем осуществляют посев шпателем 0,3—0,5 мл смыва на модифицированную среду Эндо, которую выдерживают в термостате 24 часа при 37°С. Выросшие на среде Эндо колонии различают по их внешнему виду (размер, окраска, характер поверхности и краев). Для дальнейшего исследования выделенных микроорганизмов отбирают не менее двух колоний одного вида.

Бактериологические исследования проводят не позднее, чем через 2—4 часа с момента отбора проб. До исследования пробы хранят при температуре +4—+8°С. Каждая проба, отобранная из объекта окружающей среды стационара, должна иметь направление, включающее следующие пункты: 1) название отделения, 2) место взятия, 3) дата и время взятия, 4) вид материала, направляемого на исследование, 5) фамилия и должность отбирающего.

Отбор патологического материала

Материалом для бактериологического исследования являются гной, экссудаты, пунктаты, выпот, биоптаты, ткани, мазки из ран, фекалии, моча, рвотные массы и т. д.

Наиболее правильный способ взятия жидких материалов — объемно с помощью шприца. Отбор материала тампоном производят только при невозможности осуществления объемного метода; при этом параллельно готовят мазок-отпечаток для бактериоскопического исследования. При аспирации закрытых полостей кожу в месте прокола дезинфицируют антисептиками в течение 1—2 мин. Свищи и фистулы первоначально очищают от отделяемого и забор материала производят из глубины. Жидкий материал из открытых ран при хирургическом вмешательстве отбирают объемно шприцем. Отделяемое из дренажей также берут шприцем или используют концы удаленных дренажных трубок.

Биоптаты ран получают путем иссечения участка ткани (весом 0,2—1 г) из глубоких слоев раны после тщательной ее обработки физиологическим раствором и 70° этиловым спиртом для удаления поверхностно вегетирующей микрофлоры, а также антисептических и антибактериальных препаратов.

При бактериологическом анализе испражнений исследованию подлежат только утренние фекалии. Предварительное применение очистительных клизм и прием слабительных средств противопоказаны. Во избежание искажения истинного содержания микробов материал должен быть доставлен в лабораторию возможно быстрее после дефекации. Фекалии отбирают в специальную стерильную посуду (бактериологические чашки, флаконы с широким горлом). Первые порции кала (из ампула ректи), содержащие, как правило, более высокое, чем в других отделах кишечника, количество микроорганизмов, исследованию не подлежат.

Для исследования мочи следует брать среднюю порцию утренней мочи после тщательного туалета наружных мочеполовых органов. Мочу собирают в стерильную пробирку в количестве 3—5 мл и немедленно доставляют в лабораторию.

Отбор проб рвотных масс производится в соответствии с существующими инструкциями по исследованию пищевых токсикоинфекций и интоксикаций. Патологический материал доставляют в лабораторию не позднее чем через 1—1,5 часа с момента взятия. Если немедленная доставка невозможна, образцы хранят в холодильнике при температуре +4—+6°С. Каждый образец патологического материала должен быть снабжен этикеткой, на

которой указывается: 1) отделение, в котором находится больной, 2) фамилия, имя, отчество больного, 3) возраст больного, 4) номер истории болезни, 5) основной диагноз и диагноз осложнения, 6) проводимая химио- и антибиотикотерапия, 7) место взятия материалов, 8) вид материала, 9) дата и время взятия пробы, 10) фамилия лечащего врача.

Посев патологического материала производят на любую из трех плотных питательных сред: модифицированную среду Эндо, 5% кровяной агар, питательный агар Дагестанского НИИ питательных сред. Посевы выдерживают в термостате при 37°С в течение 18—24 часов. Выросшие на этих средах колонии различают по их внешнему виду (размер, окраска, характер поверхности и краев). Для дальнейшего исследования выделенных микроорганизмов отбирают не менее трех колоний одного вида.

3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Грамотрицательная потенциально патогенная микрофлора, являющаяся причиной внутрибольничных инфекций, разделяется на две большие группы. Первая группа микроорганизмов ферментирует углеводы и относится к семейству Enterobacteriaceae, вторая — лишена этой способности и принадлежит к группе неферментирующих бактерий. Из семейства Enterobacteriaceae существенное значение в этиологии гнойно-септических заболеваний имеют бактерии родов Klebsiella, Citrobacter, Serratia, Escherichia, Proteus, Providencia. Они являются грамотрицательными мелкими палочками, обладающими подвижностью или неподвижными, капсульными или бескапсульными, неспорообразующими аэробами или факультативными анаэробами, оксидазанегативными, образующими кислоту при ферментации глюкозы, восстанавливающими нитраты и нитриты.

Группу неферментирующих бактерий при госпитальных инфекциях обычно представляют микроорганизмы родов: Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Flavobacterium. Это грамотрицательные мелкие палочки или коккобациллы, обладающие подвижностью или неподвижные, неспорообразующие аэробы, цитохромоксидазанегативные или цитохромоксидазаположительные, не ферментирующие глюкозу, имеющие нередко пигмент.

Идентификация указанных микроорганизмов начинается с изучения их морфологии в мазках, приготовленных из колоний на плотных питательных средах и окрашенных по Граму. При обнаружении грамотрицательных мелких палочек, а также коккобактерий их отсевают на скошенный мясопептонный агар с целью накопления посевного материала и одновременно в среду OF (среда Хью-Лейфсона). Посевы выдерживают в термостате в течение 18—24 часов при 37°С. Затем учитывают результаты посева на среде OF (рис. 1).

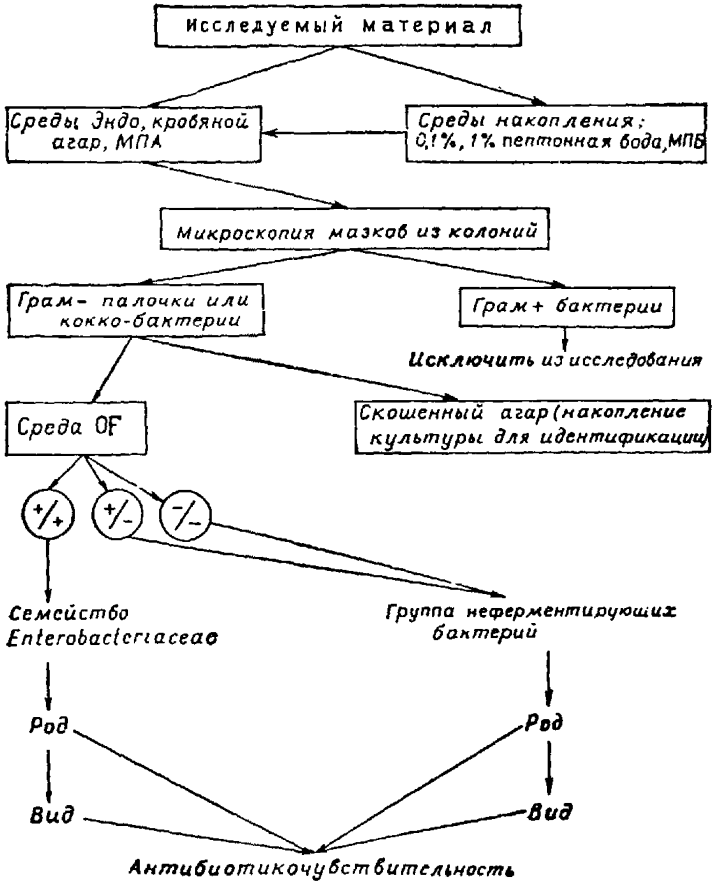


Рис. 1. Выделение грамотрицательных потенциально патогенных микроорганизмов.

Грамотрицательные бактерии, оксидирующие и ферментирующие глюкозу, изменяют первоначальный зеленый цвет среды OF на желтый. В таком случае результат учитывают как +/+

и данные микроорганизмы относят к семейству Enterobacteriaceae с последующей идентификацией.

Грамотрицательные микроорганизмы, оксидирующие, но не ферментирующие глюкозу (+/—) или не оксидирующие и не ферментирующие ее (—/—), относят к группе неферментирующих бактерий с последующей идентификацией.

Идентификация грамотрицательных потенциально патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae

Идентификацию грамотрицательных потенциально патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae проводят в два этапа. Первым этапом определяют родовую принадлежность бактерий по минимальному набору тестов. Культуру с поверхности скошенного агара исследуют на наличие цитохромоксидазы. Далее цитохромоксидазаотрицательные колонии засевают в короткий пестрый ряд из 7 тестов. Определяют подвижность, утилизацию цитрата, продукцию индола, реакцию с метиловым красным, ферментацию рамнозы, дезаминирование фенилаланина и декарбоксилирование орнитина.

