МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Москва — 1985 г.

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Главное санитарно-эпидемиологическое управление

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Москва - 1985 г.

Методические рекомендации разработаны Московским ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательским институтом гигиены им.Ф.Ф.Эрисмана (д.м.н. Г.П.Калина, к.м.н. Л.М.Виноградова, к.м.н. Г.М.Трухина).

Методические рекомендации рассмотрены Лабораторным Советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР и рекомендованы к утверждению.

Рекомендации предназначены для использования в практике бактериологических лабораторий гигиенического и эпидемиологического профиля научно-исследовательских институтов, медицинских институтов и, по показаниям, республиканских, краевых, областных и городских санитарно-эпидемиологических станций.

"УТВЕРЖДАЮ"
Начальник Главного санитарно-эпидемиологического управления Министерства здравоохранения СССР
В.Е.Ковшило
"14" августа 1985 год
№ 3923-85

Методические рекомендации
по идентификации грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов.

I. Введение.

В последние годы внимание гигиенистов и эпидемиологов привлекает обширная группа грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов /НФМ/, широко распространенная в объектах окружающей среды. Доказана патогенность очних /Pseudomonas aeruginosa, Bordetella pertussis, Flavobacterium meningosepticum, Moraxella lacunata/ и роль в патогенезе заболеван человека и животных других НФМ / Acinetobacter calcoaceticus, Bordetella bronchiseptica, Achromobacter xylosoxidans, Bordetella parapertussis/. Однако, частое нахождение многих из них в кишечнике человека свидетельствует о возможном их индикаторном значении. Поэтому возникла необходимость в систематике НФМ, а также упрощенных и доступных для широких исследований идентификации микроорганизмов, обнаруживаемых при исследованиях поверхностных и подземных вод, воды централизованного водоснабжения, сточных жидкостей, почвы, смывов с предметов окружения больных в лечебных учреждениях и в патологическом материале.
В основу идентификации положено систематизирование признаков по степени их значения, дополненное тестами, необходимыми

в отдельных случаях для более четкой идентификации того или иного НФМ, имеющего медицинское и (или) санитарное значение, и для дифференциации последних от хемолитотрофных и сапрофитных НФМ, широко распространенных в воде и почве. В предлагаемом виде с данным набором ключевых признаков и количеством идентифицируемых НФМ предлагаемая схема разработана в СССР впервые.

I. Лабораторное оборудование, реактивы, материалы.

I.I. Основы питательных сред.

I.I.I. Агар микробиологический. ГОСТ 17206-71.

I.I.2. Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия 171-81.

I.I.3. Молоко коровье пастеризованное. Технические условия 13277-79.

I.I.4. Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия 13805-76.

I.2. Реактивы.

I.2.I. I-нафтол. Технические условия 5838-79.

I.2.2. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия 199-78.

I.2.3. Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия 24363-80. (СТ СЭВ 1439-78).

I.2.4. Диметил-пара-фенилендиамин ТУ 6-09-18-28-72.

I.2.5. Калий азотнокислый. Технические условия 4217-77 (СТ.СЭВ1697-79).

I.2.6. Аммоний сернокислый. Технические условия 3769-78.

I.2.7. Калий сернокислый. Технические условия 4145-74.

I.2.8. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия 4523-77.

I.2.9. Тетраметил-пара-фенилендиамид ТУ 6-09-18-28-72.

I.2.10. Калий фосфорнокислый однозамещенный. ТУ 4198-75.

I.2.II. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия 2493-75.

I.2.I2. Натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный 4-водный. Технические условия 4I70-78.

I.2.I3. Аммоний хлористый. Технические условия 3773-72.

I.2.I4. Магний хлористый 6-водный. Технические условия 4209-77.

I.2.I5. Натрий лимоннокислый трехзамещенный. ТУ 22280-76.

I.3. Углеводы, спирты.

I.3.I. Д-глюкоза. Технические условия 6038-79.

I.3.2. Глицерин. Технические условия 6259-75.

I.3.3. Ксилоза ТУ 6-09-20-45-77.

I.3.4. Лактоза ТУ 6-09-22-93-79.

I.3.5. Мальтоза ВТУ 257-59.

I.3.6. Спирт этиловый ректификованный. ТУ 5962-67.

I.4. Красители, индикаторы.

I.4.I. Бромтимоловый синий. ТУ 6-09-20-45-77.

I.4.2. Индикаторы. Феноловый красный. ГОСТ 4599-73.

I.4.3. Хлорид 2-, 3-, 5-трифенилтетразола. ТУ 6-09-38-38-78.

