МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ
ВЕТЕРИНАРИИ
(с Государственной ветеринарной инспекцией)

"УТВЕРЖДАЮ"
Начальник Главного управления
ветеринарии МСХ СССР
А.Д.Третьяков
"21" апреля 1981 года.

М Е Т О Д И К А

от _____ № _____

Москва

Индикации бактерий рода "Протеус" в кормах животного происхождения

Настоящая методика предназначена для ветеринарных лабораторий, лабораторий ОПВК мясокомбинатов и других учреждений, с целью индикации бактерий рода "Протеус" в сухих животных кормах.

I. Порядок проведения исследований.

I.I. Первый день исследования. 50 г корма помещают в колбу с 500 мл стерильного физиологического раствора или 0,1% стерильной пептонной воды и тщательно встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30 минут. Для количественного учета и получения чистой культуры первичный посев исследуемого материала производят по 1,0 мл до разведения 10^{-6} в конденсационную воду свежескошенного агара (метод Шукевича) или ТТХ-агара (Даниленко И.П.) и по 0,5 мл на поверхность питательных сред Плоскирева или висмут-сульфит агар. Посевы помещают в термостат при температуре 37°С на 18-24 часа.

I.2. Второй день исследования.

I.2.1 просматривают титрационные посевы на скошенном МПА или ТТХ-агаре. Если регистрируют "ползучий" нежный вуалеобразный рост (на МПА) или нежно-розовый (на ТТХ-агаре), то определяют титр по наименьшему количеству засеянного материала, в котором обнаружен рост бактерий рода "Протеус";

I.2.2 просматривают чашки с посевом и отмечают колонии, подлежащие дальнейшему исследованию. На среде Плоскирева бактерии растут в виде прозрачных колоний, зона роста которых окрашивается в желтоватый цвет; на висмут-сульфит агаре через 24-48 часов - в виде изолированных колоний темно-коричневого цвета, окраска среды не изменяется. Если рост 18-24 часовой культуры однородный, то

gost.e-ecolog.ru

для дальнейшего изучения используют не менее 4-х колоний, при росте различных колоний - не менее шести;

I.2.3 для определения родовой принадлежности изучаемого штамма изолированные колонии отвивают в пробирку с МПБ, из которого после 4-5 часовой инкубации при 37°С производят пересев на следующие среды: /приложение № I/

- агар с фенилаланином для определения фермента фенилаланиндезаминазы;
- бульон или пептонную воду для определения индола;
- среду с мочевиной для определения фермента уреазы;
- среду с 0,5% мальтозы;
- скошенный агар или ТГХ-агар для серологического типирования и определения патогенности.

Среды помещают в термостат при 37°С на I6-I8 часов.

Наличие фермента фенилаланиндезаминазы определяют путем наслоения на скошенную поверхность среды 4-5 капель I0%-ного раствора хлорного железа. Появление интенсивной зеленой окраски свидетельствует о наличии фермента.

Гидролиз мочевины (наличие фермента уреазы) устанавливают по изменению цвета среды из желтого в красный. Индол определяют на МПБ по специальным индикаторным бумажкам, вложенным под пробку пробирки. Индол можно определять путем наслоения на среду реактива Эрлиха (0,5 мл), при этом появление красного кольца на границе жидкостей через 2-5 минут свидетельствует о положительном результате.

I.3. Третий день исследования. Учитывают результаты ферментативной активности культур. Грамотрицательные бактерии, гидролизующие мочевину, дезаминирующие фенилаланин, относятся к роду "Протеус". На основании способности к индолообразованию и ферментации мальтозы определяют принадлежность к одной из биохимических групп: штаммы, ферментирующие мальтозу и образующие индол, относятся к *P. vulgaris*; штаммы, не ферментирующие мальтозу и не образующие индол, к *P. mirabilis*.