Дифференциация энтеробактерий с помощью этих тестов проводится по табл. 1. Ключевыми признаками являются: для рода Escherichia — подвижность (+/—), цитратный признак

Таблица 1

Родовая дифференциация потенциально патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae

Микроорганизмы	Тесты						
	Подвижность	Цитратный признак	Индол	Метиловый красный	Орнитиндекарбоксилаза	Фенилаланин- (или триптофан) дезаминаза	Ферментация рамнозы
Escherichia	±	—	±	+	±	—	+
Klebsiella	—	+	—	—	—	—	+
Enterobacter	+	+	—	—	+	—	+
Citrobacter	+	+	±	+	±	—	+
Proteus-Providencia	+	±	±	+	±	+	—
Serratia	+	+	—	∓	+	—	—

Таблица 2

Видовая дифференциация потенциально патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae

Микроорганизмы	Орнитинде-карбоксилаза	Лизиндекар-боксилаза	Аргининде-гидролаза	Ферментация сорбита	Ферментация арабинозы	Ферментация инозита	H_2S	Индол	Уреаза	Желатиназная активность	Ацетоин	Ферментация мальтозы	Адонит
Citrobacter freundii	±	−	∓	+	+	−	±	−	−	−	−	+	−
Citrobacter diversus	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−
Klebsiella pneumonia	−	+	−	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+
Enterobacter aerogenes	+	+	−	+	+	+	−	−	−	−	+	+	в
Enterobacter cloacae	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	(+)
Enterobacter agglomerans	−	−	−	∓	+	−	−	∓	−	−	+	в	в
Hafnia alvei	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+(22°)	+	−
Serratia liquefaciens	+	+	−	+	+	±	−	−	−	−	∓	+ без газа	+ без газа
Serratia marcescens	+	+	−	−	−	∓	−	−	−	+	+	+	+
Serratia rubidaea	−	±	−	−	+	−	+	−	+	±	+	−	−
Proteus mirabilis	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	∓	−	−
Proteus vulgaris	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	∓	−
Providencia alcalifaciens	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	(∓)	+
Providencia stuartii	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	(∓)	−
Morganella morganii	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−

Примечание: ± — преобладание положительного результата;
∓ — преобладание отрицательного результата;
(+) — малая вероятность положительного результата;
в — вариабельнсть признака.

(—), метиловый красный (+); для рода Klebsiella — подвижность (—), цитратный признак (+), орнитиндекарбоксилаза (—), метиловый красный (—); для рода Enterobacter — подвижность (+), цитратный признак (+), орнитиндекарбоксилаза (+), метиловый красный (—); для рода Citrobacter — подвижность (+), цитратный признак (+), метиловый красный (+); для родов Proteus—Providencia — подвижность (+), фенилаланиндезаминаза (+); для рода Serratia — подвижность (+), цитратный признак (+), ферментация рамнозы (—).

Второй этап идентификации потенциально патогенных энтеробактерий (проводится по эпидемическим показаниям) — определение их видовой принадлежности по 11 тестам (табл. 2). Ключевыми признаками в таких случаях являются: для Citrobacter freundii — индол (—); для Citrobacter diversus — орнитиндекарбоксилаза (+), H_2S (—), индол (+); для Klebsiella pneumonia — ацетоин (—); для Enterobacter aerogenes — орнитиндекарбоксилаза (+), лизиндекарбоксилаза (+), аргининдегидролаза (—), ферментация инозита (+); для Enterobacter cloacae — орнитиндекарбоксилаза (+), аргининдегидролаза (+); для Enterobacter agglomerans — орнитиндекарбоксилаза (—), аргининдегидролаза (—); для Serratia liquefaciens — орнитиндекарбоксилаза (+), ферментация сорбита (+), арабинозы (+); для Serratia marcescens — орнитиндекарбоксилаза (+), ферментация сорбита (—), арабинозы (—), желатиназная активность (+); для Serratia rubidaea — орнитиндекарбоксилаза (—); для Proteus mirabilis — уреаза (+), H_2S (+), индол (—), мальтоза (+); для Proteus vulgaris — уреаза (+); H_2S (+), индол (+), мальтоза (+); для Morganella morganii— уреаза (+), H_2S (—), индол (+); для Providencia alcalifaciens — уреаза (—), адонит (+), инозит (—); для Providencia stuartii — уреаза (—), адонит (—), инозит (+). Определение этих признаков осуществляется с помощью дифференциально-диагностических питательных сред, представленных в приложении 2.

Идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ)

Идентификация НГОБ проводится по двухэтапной схеме (рис. 2).

Первый этап — определение родовой принадлежности НГОБ (табл. 3)—включает три теста: определение подвижности, окисление 1% глюкозы в среде Хью-Лейфсона (OF) и наличие фермента оксидазы. По результатам этих трех тестов проводят ориентировочную идентификацию следующих НГОБ: Pseudomonas,

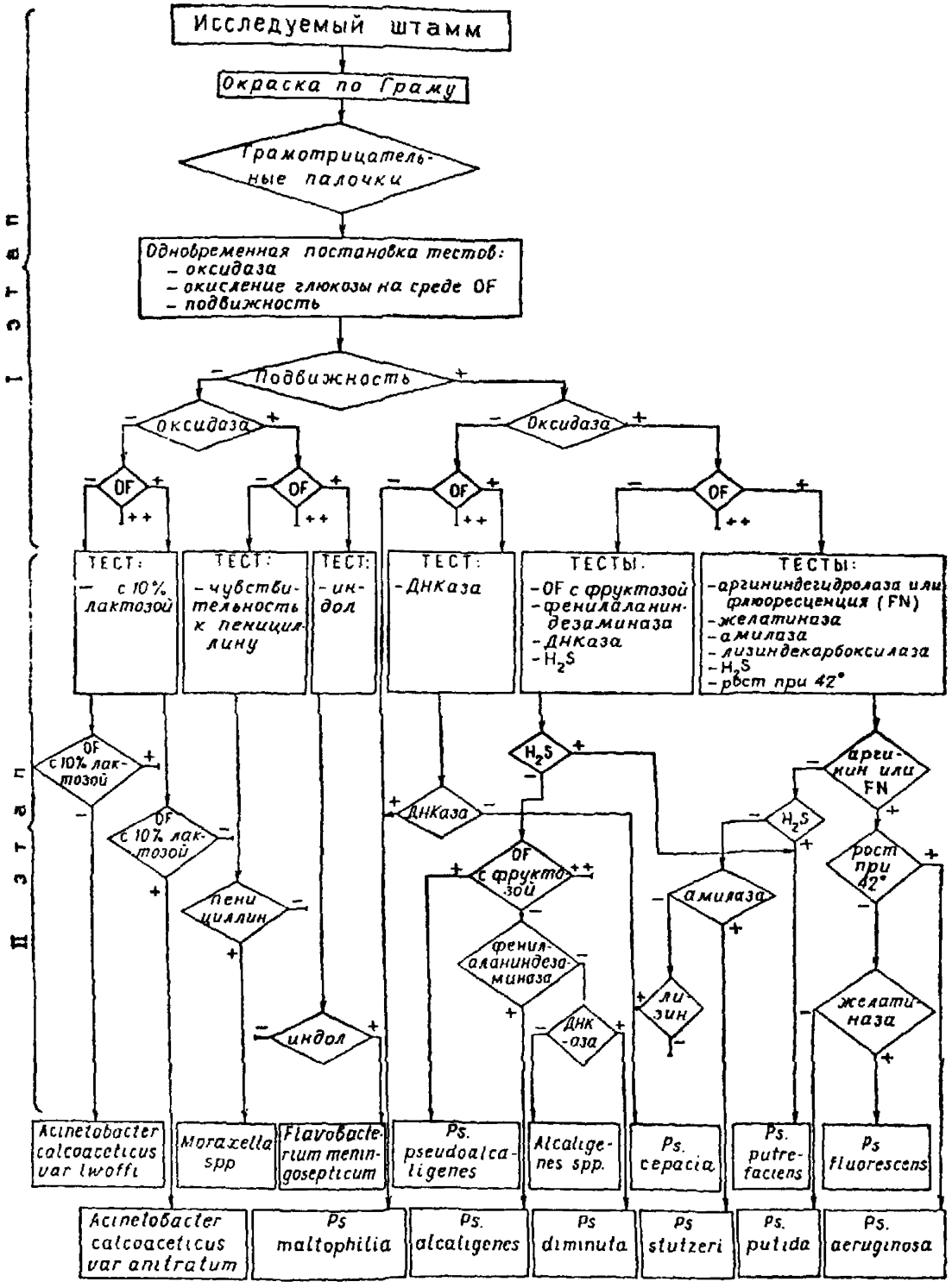


Рис. 2. Схема идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий.