I.5. Лабораторное оборудование, посуда, материалы.

I.5.I. Посуда и оборудование лабораторные, стеклянные. Типы, основные параметры и размеры. ГОСТ 25336-82 Е (СТ СЭВ 2945-8I).

I.5.2. Термостат электрический с автоматической терморегулировкой до 60°С с термометром ценой деления 0,2°С.

I.5.3. Проволока из никелевого и медноникелевых сплавов для удлиняющих проводов к термоэлектрическим преобразователям. ТУ I79I-54.

2. Питательные среды.

2.I. Среда для определения оксидации и ферментации глюкозы (О/Ф). Пептон 2,0; хлорид натрия 5,0 г; 2-замещенный фосфат калия - 0,3 г; глюкоза I0,0 г; агар 4,0-6,0 г; I,6% щелочной раствор фено-

лового красного 2,5 мл; вода до 1000,0 мл.; pH 7,4-7,6. После растворения ингредиентов разлить в пробирки в количестве, достаточном для получения высоты столбика не менее 6 см (примерно 7,5-8,0 мл.). После стерилизации при 0,5 атм 15 мин, охладить в вертикальном положении. Посев иглой (не короче 6-7 см) уколом до дна пробирки. Инкубация 35-37°С 18-20 часов или 30°С 42-44 часа. Пожелтение всего столбика-оксидация и ферментация положительны (+/+), пожелтение только верхней части столбика, иногда всего 1,5-2,0 см. от поверхности, оксидация без ферментации (+/-), отсутствие пожелтения всего столбика и, как правило, щелочение (малиновый цвет) поверхности среды - отсутствие ферментации и оксидации (0/0). В некоторых случаях наблюдается пожелтение нижней половины столбика при малиновой окраске верхней, что может быть следствием высокой протеолитической активности, в результате чего образованием кислоты за счет оксидации глюкозы сменяется щелочением в результате интенсивного расщепления пептона.

2.2. Определение нитратазной активности. Пептон 20,0 г; хлорид натрия 5,0 г; нитрат калия 2,0 г; агар 1,0-3,0 г; жидкий дрожжевой экстракт 200,0 мл; вода до 1000,0 мл. Разлить по 4-5 мл в пробирки, стерилизовать при 1 атм. 20 мин. Посев уколом до дна пробирки. Процесс восстановления нитрата может идти с различной глубиной реакции - от восстановления нитрата в нитрит, до редукции последнего до выделения свободного азота. Нитрат-редуктазная активность способствует утилизации кислорода в анаэробных условиях и диффузному росту нитратаза-активных НКМ в среде. Неактивные НКМ растут в этой среде лишь на поверхности в виде более или менее толстой пленки. При завершении редукции нитрата и нитрита до конечного этапа - образования свободного азота, в среде данного состава в толще и на поверхности образуются пузырьки газа - при 0,1% агара в виде обильной пены, при 0,3% - в толще среды. Реакцию можно

сочетать с определением способности роста при 42°С, но учитывая, что некоторые НФМ не способны расти при этой температуре или продуцировать свободный азот, необходимо дублировать посев с инкубацией при 30-35°С. Выделение свободного азота в более ранние сроки (через 4-5 часов после посева, но не позже) можно определить, используя феномен "раскаленной петли", погружение которой в среду вызывает интенсивное освобождение азота в виде пузырьков газа или пены на поверхности среды.

2.3. Оксидация углеводов (мальтозы, ксилозы, сахарозы) и других С-содержащих компонентов. Пептон 2,0; хлорид натрия 5,0 г; углевод 2,0 г; 1,6% щелочной раствор бромтимолового синего 6,0 мл; агар 12,0 *; вода до 1000,0 мл., pH 7,2-7,4. После стерилизации при 0,5 атм 15 мин, разлить среду в чашки. Посев макроколониями (12-18), инкубация при 35°С 18-20 часов или 30°С до 2 суток. При определении оксидации лактозы концентрацию последней увеличивают до 10% и длительность инкубации до 2-7 суток при 35°С и до 4-7 суток при 30°С.

2.4. Определение желатиназной активности. Питательный агар 1,2% (мясопептонный или фабричный порошковый) 1000,0 мл; желатин 200,0 г; стерилизация при 0,5 атм 15 мин, разлить в чашки петолстым слоем (не более 15 мл в чашку). После застывания среды ее поверхность залить тонким слоем 2% агара на дистиллированной воде. Посев макроколониями (блюшками) в количестве 12-18. Инкубация при 35°С 1-2 суток или при 30°С 2-3 суток. Положительный результат - зона помутнения вокруг колоний.