I.4. Серологическое типирование. Штаммы, отнесенные на основании биохимических свойств к роду "Протеус", подвергают серологическому типированию при помощи диагностических поливалентных и типовых О- и Н- сывороток в реакции агглютинации на стекле. Для типирования используют суточную агаровую культуру. Первоначально культуру испытывают поливалентными О- сыворотками. В случае,

если культура агглютинируется одной из поливалентных сывороток, продолжают серологическую идентификацию типовыми сыворотками, входящими в состав поливалентной. При нечетких результатах, полученных в РА на стекле с живой культурой, проводят реакцию агглютинации в пробирках или на стекле с прогретой (I час–I00°С), отцентрифугированной культурой.

После установления принадлежности к той или иной О-группе определяют Н-антиген с поливалентными Н-сыворотками, а затем типовыми. Серологический вариант определяют в соответствии со схемой Кауфмана и Перча (приложение 2).

I.5. Определение патогенности. Патогенные свойства бактерий определяют путем постановки биологической пробы на белых мышах. С этой целью внутрибрюшинно заражают не менее трех мышей весом I6–I8 г. смывом суточной агаровой культуры или суточной бульонной культурой в дозе 500 млн. микробных клеток. Концентрацию бактерий устанавливают по бактерийному стандарту. Культуру признают патогенной в случае гибели одной или более мышей в первые двое суток после заражения.

II. Оценка кормов животного происхождения.

2.I. Корма животного происхождения используют сельскохозяйственным животным и птице при отрицательных результатах исследования на энтеропатогенные варианты бактерий рода "Протеус" при условии соответствия кормов по другим показателям действующих стандартов.

2.2. При обнаружении энтеропатогенных вариантов бактерий рода "Протеус" сухие корма животного происхождения подвергают повторной термической обработке путем проварки при температуре не менее I00°С в течение I,5 часа или стирилизации в вакуум-горизонтальных котлах – при температуре I20°С в течение 30 минут.

х х х

Методика разработана Всесоюзным научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии.

Приложение № I.

Рецепты сред

I. Агар с фенилаланином

Дрожжевой экстракт	I00 мл /3,0 г/
dl - фенилаланин или	2,0 г
l - фенилаланин	I,0 г
Na_2HPO_4: I2 H_2O	I,0 г
NaCI	5 г
Агар	I2,0 г
Вода дистилированная	I000,0 мл

Ингредиенты растворяют в воде при подогревании, фильтруют и разливают в пробирки по 2-3 мл, стерилизуют при I20°С в течение I0 минут, после чего агар в пробирках скашивают. Одновременно готовят I0%-ный раствор хлорного железа.

2. ТТХ - агар

К I00 мл расплавленного МПА добавляют I мл I%-го раствора ТТХ /трифенилтетразолий хлорид/. Агар перемешивают, разливают в пробирки и готовят скошенный агар.

3. Бульон с мочевиной.

К I00 мл МПБ добавляют I,0 г.мочевины и 0,2 мл индикатора - I,6%-ного спиртового раствора крезолового красного. Стерилизуют текучим паром в течение 3-х дней. Готовая среда имеет желтый цвет.

Приложение № 2.

Упрощенная антигенно-диагностическая схема
бактерий рода "Протеус" (Кауфман, Перча, 1948).

[illegible]тиген	Н-антиген	О-антиген	Н-антиген
1	I	26	2; 3; 6
2	I	27	2; 3
3	I; 2	28	2; 3
4	I; 8; I6	29	I3
5	I; 3	30	I; 2; 4; I3; I5
6	I; 2; 3	3I	I; 2
7	I; 3; 4	32	I; 3; 5
8	I	33	3
9	I, 2	34	6
I0	I; 2; 3; 4; 5	35	2
II	I; 2; 3; 6	36	3; 7
I2	I; 2	37	I7
I3	I; 2; 3; 4	38	I; 2
I4	I; 3	39	I8
I5	I; 7	40	4
I6	I; 9; I4	4I	I; 2
I7	I; I0	42	I
I8	I	43	2
I9	I; 3; II	44	II; I9
20	I; 2	45	II
2I	I	46	I7
22	I	47	I
23	I; 2; 3; I2	48	I
24	I; 3; 4; I3	49	2
25	I		

gost.e-ecolog.ru