Acinetobacter, Moraxella, Alcaligenes, Flavobacterium meningosepticum.

Причем, разделение родов Pseudomonas и Alcaligenes возможно в том случае, если исследуемый штамм окисляет глюкозу на среде OF (см. табл. 3).

Таблица 3

Ориентировочная идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий

Микроорганизмы	Подвижность	Оксидаза	Окисление-ферментация глюкозы на среде OF
Pseudomonas spp	+	+ (—)	+/—; —/—*
Acinetobacter spp	—	—	+/—; —/—*
Moraxella spp	—	+	—/—
Alcaligenes spp	+	+	—/—*
Flavobacterium meningosepticum	—	+	+/—

Примечание: 1) в числителе — окисление; в знаменателе — ферментация.
2) «*» — подщелачивание среды OF в аэробных условиях.
3) «(—)» — редко встречаемый признак.

Второй этап — определение видовой, а в отдельных случаях подтверждение родовой принадлежности НГОБ (табл. 4). Выбор тестов, которые необходимо поставить на втором этапе, зависит от результатов трех тестов первого этапа.

Оценку результатов первого этапа проводят в следующем порядке: определение подвижности, наличия фермента оксидазы, окисления 1% глюкозы на среде Хью-Лейфсона (среда OF). Как видно из рис. 2, возможны семь вариантов исходов этих трех тестов.

1. Неподвижные микроорганизмы, не обладающие оксидазной активностью и не окисляющие глюкозу на среде OF (на схеме: подвижность —, оксидаза —, OF —) относят к Acinetobacter calcoaceticus v. lwoffi. В качестве подтверждающего используют тест с 10% лактозой. A. lwoffi не окисляют 10% лактозу.

2. Неподвижные НГОБ, не обладающие оксидазной активностью, но окисляющие глюкозу на среде OF (на схеме: подвижность —, оксидаза —, OF +), принадлежат к Acinetobacter calcoaceticus v. anitratus.

Таблица 4

Дифференциально-диагностические тесты для идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий

Микроорганизмы / Тесты	Подвижность	Оксидаза	OF с глюкозой (окисление)	Флюоресценция в УФ-свете, либо аргининдегидролаза	Желатиназа	Рост при 42°С	H_2S	Амилаза	ДНК-аза	Лизиндекарбоксилаза	Фенилаланиндезаминаза	OF с фруктозой	Окисление 10% лактозы	Чувствительность к пенициллину	Индол
P. aeruginosa	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
P. fluorescens	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
P. putida	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
P. cepacia	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−
P. stutzeri	+	+	+	−	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−
P. putrefaciens	+	+	+	−	+	−	+	−	+	±	−	+	−	−	−
P. maltophilia	+	−	±	−	+	−	−	−	+	±	−	+	−	−	−
P. diminuta	+	+	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
P. alcaligenes	+	+	−*	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
P. pseudoalcaligenes	+	+	+сл	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−
Alcaligenes spp.	+	+	−*	−	−	±	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Moraxella spp.	−	+	−	−	±	−	−	−	−	−	±	−	−	+	−
Acinetobacter calcoaceticus var. anitratum	−	−	+	−	±	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−
Acinetobacter calcoaceticus var. lwoffi	−	−	−*	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Flavobacterium meningosepticum	−	+	+	−	+	−	±	±	+	−	−	+	+	−	+

Примечание: * — подщелачивание среды OF.

Для подтверждения используют тест окисления 10% лактозы, который у этих микроорганизмов положительный. Для идентификации Acinetobacter большое значение имеет микроскопия мазка, поскольку среди неферментирующих грамотрицательных бактерий только Acinetobacter могут иметь клетки в виде кокков или коккобацилл.

3. Штаммы, обладающие следующими свойствами: подвижность (—), оксидаза (+), OF (—), относят к роду Moraxella. Подтверждающим тестом для этих микроорганизмов служит чувствительность к пенициллину (+).

4. Неподвижные оксидазоположительные штаммы, окисляющие глюкозу на среде OF, их относят к Flavobacterium meningosepticum. В качестве подтверждающего теста служит положительная реакция на индол и наличие желтого пигмента.

5. Подвижные оксидазоположительные микроорганизмы, окисляющие глюкозу на среде OF (+), могут принадлежать к одному из шести видов рода Pseudomonas: P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida, P. cepacia, P. stutzeri, P. putrifaciens. Для их дифференциации одновременно ставят шесть тестов: флюоресценция в УФ-свете, либо определение наличия аргининдегидролазы, определение наличия желатиназы, амилазы, лизиндекарбоксилазы, рост при 42°C, образование H_2S. Учет результатов начинают с определения аргининдегидролазы либо флюоресценции в УФ-свете. Штаммы, обладающие аргининдегидролазой, либо флюоресцирующие в УФ-свете и дающие рост при 42°C, относят к P. aeruginosa. Если исследуемый штамм при наличии аргининдегидролазы или флюоресценции в УФ-свете не растет при 42°C, проводят дифференциацию между P. putida и P. fluorescens по желатиназной активности. Не разжижающие желатину штаммы относят к P. putida, а разжижающие — к P. fluorescens. Если у исследуемого штамма отсутствует аргининдегидролаза, либо флюоресценция в УФ-свете, оценивают способность образовывать сероводород, амилазу и лизиндекарбоксилазу. Если аргининдегидролаза или флюоресценция (—), а H_2S (+), штамм относят к P. putrefaciens; штамм, обладающий ферментом амилазой — к P. stutzeri; штамм, декарбоксилирующий лизин, расценивают как P. cepacia. Среди культур P. putrefaciens встречаются штаммы, окисляющие глюкозу и не окисляющие ее, а среди культур P. cepacia — оксидазоположительные и оксидазоотрицательные.

6. Подвижные, оксидазоположительные, не окисляющие глюкозу на среде OF, не ферментирующие грамотрицательные бак-

терии, могут принадлежать к роду Alcaligenes или к одному из видов рода Pseudomonas: P. alcaligenes, P. putrefaciens, P. pseudoalcaligenes, P. diminuta. Обычно эти микроорганизмы подщелачивают среду OF в аэробных условиях. Для их дифференциации одновременно ставят четыре теста и определяют окисление фруктозы на среде OF, наличие ДНК-азы, фенилаланиндезаминазы и образование сероводорода. Окисление фруктозы указывает на P. pseudoalcaligenes, образование сероводорода является четким дифференциальным признаком для P. putrefaciens. Наличие фермента ДНК-азы определяет вид P. diminuta. Проведение точной дифференциации между родом Alcaligenes и видом P. alcaligenes возможно лишь по окраске жгутиков, что не приемлемо для практических лабораторий. Поэтому для ориентировочной дифференциации используют тест, определяющий фенилаланиндезаминазу. Этот фермент присутствует в 72% случаев у P. alcaligenes и отсутствует у бактерий рода Alcaligenes.

7. Подвижные оксидазоотрицательные штаммы, окисляющие глюкозу на среде OF, принадлежат либо к P. maltofilia, либо к виду P. cepacia. Для дифференциации этих двух видов используют тест, выявляющий наличие фермента ДНК-азы: P. maltofilia обладает ферментом ДНК-азой, а P. cepatia — нет. Среди штаммов P. maltofilia встречаются штаммы как окисляющие, так и не окисляющие глюкозу.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

Метод дисков

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам методом дисков определяется в соответствии с «Методическими указаниями по определению антибиотикочувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом их диффузии в агар с использованием дисков», утв. МЗ СССР.

Метод реплик

Чистые культуры идентифицированных микроорганизмов засевают короткими штрихами на секторы чашки с мясопептонным агаром (из расчета 12 штрихов на 1/6 чашки), подращива-

ют 5—6 часов и перепечатывают бархатным или металлическим репликатором на среды с антибиотиками: ампициллином, карбенициллином, рифампицином, кефзолом, цефализином (100 мкг/мл среды), левомицетином, канамицином, налидиксовой кислотой (50 мкг/мл среды, стрептомицином (20 мкг/мл среды), тетрациклином (30 мкг/мл среды), гентамицином (5 мкг/мл среды), а также с одним из сульфаниламидов на минимальном солевом агаре (50—100 мкг/мл среды). Учет результатов проводится через сутки инкубации при 37°С и позволяет определить антибиотикограмму, служащую одновременно маркером штамма. При этом устойчивость к налидиксовой кислоте служит важной генетической меткой при сравнении идентифицированных культур, а к гентамицину может считаться достаточно надежным признаком, характерным для госпитальных штаммов.

5. ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПО ЭПИДПОКАЗАНИЯМ

Исследуемый материал от контактных лиц по эпидпоказаниям отбирается по усмотрению эпидемиолога.