2.5. Определение продукции феназина (смеси пигментов - пиоцианина, пиорубина, меланина и др.) (среда Кинг-А). Пептон 20,0 г; агар 12,0 г; глицерин 10,0 г; сульфат калия 10,0 г; хлорид магния

* Во всех случаях, при отсутствии специального указания, применяется агар-агар, но не сухой питательный агар фабричного производства.

1,4 г; вода до 1000,0 мл., pH 7,2. Посев макроколониями на чашках. Инкубация 35°С 18-24 часа. Продукция феназинов разных оттенков, от бурого (сочетание рубрина с цианином) до отчетливо зеленого или красного, в зависимости от преобладания того или иного феназина. Пиомеланин может проявляться в виде темнокоричневого или черного окрашивания, но феномен наступает обычно поздно (иногда на 7-14 сутки).

2.6. Определение утилизации С и N содержащих соединений. Различают два типа обменных процессов, свойственных НФМ. При первом углерод и азот утилизируются микроорганизмом в среде ограниченного минерального состава, при втором базовая среда должна быть полноценной, содержать те или иные факторы роста, высоко питательные вещества или нативные животные белки.

2.6.1. Состав базовой минеральной среды ограниченного состава может быть различным, от сложных наборов большого количества разных солей до простых, содержащих немногие органогены, типа сред Козера или Симмонса. Может быть рекомендован следующий комплекс солей: Однозамещенный фосфат калия 1,5 г; сульфат магния 0,02 г; фосфат аммония 0,05 г; хлорид натрия 0,5 г; агар 1,2 г; 1,6% щелочной раствор бромтимолового синего 0,5 мл; вода 1000,0 мл. После растворения стерилизовать при 1,0 атм 20 мин, хранить в холодильнике, применять по мере надобности, прибавляя разные источники углеродного питания к 100,0 мл базовой среды: по 5 мл стерильных водных растворов 10% глюкозы, 6,0% ацетата натрия или цитрата натрия, 10% различных углеводов. Этанол прибавлять перед разливкой в чашки в количестве 1,2% для определения кислотообразования или 0,3 мл для определения утилизации. Посев разных штаммов макроколониями (блинками) до 12-18-24 в чашке.

2.6.2. Базовая среда для второго типа метаболизма может быть различной для разных НФМ. Основная минеральная база аналогична ре-

ксленцуемой в п.2.6.I. Дополнительно могут быть введены метионин (0,2-0,3%), дрожжевой экстракт (0,3%), различные аминокислоты (также до 0,3%); некоторые НФМ нуждаются в полноценных средах, типа сердечно-мозгового настоя, иногда в нативных животных белках - крови, кровяной сыворотке в обычно принятых для таких сред концентрациях. Подбор для каждого НФМ необходимых компонентов сложен, затрудняет процесс идентификации; проще ограничиться констатацией отсутствия роста и изменения реакции среды в минеральной среде с гликозой для сахаролитов (кислая реакция в положительном случае) и с ацетатом натрия для щелочеобразователей (щелочная реакция в положительном случае).

2.7. Определение уреазной активности. Может быть использована синтетическая минеральная среда (п.2.6.I.) с заменой источника азотного питания мочевиной в количестве 0,1% и уменьшением содержания гликозы до 0,1%. Определение в чашках посевом макроколониями. При интенсивной уреазной реакции щелочение подлежащего слоя среды наступает уже через 3-4 часа после посева, в умеренной реакции - через 16-18 часов. Целесообразно после 3-4 часовой инкубации при 30-35°С чашки до следующего утра оставлять при комнатной температуре.

2.8. Определение металлического блеска. Сухой питательный агар порошковый Дагестанского производства 3060; пептон 10,0; вода до 1000,0 г. После стерилизации при 1 ати 20 мин внести 100,0 мл стерильного снятого молока, 30,0 мл 10% водного раствора хлорида трифенилтетразола (ТТХ) (самостерилизуется при комнатной температуре в течение 2-3 суток), смешать и разлить в чашки, по 20-25 мл. Посев макроколониями. После инкубации при 35-37°С в течение 22-24 часов на поверхности микроколоний появляются золотистые вкрапления. При данном составе среды - реже вся поверхность макроколонии покрыта золотистым налетом. При отрицательном результате следует

выдерживать посевы на среду при комнатной температуре 2-3 суток.

3. Реакции и реактивы.

3.I. О ксидазные реакции.