Определение E. coli

Отбор проб производят согласно разделу 2. Выделение E. coli осуществляется в соответствии с приказом № 720 МЗ СССР от 31.07.78.

Определение бактерий рода Klebsiella

Отбор проб производят согласно разделу 2. Посев исследуемого материала осуществляют на плотную питательную среду К-2 и инкубируют ее при 37°С 18—24 часа. Колонии клебсиелл на этой среде крупные, блестящие, как правило, слизистые. Окраска их различна — от желтой или зелено-желтой до голубой. Для идентификации со среды снимают по 1—2 колонии и засевают их в полужидкий агар для определения подвижности, а также в среду для определения орнитиндекарбоксилазной активности. Признаками, характерными для рода Klebsiella, являются неподвижность культуры и неспособность декарбоксилировать орнитин.

Определение бактерий родов Proteus и Providencia

Отбор проб производят согласно разделу 2. Посев материалов осуществляют на среду П-2, инкубируют при 37°С в течение 18—24 часов. Обязательным условием посева на среде П-2 является получение по возможности разреженного роста и изолированных колоний для обеспечения точности видовой идентификации культуры. На этой среде колонии P. mirabilis — малиновые с черным центром, P. vulgaris — желтые с черным или темно-коричневым центром, M. morganii, Providencia — малиновые без центра, P. rettgeri — желтые без центра. Определение P. mirabilis и P. vulgaris в 96—98% случаев совпадает с последующей идентификацией и в дальнейшем в подтверждении не нуждается. Колонии без черного центра или сомнительные должны быть идентифицированы. Для их дифференциации используются среды «ПП» и «ИнАд». Посев в среду «ПП» проводят штрихом по скошенной поверхности и уколом до дна пробирки, инкубируют 18—20 часов при 37°С. Уреазную активность учитывают по нижнему слою среды: положительный результат — оранжево-желтая окраска, что четко разграничивает род Proteus от рода Providencia. Продукция газа в нижнем слое — признак, отличающий P. alcalifaciens от P. stuartii. Наличие индола, определяемого полоской реактивной бумаги, позволяет идентифицировать P. mirabilis от P. vulgaris и других видов протеев и провиденций. Триптофандеаминаза, выявляемая с помощью реактива с хлорным железом, подтверждает принадлежность выделенной культуры к родам Proteus, Providencia, Morganella. В последнем случае положительной реакцией является окрашивание реактива и подлежащего слоя среды в вишнево-красный, оранжево-красный или оранжевый цвета (наступает в течение первых минут), отрицательной — окрашивание реактивов в желтый цвет и подлежащего слоя среды — в светло-бурый. H_2S на среде «ПП» образуется в виде черных точек в толще столбика, через 2—3 часа после добавления реактива увеличивающихся до сплошной черной полосы, что отличает P. mirabilis и P. vulgaris от других представителей этой группы микроорганизмов.

Посевы в среду «ИнАд» инкубируют при 37°С в течение 18—20 часов. Среда «ИнАд» позволяет определять ферментацию инозита и адонита. При положительном результате цвет среды с темно-зеленого меняется на желтый, что позволяет дифференцировать P. alcalifaciens (адонитположительная) от P. stuartii

(инозитположительные), а P. rettgeri (инозит- и адонитположительные колонии) от других видов протеев (см. табл. 2).

Определение P. aeruginosa

Определение синегнойной палочки схематически приведено на рис. 3. Отбор проб производят согласно разделу 2. Посев исследуемого материала осуществляют на одну из плотных селективных сред: ацетамидный агар, аргининную среду, среду с бриллиантовым зеленым, цетилпиридиний хлоридом (ЦПХ),

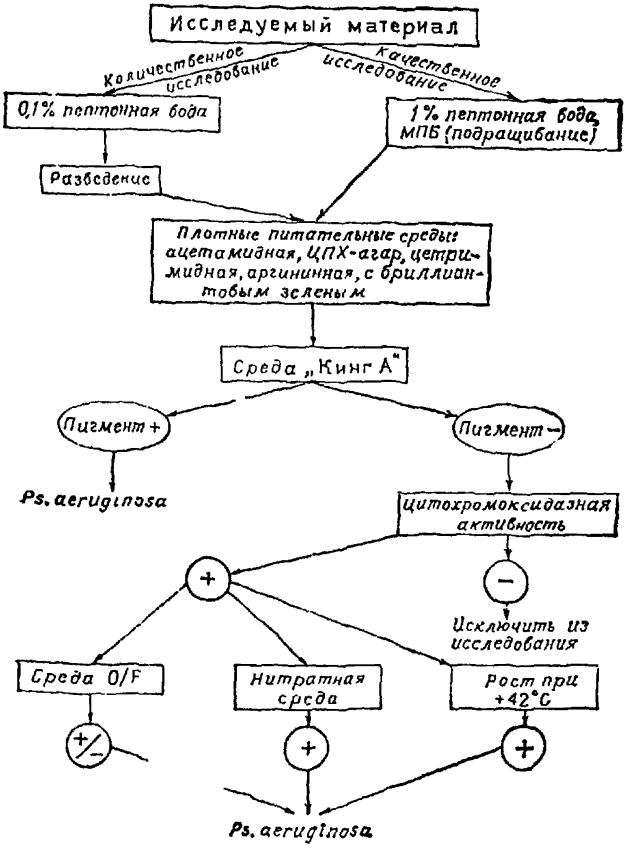


Рис. 3. Схема исследования объектов окружающей среды и патологического материала на P. aeruginosa

цетримидную. Посевы инкубируют при темепратуре 37°С в течение 24—48 часов и затем учитывают морфологические особенности колоний P. aeruginosa. На среде ЦПХ колонии P. aeruginosa средних размеров, отдельные колонии крупные, плоские, с матовой поверхностью. Пигментные штаммы и среда вокруг них окрашены в зелено-желтый, синевато-красный цвет.

На цетримидной среде колонии средних размеров, с неровными краями, шероховатые, с зелено-бурым, диффундирующим в среду пигментом, апигментные штаммы образуют матовые колонии.

На аргининной среде колонии P. aeruginosa, плоские, среднего размера, красного цвета, за счет образования формазана в присутствии ТТХ.

На ацетамидном агаре колонии мелкие, с ровным краем, матовые, чаще с ярким серебряным блеском. Пигментные штаммы образуют зеленовато-синеватый пигмент, диффундирующий в толщу среды.

На среде с бриллиантовым зеленым колонии средних размеров с ровным краем, иногда фестончатые; пигментные штаммы растут в виде зеленоватых колоний, апигментные — бесцветные.

Культуры P. aeruginosa обладают специфическим ароматическим запахом земляничного мыла, жасмина, фиалки, цветов липы и др. Для идентификации P. aeruginosa с плотных селективных питательных сред снимают 1—2 пигментных и 3—4 апигментных колонии на среду Кинг А. Посев на эту среду производят бляшками и выдерживают в термостате при 37°С 20—24 часа. При отсутствии пигмента посевы оставляют при комнатной температуре еще на 24 часа. Учитывают типичной формы колонии: уплощенные, с шероховатой поверхностью, неровными краями и кружевным венчиком, образующимся в результате ограниченного роения культуры. При косом освещении улавливается серебристый блеск. Пигмент чаще всего имеет буроватую окраску с варьированием оттенков, в зависимости от преобладания того или иного пигмента — от сине-зеленого до коричнево-красного. Пигмент образуется вокруг колоний и диффундирует в толщу среды. При наличии пигмента и характерной морфологии на среде Кинг А идентификация P. aeruginosa на этом заканчивается. Апигментные штаммы подвергают дальнейшим исследованиям: колонии микроскопируют, определяют цитохромоксидазу, делают посев в среду OF и нитратную среду. Для этой цели со среды Кинг А снимают 2—3 колонии и окрашивают по Граму. P. aeruginosa — грамотрицательные палочки, подвижные, не образуют спор. Одновременно на среде Кинг А

проверяют цитохромоксидазную активность колоний путем нанесения раствора каплями на макроколонии, при этом колонии P. aeruginosa в течение 15—30 секунд становятся темно-синими. Учет производят не позднее чем через 3 мин, по истечении которых все колонии с нанесенным реактивом синеют. Цитохромоксизадную активность можно проверить путем нанесения культуры на фильтровальную бумагу, пропитанную свежеприготовленным раствором или при помощи СИБов.

Посев культур в нитратную среду производят уколом до дна пробирки, выдерживают при 42°С в течение 20—24 часов, при положительном ответе отмечают рост культуры в виде помутнения среды и образования на поверхности среды пузырьков газа. При применении нитратного бульона газ учитывается в поплавках.

Отличие P. aeruginosa от других видов псевдомонад-возбудителей внутрибольничных инфекций осуществляют дифференциально-диагностическими тестами, приведенными в табл. 4.

Определение бактерий рода Acinetobacter

Отбор проб патологического материала для качественной оценки результатов производят в 10 мл стерильной жидкой накопительной среды ЭАС-1. Смывы с предметов, аппаратуры, рук персонала осуществляют непосредственно средой ЭАС-1 (10 мл). Затем посевы на среде ЭАС-1 выдерживают при 30°С в течение 48 часов. При положительном результате на поверхности среды образуется бесцветная пленка. С поверхности пленки материал пересевают на 2—4 сектора среды ЭАС-2 и инкубируют при 30°С в течение 24 часов. Отбор проб при количественной оценке результатов проводят согласно разделу 2.

Посев осуществляют на среду ЭАС-2 и также выдерживают при 30°С в течение 24 часов, при отсутствии роста посевы оставляют еще на 24 часа при этой же температуре. На среде ЭАС-2 колонии A. calcoaceticus v. anitratus оранжевые, иногда желтые, средних размеров, выпуклые, с ровными краями. Колонии A. lwoffi, как правило, бледно-зеленые, мелкие, выпуклые, с ровными краями. Для идентификации снимают 2—3 колонии и проводят по тестам в соответствии с идентификацией неферментирующих грамотрицательных бактерий.

6. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР

Определение сероваров бактерий рода Citrobacter

Определение сероваров возможно у C. freundii при помощи специфических О- и Н-сывороток в реакции агглютинации на

стекле, в соответствии с антигено-диагностической схемой этих бактерий.

Первоначально эту культуру испытывают поливалентными О-сыворотками, CiOB, CiOF, CiOD, CiOG, каждая из которых включает антитела к ряду О-групп («Наставление по применению О-сывороток для идентификации бактерий Цитробактер»).

При работе с поливалентными сыворотками целесообразно начинать с сывороток CiOA, CiOB, CiOF, в связи с большей частотой распространения в стране представителей соответствующих групп. При положительном результате реакции агглютинации с одной из поливалентных сывороток продолжают серологическую идентификацию культур с сыворотками к О-антигенам, входящим в состав поливалентной смеси. При наличии положительной реакции агглютинации с одной из указанных сывороток устанавливают серологическую группу О-штамма. При агглютинации культуры одновременно с двумя или тремя поливалентными О-сыворотками, содержащими общие антитела, культуру дополнительно испытывают с соответствующими факторными сыворотками и на основании полученных данных определяют антигенное строение штамма. После установления О-группы определяют Н-антиген с использованием поливалентных и моновалентных Н-сывороток. Для определения О- и Н-антигена в реакции агглютинации на стекле используют 18—20-часовую культуру на СПА; реакцию проводят общепринятым способом.

Определение сероваров бактерий рода Proteus

Определение сероваров P. vulgaris и P. mirabilis возможно при помощи специфических О- и Н-сывороток в реакции агглютинации на стекле в соответствии с антигено-диагностической схемой этих бактерий в соответствии с «Наставлениями по применению агглютинирующих диагностических протейных О- и Н-сывороток». Для реакции агглютинации применяют суточную культуру на СПА, которую испытывают в начале с поливалентными, а затем при положительной реакции агглютинации с моновалентными О-сыворотками, входящими в поливалентную. После установления О-группы определяют Н-антиген, применяя вначале поливалентную, а затем моновалентные Н-сыворотки.

Определение сероваров K. pneumoniae

Установление сероваров клебсиелл проводят путем определения капсульного антигена в реакции агглютинации на стекле

при помощи капсульных К-сывороток. Для получения культуры в капсульной форме исследуемый штамм пассируют через углеводосодержащие среды (0,2% глюкозный бульон и агаровая среда Ворфеля—Фергюсона). Культуру засевают в 0,2% глюкозный бульон и инкубируют в течение 4 часов при 37°С, после чего пересевают на среду Ворфеля—Фергюсона и инкубируют при той же температуре 18—20 часов.

Для реакции агглютинации петлю агаровой культуры со среды Ворфеля—Фергюсона растирают на предметном стекле рядом с каплей соответствующей клебсиеллезной сыворотки, после чего их тщательно смешивают. Капсульная агглютинация наступает обычно очень быстро и имеет вид крупных хлопьев, тяжей или с трудом разделяемого диска. В сомнительных случаях реакция может наблюдаться в нескольких сыворотках при нахождении культуры в ОК-или РК-формах; результат подтверждают в развернутой (пробирочной) реакции агглютинации в разведениях сыворотки 1:2, 1:4. (Проведение реакции агглютинации и отбор культур в К-форме осуществляют в соответствии с «Наставлением по применению клебсиеллезных диагностических агглютинирующих сывороток»).

7. ОРИЕНТИРОВОЧНЫЕ КРИТЕРИИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ В СТАЦИОНАРЕ (ОТДЕЛЕНИИ)

Для оценки эпидемической ситуации необходимо использовать следующие показатели.

1). Широкий набор маркеров устойчивости у штаммов, колонизующих больных и вызывающих гнойно-септические заболевания: наличие устойчивости к гентамицину, цефалоспоринам.

2). Широкое распространение среди больных в палате, отделении одного и того же штамма грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью; обнаружение того же штамма в окружающей среде стационара.

3). Спорадическая заболеваемость в стационаре, связанная с обнаруженными штаммами.

Таким образом, обнаружение у 6—10 исследованных пациентов одного и того же штамма грамотрицательных бактерий, определение у штамма 6—8 маркеров устойчивости, широкое распространение этого штамма в объектах окружающей среды стационара, этиологически обусловленная спорадическая заболеваемость в стационаре свидетельствуют о необходимости проведения санитарно-гигиенических и дезинфекционных мероприятий в лечебном стационаре.

Приложение 1

АППАРАТУРА, ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Аппарат для бактериологического исследования воздуха, модель 818 (щелевой прибор Кротова).
Аппарат для встряхивания жидкостей в пробирках и колбах (шуттель-аппарат).
Пробоотборник аэрозольный бактериологический (ПАБ-1).
Облучатель ультрафиолетовый для обнаружения витаминов в растворе, модель 833.
Стерилизатор паровой по ГОСТ 17726—81 или другого типа с режимами стерилизации от 100°С до 126°С.
Термостат электрический с терморегуляцией до 60°С, снабженный термометром с ценой деления 0,2°С.
Шкаф сушильный, стерилизационный, обеспечивающий температуру 180°С в течение 1—2 часов.
Аквадистиллятор Д-4-2 или другого типа.
РН-метр (иономер).
Холодильник бытовой элекрический с температурой в камере +4°С—+6°С.
Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104—80 4-го класса точности.
Микроскоп биологический по ГОСТ 8284—78 или другого типа, обеспечивающий увеличение 630 с осветителем.
Штамп-репликатор металлический для определения антибиотикочувствительности бактерий.
Шприцы емкостью 5—10 мл, иглы к ним.
Поддоны для аппарата ПАБ-1.
Лабораторная стеклянная посуда (чашки Петри, пробирки, колбы, пипетки, предметные стекла, флаконы).

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Реактивы

Альфа-нафтол, ГОСТ 17206—71.
Аммоний фосфорнокислый однозамещенный, МРТУ 6-09-1378-64.
Ацетамид.
Диметил-пара-фенилендиамин, ТУ 6-09-18-28-72.
Иод, ГОСТ 4159—64.

Калий едкий, ГОСТ 4203—65.
Калий йодистый, ГОСТ 4232—65.
Карбонат кальция, ГОСТ 4530—76.
Мочевина, ГОСТ 6691—77.
Натр едкий, ГОСТ 11078—71.
Натрий аммоний фосфорнокислый, ГОСТ 4170—68.
Натрий лимоннокислый трехзамещенный, ГОСТ 22-80—76.
Нитрат калия, ГОСТ 4217—65.
Нитрит натрия, ГОСТ 4197—74.
Парадиметиламино-бензальдегид, ТУ 6-09-3272—77.
Соляная кислота, ГОСТ 3118—67.
Сульфат калия, ГОСТ 4523—77.
Сульфат магния, ГОСТ 4523—77.
Тиосульфат натрия (натрий серноватистокислый), ГОСТ 4215—66.
2-3-5-трифенил-тетразолий хлорид (ТТХ), ТУ 6-09-3838—78.
Фосфат калия однозамещенного, ГОСТ 4198—75.
Фосфат калия двузамещенный, ГОСТ 2493—75.
Фосфат натрий аммоний, ГОСТ 4170—68.
Хлорное железо ($FeCl_3$), ГОСТ 4147—74.
Хлорид магния, ГОСТ 4209—77.
Хлорид натрия, ГОСТ 4233—77.
Цитрат аммоний железо.
Цитрат натрия трехзамещенный, ГОСТ 51314—72.
Цетил-пиридиний хлорид, МРТУ 6-09-4122—67.