3.I.I. Реакция оксидазы по Ковачу. Реактив: тетраметил-пара-фенилендиамин хлорид 0,5 г; вода I00,0 мл. Реактив наносить платиновой или нихромовой петлей на колонию (макроколонию). Положительная реакция – порозовение, а затем окрашивание в глубокий фиолетовый цвет. Альтернативно – пропитать фильтровальную бумагу реактивом и наносить на нее микробную массу из макроколонии. Положительный результат тот же.

3.I 2. Реакция Цитохромоксидазы по Гэби и Хедли. Реактивы: А) альфа-нафтол I,0 г; этанол I00,0 мл; Б) Диметил-пара-фенилендиамин хлорид (или оксалат) 2,0 г; вода I00,0 мл. Реактивы хранить раздельно в холодильнике, смешивать небольшими порциями непосредственно перед употреблением. Способы применения те же, что в п.3.I.I. Результат – при положительной реакции колония или микробная масса на фильтровальной бумаге приобретает синий (ультрамариновый) цвет.

3.I.3. Реакция оксидазы по Ковачу рекомендована специально для неферментирующих микроорганизмов; реакция цитохромоксидазы по Гэби и Хедли – как для неферментирующих, так и преимущественно для ферментирующих микроорганизмов (аэромонад, плезиомонад, вибрионов). В СССР распространен в основном метод Гэби и Хедли (цитохромоксидаза), неправильно трактуемый некоторыми как реакция оксидазы, хотя последний термин должен быть применен к реакции с тетраметил-пара-фенилендиамином. Некоторые микроорганизмы дают различные реакции с тем и другим реактивом (см.таблицу I).

3.2. В некоторых случаях возникает необходимость определить принадлежность изучаемой культуры к грамотрицательной группе. С

Таблица № I.

Систематизированная идентификация грамотрицательных неферментирующих цитохромоксидаза-отрицательных микроорганизмов.

Микроорганизмы	Основные ключевые признаки											Дополнительные призн.					
	Цитохромоксидаза	Оксидация/ферментация	Оксидация мальтозы	Подвижность	Желатиназа	Окисдация 10% лактозы	Нитратаза	Свободный азот	Утилизация С в минеральной среде с глюкозой	Утилизация С в минеральной среде с ацетатом натрия	Утилизация С в полноценной среде	Рост при 42°С	Утилизация сахарозы	Утилизация этанола	Гемолиз	Ацитиназа	Пигмент
Bordetella parapertussis	0	о/о	0	0	0	0	0	0	0	0	+			0			коричневый
Acinetobacter Brisou	0	о/о	0	0	0	0	0	0	0	+	+	Р+	0	+	0	Ре	
A.haemolyticus V.alcaligenes	0	о/о	0	0	+	Р⁰	0	0	0	-	+	Р+	0	+	+	+	
Acineto-acter anitratus	0	+/о	Р⁰	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	
A.haemolyticus v.haemoliticus	0	+/о	Р⁰	0	+	+	0	0	+	+	+	Р+	0	+	+	+	
Xanthomonas Bergey	0	+/о	о+	+	Р	0	0	0	0	0	+	0					желтый
Pseudomonas Xanthomonas/ maltophilia	0	Р/о	о+	+	+	0	Р⁰	0	0	0	+	0	+	0		+	желтый или 0
Flavobacterium meningosepticum	I)0	+/о	о+	Р⁰	+	±	0	0	0	0	+	0	0				2)0 желтый 0
Pseudomonas cepacia	I)0	+/о	о+	+	Р⁰	+	Р⁰	0	Р⁰	+	+	Р	+				желтый или лиловый
ферментирующие грамотрицательные микроорганизмы	Р	+/+				Р	А	З	Л	И Ч Н	Н	Е					

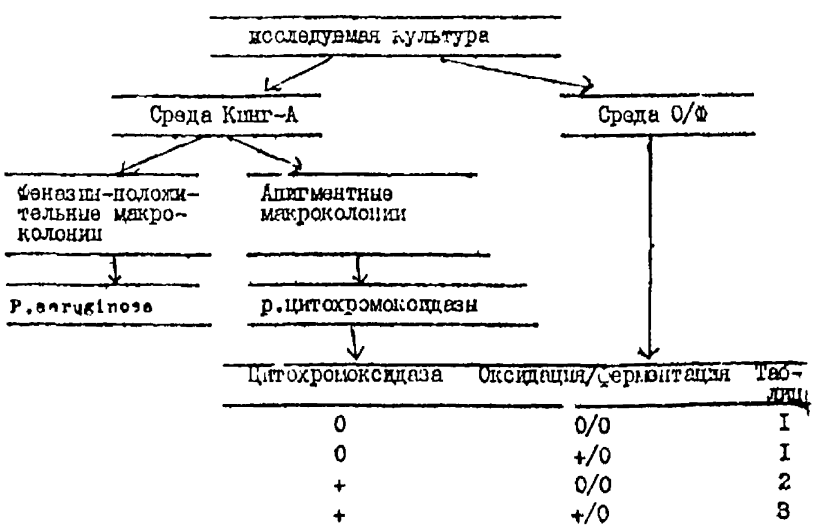
I) Реакция по Ковачу положительна; 2)Может быть замедленная ферментация. Р-различно; P^+-чаще положительно; P^0-чаще отрицательно.