Углеводы, спирты

Адонит (ЧССР).
Арабиноза, МРТУ 6-09-355—63.
Глюкоза, ГОСТ 6038—79.
Инозит, ТУ 1358—61.
Крахмал растворимый, ГОСТ 10163—76.
Ксилоза, ТУ 6-09-3061—73.
Мальтоза, ВТУ 257—59.
Маннит, ГОСТ 8321—74.
Рамноза (ЧССР).
Раффиноза (ЧССР), МРТУ 6-09-4026—67.
Сахароза, ГОСТ 5893—75.
Сорбит, МРТУ 6-09-80—62.
Д (—) фруктоза, МРТУ 6-09-2496—65.
Амиловый спирт, ТМРТУ 6-09-5531—68.
Глицерин, ГОСТ 6239—75.
Изоамиловый спирт, ГОСТ 5830—51.

Аминокислоты

L-аргинин гидрохлорид, МРТУ 6-09-124—63.
L-лизин моногидрохлорид, МРТУ 6-09-124—63.
L-триптофан, МРТУ 6-09-6042—69.
L-β-фенил-α-аланин, МРТУ 6-09-5702—68.

Индикаторы

Бриллиантовый зеленый, ВТУ 1100—53.
Бромкрезоловый пурпурный.
Бромтимоловый синий, ТУ 6-09-2045—77.
Кристаллический фиолетовый, ТУ 6-09-4119—75.
Нейтральный красный.
Феноловый красный, ГОСТ 4599—73.

Материалы для приготовления питательных сред

Агар-агар, ГОСТ 17206—84.
Агар порошковый питательный сухой Дагестанского НИИ питательных сред.
Вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72.
Дрожжи прессованные хлебопекарные, ГОСТ 171—81.
Желатина пищевая, ТУ 10П-317—69.
Пептон сухой для бактериологических целей.
Пенициллин.
Полимиксин «М».

Материалы для проведения исследований

Диски с антибиотиками.
Агглютинирующие диагностические протейные О- и Н-сыворотки.
Агглютинирующие диагностические сыворотки цитробактер.
Агглютинирующие диагностические клебсиеллезные сыворотки.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ТЕСТ-РЕАКТИВЫ, РАСТВОРЫ ИНДИКАТОРОВ

1. **Пептонная вода.** К 1000 мл дистиллированной воды добавить 10 г пептона и 5 г хлорида натрия. Подогреть до растворения пептона, профильтровать, установить pH 7,2—7,4 и стерилизовать при 120°С 20 минут.

2. **Мясопептонный бульон.** К 1000 мл мясной воды добавить 10 г пептона, 5 г хлорида натрия. После растворения ингредиентов установить pH 7,2—7,4 и стерилизовать при 120°С 20 минут.

3. **Мясопептонный агар.** К 1000 мл мясопептонного бульона добавить 15 г мелко нарезанного агара в волокнах или порошке. После 10—15-минутного набухания агар-агара смесь кипятить при постоянном помешивании до полного его растворения. Полученную среду после установления pH 7,2—7,4 профильтровать в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, предварительно смоченный кипятком, разлить во флаконы и пробирки и стерилизовать при 120°С 20 минут.

4. **Кровяной агар (5%).** К 1000 мл питательного агара (pH 7,2—7,4), расплавленного и охлажденного до 50—55°С, прибавить 50 мл дефибринированной или цитратной крови животного (барана, кролика, крупного рогатого скота) или человека. Агар с кровью тщательно перемешать, избегая образования пены, и стерильно разлить в чашки.

5. **Среда Эндо модифицированная.** Среду готовят из сухого препарата по прописи на этикетке. В готовую охлажденную до 60—70°С среду добавить 1,25 мл 0,01% водного раствора кристаллического фиолетового из расчета на 100 мл среды для ингибиции грам-положительных микроорганизмов. Разлить в чашки по 15—18 мл.

6. **Дифференциально-диагностическая среда П-2 для выделения протеев.** В 100 мл растопленного 2% питательного агара добавить 3 мл дрожжевого экстракта, 1 г маннита, 1 г мальтозы, 0,8 г желчных солей по Олькеницкому, 0,2 г цитрата аммоний-железа, 0,05 г тиосульфата натрия, 2,5 мл 0,01% раствора кристаллического фиолетового, 0,5 мл 1,6% щелочного раствора фенолового красного, pH 7,4—7,7. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, прибавить 10—12 тыс. ЕД полимиксина М, разлить в чашки. Среда должна иметь красно-коричневый цвет.

7. Дифференциально-элективная среда К-2 для выделения клебсиелл. К 100 мл дистиллированной воды добавить агар-агара 2 г, хлорида натрия 0,5 г, сульфата магния 0,02 г, сульфата калия 0,02 г, двузамещенного фосфата калия 0,2 г, однозамещенного фосфата калия 0,08 г, раффинозы 0,5 г (возможна замена 5 г сахарозы), pH 7,0—7,2. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин. После стерилизации прибавить 0,5 мл 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего, 2 мл 0,01% водного раствора кристаллического фиолетового, 0,2 мл 50% водного самостерилизующегося раствора мочевины, смешать. Смесь разлить в чашки Петри слоем 3—5 мм.

Раствор мочевины самостерилизующийся (50%) готовить следующим образом: 50 г мочевины растворить в 100 мл стерильной дистиллированной воды (в стерильной посуде) выдержать при комнатной температуре 2—3 суток для «самостерилизации». Последующее хранение при +4°—+6°С.

8. Ацетамидный агар для выделения псевдомонад. К 100 мл дистиллированной воды прибавить хлорида натрия 0,5 г, сульфата магния 0,02 г, фосфата аммония однозамещенного 0,1 г, фосфата калия двузамещенного 0,1 г. ацетамида 2 г, агара 2,0 г, pH 6,7. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 минут.

9. Аргининная среда для выделения псевдомонад. К 0,3 г аргинина монохлорида добавить хлорида магния 0,02 г, однозамещенного фосфата калия 0,08 г, тиосульфата натрия 0,1 г, агара 2 г, воды до 100 мл, pH 7,2—7,4. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, разлить в 6 чашек. После застывания поверхность среды залить тонким слоем другой среды: агара 2 г, трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) 0,8 г (или 8,0 мл 10% водного раствора ТТХ), воды до 100 мл. Инкубация 42—44 часа при 37°С.

10. Среда с бриллиантовым зеленым для выделения псевдомонад. К 100 мл расплавленного стерильного питательного агара прибавить 1 мл аптечного раствора бриллиантового зеленого, предварительно разведенного физиологическим раствором 1 : 10. Среду разлить в чашки.

11. Среда с цетилпиридиний хлоридом для выделения P. aeruginosa. К 100 мл дистиллированной воды прибавить пептона 2 г, калия сернокислого 0.7 г, магния хлористого 0,15 г, магния сернокислого 0,15 г, N-цетилпиридиния хлорида 0,2 г агар-агара 1 г. pH 6,8—7,0 стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин.

12. Среды для выделения бактерий рода Acinetobacter.

А. Этанол-аммонийная среда жидкая (ЭАС-1). К 100 мл дистиллированной воды добавить фосфата натрий-аммония 0,15 г, фосфата калия однозамещенного 0,04 г, сульфата калия 0,02 г, хлорида магния 0,02 г. После стерилизации при 0,5 атм.

в течение 15 мин прибавить 1,2 мл этилового 96° спирта и разлить асептично по 10 мл в пробирки.

Б. Этанол-аммонийная среда плотная (ЭАС-2). Основной состав среды тот же, но до стерилизации добавить 1,5 г агара (порошкового 1,8 г) и 0,5 мл 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего.

13. Среды для теста на окисление-ферментацию (OF).

А. Среда Хью-Лейфсона. К 100 мл дистиллированной воды добавить 0,2 г пептона, 0,5 г хлорида натрия, 0,03 г K_2HPO_4, 0,3 г агар-агара, 1 г углевода (глюкоза, фруктоза), 0,3 мл 1% водного раствора бромтимолового синего. Среду кипятить до полного растворения ингредиентов, установить pH 7,1—7,2, разлить по 3—4 мл в пробирки, стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, остудить столбиком.

Б. Среда Хью-Лейфсона, модифицированная. К 100 мл дистиллированной воды добавить 0,2 г пептона, 0,5 г хлорида натрия, 0,3 г K_2HPO_4, 0,4—0,6 г агар-агара, 1 г углевода (глюкоза, фруктоза), 0,5 мл 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего. После растворения ингредиентов в водяной бане установить pH 7,1—7,2, разлить в пробирки высотой 6—8 см. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, остудить столбиком. Учет теста на окисление-ферментацию см. в разделе 3.

14. Агар Симмонса для определения цитратного признака. К 100 мл дистиллированной воды прибавить 2 г агара, натрия аммония фосфорнокислого 0,15 г, калия фосфорнокислого одноосновного 0,1 г, магния сернокислого 0,02 г, натрия лимоннокислого 0,3 г, 0,5% спиртового раствора бромтимолового синего 1 мл. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, разлить в стерильные пробирки по 5—7 мл, остудить в скошенном состоянии, оставляя столбик 2—2,5 см. Коммерческая сухая среда готовится согласно указаниям на этикетке препарата. Цитрат-положительные бактерии изменяют зеленый цвет среды на синий.

15. Среда для определения продукции индола. Выявляет индол при росте культуры на агаре Симмонса. К 100 г дистиллированной воды добавить триптофана 0,05 г, пептона 0,1 г, K_2HPO_4 0,5 г. Стерилизовать при 0,5 атм. 12—15 мин. После инкубации посева на агаре Симмонса при 37°С в течение 18—20 час, в случае щелочения поверхности среды, сверху налить 1 мл среды для определения продукции индола, тщательно встряхнуть пробирку и инкубировать ее 2—4 часа при 37°С. Затем на поверхность среды наслоить 0,1—0,2 мл реактива Ковача. Учет реакции в течение первых 5 мин. Индол-положи-

тельные микроорганизмы дают малиновое окрашивание кольца.

Тест-реактив Ковача для определения индола: к 75 мл амилового или изоамилового спирта добавить пара-диметиламидобензальдегида 5 г, концентрированной соляной кислоты 25 мл.

16. Среда с мочевиной Кристенсена для определения уреазной активности. К 100 мл дистиллированной воды добавить пептона 0,1 г, натрия хлорида 0,5 г, калия дигидрофосфата (KH_2PO_4) 0,2 г, агара 2 г, глюкозы 0,1 г, фенолового красного (0,2% раствор) 0,6 мл, мочевины (20% раствор водный) 10 мл.

Пептон, соли и агар растворить при нагревании, установить pH 6,8—6,9, профильтровать, простерилизовать при 115°С 20 мин, добавить глюкозу и индикатор. Затем стерилизовать текучим паром 1 час и охладить до 50—55°С. Раствор мочевины асептично добавить к основе. Готовую среду разлить в стерильные пробирки и охладить в скошенном положении. При положительном результате среда из желтоватой становится красной в сроки от нескольких часов до 4 суток.

17. Среда с мочевиной Преуса для определения уреазной активности. К 100 мл бульона Хоттингера добавить агара 1,5 г, глюкозы 0,5 г, мочевины (50% самостерилизующегося водного раствора) 2 мл, бромтимолового синего 0,2% водного раствора 1,2 мл. Агар расплавить в бульоне, при подогревании профильтровать, установить pH 6,9—7,0. Стерилизовать при 120°С 20 мин. К стерильному питательному агару добавить глюкозу, мочевину, индикатор. Повторно простерилизовать текучим паром однократно 15 мин, после чего скосить. Цвет среды — оливковый, при положительном результате становится синим.

18. Среда Кларка для реакции с метиловым красным и выявления продукции ацетоина. К 100 мл дистиллированной воды добавить пептона 0,5 г, глюкозы 0,5 г, K_2HPO_4 0,5 г. После растворения ингредиентов среду стерилизовать при 0,5 атм. 12—15 мин, хранить в холодильнике. Перед употреблением разлить асептично в пробирки по 1,0 мл. Посев должен быть массивным. Инкубация 24 часа и более при 37°С. Далее прибавить 0,1—0,2 мл реактива Кларка. Определение феномена Кларка (реакция с метиловым красным) возможна и на стекле. На предметное стекло наносят каплю реактива Кларка и каплю среды Кларка с посевом после инкубации. В обоих случаях покраснение среды указывает на прекращение микробного метаболизма в результате резко кислой реакции среды (положительная реакция); желтый цвет свидетельствует о продолжающемся метаболическом процессе и щелочении среды за счет расщепления пептона (отрицательная реакция).

После учета результатов феномена Кларка в той же пробир-

же можно определить и реакцию Фогеса—Проскауэра (наличие ацетоина): прибавить 0,2—0,3 мл реактива Баррита и 0,1 мл 40% водного раствора КОН. Появление на поверхности среды кольца окраски разной степени интенсивности — от розового до ярко-красного в течение от 5—10 мин до 2 час. указывает на продукцию ацетоина.

Тест-реактивы.

А. Для реакции с метиловым красным (реактив Кларка). Растворить 0,1 г метилового красного в 300 мл этилового спирта 96°, затем добавить 200 мл дистиллированной воды.

Б. Для реакции Фогеса—Проскауэра. 1. Реактив Баррита: 5 г альфа-нафтола растворить в 100 мл 96° этилового спирта. 2. 40% водный раствор гидроокиси калия (КОН).

19. Среды для определения декарбоксилаз лизина, аргинина, орнитина. К 40 мл мясной воды добавить 0,5 г пептона, 0,1 г глюкозы, 60 мл дистиллированной воды, 1 мл 1,6% спиртового раствора бромтимолового синего, 1,0 г L-аминокислоты или 2 г DL-аминокислоты, 0,3 г (0,5 мл) дрожжевого экстракта. В воде растворить белковую питательную основу и глюкозу. Установить pH 6,0—6,1. Затем разделить на 4 равные части. В каждую из трех порций внести одну из аминокислот, четвертая порция без аминокислоты является контрольной. Среды кипятить 5—10 мин, вновь установить pH 6,0—6,1, прибавить индикатор и разлить в пробирки по 2—3 мл. Стерилизовать при 0,5 атм в течение 15 мин. При расщеплении аминокислот цвет среды становится из желтого синим. Цвет контрольной среды остается желтым.

20. Среда для определения фенилаланиндезаминазы. К 100 мл дистиллированной воды добавить 1,2 г агара, 0,9 г дрожжевого экстракта, 0,1 г фенилаланина, 0,1 г Na_2HPO_4 и 0,5 хлорида натрия. Ингредиенты смешать, среду кипятить 5 мин и разлить в пробирки. Стерилизовать при 0,5 атм. в течение 30 мин, сразу же после стерилизации скосить. На скошенную поверхность агара с выросшей культурой наслоить 4—5 капель 10% раствора хлорида железа. В случае образования фенилпировиновой кислоты поверхность агара приобретает зеленый цвет.

21. Среды для определения оксидации рамнозы, сорбита, арабинозы. К 100 мл дистиллированной воды добавить пептона 0,5 г, KH_2PO_4 0,08 г, хлорида натрия 0,5 г, агара 1,2 г, 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего 0,5 мл, углеводов: рамнозы 2 г, арабинозы 2 г, сорбита 3 г. Среды готовить с каждым углеводом отдельно. После стерилизации при 0,5 атм. в течение 15 мин разлить в чашки. Посев осуществлять макроколониями (10—12 колоний на чашке), инкубация 37°С в течение 18—20 часов. Положительный результат (оксидация углевода)

определяется пожелтением среды. Кроме рекомендуемых сред для определения оксидации рамнозы, сорбита, арабинозы можно использовать среды Гисса.

22. Среда для определения оксидации мальтозы. К 100 мл дистиллированной воды добавить 0,2 г пептона, хлорида натрия 0,5 г, агара 2 г, мальтозы 2 г, 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего 1 мл. Стерилизация при 0,5 атм. 15 мин. Среду разлить в 6 чашек. Посев макроколониями (10—12 колоний на чашке). Инкубация при 37°С 18—20 часов. Положительный результат — пожелтение среды.

23. Среда для определения оксидации ксилозы. К 100 мл дистиллированной воды добавить 0,2 г пептона, агара 1,5--2 г, хлорида натрия 0,5 г, ксилозы 2 г, 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего 1 мл, pH 7,2. Стерилизовать при 0,5 атм. в течение 15 мин; среду разлить в 6 чашек. Посев макроколониями (12—18 колоний на чашке). Положительный результат — пожелтение среды.

24. Среда для определения оксидации 10% лактозы. К 100 мл дистиллированной воды добавить пептона 0,2 г, хлорида натрия 0,5 г, лактозы 10 г, KH_2PO_4 0,03 г, агара 0,4—0,6 г, 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего 0,5 мл. Стерилизовать при 0,5 атм. в течение 15 мин. Разлить асептично в пробирки столбиком высотой 6 см. Посев уколом. Положительный результат — пожелтение среды.

25. Среда ИнАд для определения оксидации инозита и ферментации адонита. Среда двухслойная. Нижний слой: к 100 мл дистиллированной воды прибавить хлорида натрия 0,5 г, фосфата калия однозамещенного 0,1 г, адонита 0,3 г, агара 1 г, 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего 0,2 мл, pH 7,2—7,4. Ингредиенты растворить в водяной бане в течение 15 мин, разлить по 3—4 мл в пробирки, стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, остудить столбиком. Верхний слой: к 100 мл дистиллированной воды прибавить пептона 0,5 г, фосфата калия двузамещенного 0,03 г, хлорида натрия 0,5 г, инозита 0,5 г, агара 1,5 г, 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего 0,5 мл, стерилизовать при 0,5 атм. в течение 15 мин, разлить асептично поверх нижнего слоя в количестве 4—5 мл, скосить, оставив столбик высотой 0,5—1,0 см. Посев штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик. Положительный результат — пожелтение среды.

26. Среда для определения амилазы. К расплавленному питательному агару Дагестанского НИИ питательных сред, приготовленному по стандартной прописи, добавить от 0,2% до 1% растворенного крахмала. Разлить в пробирки по 4—5 мл, стерилизовать при 0,5 атм. в течение 30 мин и скосить. Испытывае-

мую культуру засеять штрихом на поверхность среды и инкубировать при 37°С в течение 18—24 час, после чего на поверхность косяка налить 2—3 мл раствора Люголя. Отсутствие синего окрашивания свидетельствуют о наличии амилазы.

27. Среда для определения желатиназной активности.

А. В 100 мл дистиллированной воды добавить 10 г желатины, оставить на 40—60 мин для набухания. Стерилизовать при 0,5 атм. в течение 15 мин. Асептично разлить в пробирки по 5—6 мл. Посев уколом в теплую среду, инкубировать в термостате под углом в 45°. Положительный результат — разжижение желатины.

Б. Среда двухслойная. Нижний слой: 1,5% голодный агар разлить в чашки. Верхний слой: в 100 мл дистиллированной воды (или МПБ) добавить пептона 0,5 г, желатины 15 г, 0,01% водного раствора кристаллического фиолетового 1,5 мл. Стерилизация при 0,5 атм. в течение 15 мин. Верхний слой: разлить после застывания нижнего слоя, чашки оставить на сутки в холодильнике, не переворачивая. Посев макроколониями (10—12 колоний на чашке). Посев оставить при комнатной температуре под бумажной и стеклянной крышками. Учет производить через 24—48 часов. Положительный результат — разжижение желатины в месте посева в виде кратерообразного углубления.

28. Среда для определения нитрат-нитритредуктазы и выявления способности роста культуры при 42°С. К 80 мл дистиллированной воды добавить пептона 2 г, хлорида натрия 0,5 г, нитрата калия 0,2 г, агара 0,1 г, дрожжевого экстракта 20 мл. Дрожжевой экстракт и вода могут быть заменены мясопептонным бульоном. В этом случае содержание пептона следует уменьшить до 1 г. После растворения компонентов в водяной бане среду разлить в пробирки по 4—5 мл, стерилизовать при 0,5 атм., остудить столбиком. Положительный результат — наличие роста (помутнение) и образование пузырьков газообразного азота на поверхности среды.

29. Среда «ПП» для видовой дифференциации протеев. Среда двухслойная. Нижний слой: к 100 мл дистиллированной воды прибавить глюкозы 0,2 г, агара 0,6 г, фосфата калия однозамещенного 0,1 г, фосфата калия двузамещенного 0,04 г, хлорида натрия 0,5 г, пептона 0,1 г, 1% водного раствора нейтрального красного 1 мл. Стерилизовать при 0,5 атм. в течение 15 мин. После стерилизации прибавить 1 мл 50% самостерилизующегося раствора мочевины, разлить асептично по 3—4 мл в пробирки и остудить столбиком. Верхний слой: к 200 мл дистиллированной воды прибавить агара 1,2—1,4 г (в зависимости от

сорта агара минимальное количество, способное сохранить при застывании скошенное положение), дрожжевого экстракта 30 мл, или ЭКД 1,2 г. Стерилизовать при 0,5 атм. в течение 15 мин, прибавить 0,4 г DL-триптофана, 0,06 г тиосульфата натрия и 0,2 г натрий-аммоний фосфорнокислого ($NaNH_4HPO_4$), растворенных в небольшом количестве воды и подогретых в водяной бане до 100°С. Разлить асептично поверх нижнего слоя по 6 мл, скосить столбиком высотой 1—1,5 см. Посев штрихом по скошенной поверхности и уколом до дна пробирки. Далее между стенкой пробирки и пробкой поместить полоску реактивной на индол бумаги. После культивирования посевов в течение 18—20 часов при 37°С учесть наличие уреазной активности, продукцию индола и газа на глюкозе. Далее в пробирку налить реактив для определения триптофандеаминазы и сероводорода.

Тест-реактив для определения триптофандеаминазы и продукции сероводорода: к 13 г хлорного железа ($FeCl_3$) добавить HCl 1,3 мл, дистиллированной воды до 100 мл. Реактив хранить в банке с притертой пробкой.

30. Среда для определения активности ДНК-азы. Среда готовится согласно методу, представленному в приказе № 720 МЗ СССР от 31/VII-1978 г.

31. Полужидкий агар для определения подвижности. В 1000 мл дистиллированной воды добавить гидролизат Хоттингера до содержания в среде 120—150 мг% аминного азота, 5 г натрий хлорида (NaCl), установить pH 7,2—7,4, добавить 3—4 г агара, расплавить его при подогревании и постоянном помешивании среды. Затем профильтровать через ватно-марлевый, меткалевый фильтры, или через фильтровальное полотно «Бельтинг». Среду разлить в пробирки по 5 мл, стерилизовать при 120°С в течение 30 мин и охладить в виде столбика. Определение подвижности бактерий проводить при посеве уколом в столбик агара. Подвижные микробы растут в толще среды по ходу укола.

32. Среда Кинг-А для выявления пиоцианина. К 2 г пептона добавить агар-агара 1,5 г, глицерина 1 мл, сульфата калия 1 г, хлорида магния 0,14 г, воды дистиллированной до 100 мл, pH 7,2. Стерилизовать при 0,5 атм. в течение 15 мин, разлить в чашки. Положительный результат — окрашивание среды вокруг колоний в зеленый, синий, сине-зеленый и бурый цвета.

33. Среда FN для определения флюоресценции. К 100 мл дистиллированной воды добавить пептона 1 г, K_2HPO_4 0,15 г, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0,15 г, KNO_3 0,2 г, $NaNO_2$ 0,05 г, агар-агара 1,5 г, фенолового красного 0,002 г. PH — 7,2. Готовую среду разлить в

пробирки по 4 мл, автоклавировать при 0,5 атм. в течение 30 мин, скосить. Культуру засеять штрихом на поверхность скошенной среды, инкубировать 18—24 часа при 37°С. Флюоресценцию наблюдать в УФ-свете с помощью ультрафиолетового облучателя для обнаружения витаминов в растворе (модель 833).

34. Тест-реактивы для определения цитохромоксидазы.

А. 1% спиртовой раствор α-нафтола.

Б. 1% водный раствор **диметил-парафенилендиамина (пара**-аминодиметилфенилендиамина хлорида или оксалата). Растворы **хранить в темных флаконах с притертыми пробками в холо**дильнике, первый — до 1 месяца, второй — до 1 недели. Перед употреблением к трем частям реактива «А» добавить 7 частей реактива «Б». Положительный результат — интенсивное посинение колонии или мазка из нее на фильтровальной бумаге в течение 20—40 с после добавления капли реактива. Позднюю реакцию, как и посинение самой агаровой среды, не учитывать. Реактив может быть заменен готовой бумажной индикаторной системой.

35. Реактивы для окраски бактерий по Граму. Использовать реактивы и проводить окраску по Граму следует в соответствии с ГОСТ 18963—73 или «Методическими указаниями по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями», М., 1984.

36. Индикаторы: 1,6% щелочные растворы бромтимолового синего и фенолового красного. В 16 мл 0,2% раствора едкого натра (NaOH) растворить 0,5 г краски и добавить 15 мл дистиллированной воды.

МОСКОВСКИЙ ОБЛАСТНОЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
им. М. Ф. ВЛАДИМИРСКОГО
(129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ—ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Методические рекомендации

Технический редактор Р. Д. Рашковская
Корректор Л. И. Кондратьева

Л-59202 Подп. в печать 8.09.86 г. Тираж 2000 экз. Заказ 6109 Бесплатно

рская типография Упрполиграфиздата Мособлисполкома

gost.e-ecolog.ru