этой целью, микробную массу с свежей агаровой культуры петлей вносят в 3% водный раствор КОН. Грамотрицательные микроорганизмы после нескольких секунд перемешивания массы в растворе ослизняются и за петлей тянутся трудно отрывающиеся нити. Этот феномен отсутствует у грамположительных микроорганизмов.

4. Систематизированные таблицы ключевых признаков НФМ.

4.I. Обоснование систематизации и подбора ключевых признаков. При отборе ключевых признаков были учтены основные, имеющие медицинское и санитарное значение, неферментирующие микроорганизмы. Лишь немногие из включенных в набор признаков у некоторых НФМ нестабильны, являясь реакциями в отношении других НФМ (например окоидации мальтозы, продукция свободного азота). Принятый набор обеспечивает надежную идентификацию большинства НФМ и лишь для уточнения некоторых необходимы дополнительные тесты.

4.2. Схема последовательной первичной идентификации неферментирующих микроорганизмов.



Цитохромоксидаза	Оксидация/ферментация	Таблица
0	0/0	I
0	+/0	I
+	0/0	2
+	+/0	3

4.3. Систематизация признаков выявила три основных группы НФМ:

I. Цитохромоксидаза-отрицательные, делящиеся на подгруппы

Ia. Не оксидирующие глюкозу (несахаролиты);

Iб. Оксидирующие глюкозу (сахаролиты).

2. Цитохромоксидаза-положительные, но не оксидирующие глюкозу.

3. Цитохромоксидаза-положительные, оксидирующие глюкозу (сахаролиты).

В подгруппах первой группы и в 2 и 3 группах дальнейшая дифференциация проведена по двум другим решающим ключевым признакам - оксидации мальтозы и подвижности. Комбинации этих четырех решающих ключевых признаков выявляют подгруппу третьего порядка, каждая состоит из немногих видов, дифференциация которых по остальным ключевым признакам и, в отдельных случаях, по дополнительным тестам, не составляет труда. (таблица 2, 3)

4.4. Пользование таблицами. Из п.4.I следует, что после получения чистой культуры НФМ с селективно-дифференциальной среды и отсева ее на среду Кинг-А для выявления и исключения из дальнейшего изучения феназин-образующих (пигментных). P.aeruginosa, рекомендуется посев макроколониями в чашке), определяется отношение к реакции цитохромоксидазы. Одновременно с посевом на среду Кинг-А производится посев в среду О/Ф. Эти два теста - р.цитохромоксидазы и окислительно-ферментативная реакция, позволяют определить принадлежность изучаемого микроорганизма к той или иной группе уже через сутки после инкубации при 35-37°С или через двое суток после инкубации при 30°С. Остальные ключевые признаки могут быть определены одновременно, но в целях экономии труда и сред предпочтительно на втором этапе выявить отношение к мальтозе, подвижность и характер роста на нитратной среде (при 42°С и при 35-37°С), учитывая дифузное помутнение среды при положительной нитратазной реакции, рост на поверхности среды в виде плотного

Таблица №2

Систематизированная идентификация грамотрицательных неферментирующих цитохромоксидаза-положительных несахарофилов.

Микроорганизмы	Основные ключевые признаки											Дополнительные признаки							
	Цитохромоксидаза	Оксидация/ферментация	Оксидация мальтозы	Подвижность	Делатиназа	Оксидация 10% лактозы	Нитрагаза	Свободный азот	Утилизация С в минеральной среде с глюкозой	Утилизация С в минеральной среде с ацетатом натрия	Утилизация С в полноценной среде	Утилизация этанола	Утилизация цитрата натрия	Оксидация ксилозы	Гемолиз	Уреаза	Свернутая сыворотка крови	Триптофан-деаминаза	Рост при 42° С
Moraxella atlantae	+	o/o	0	0	0	0	0	0	0	0	+		0		0				
Moraxella dietralis	+	o/o	0	0	0	0	0	0	0	+	+		+		0				
Moraxella osloensis	+	o/o	0	0	0	0	P	0	0	+	+	+	0		0				
Moraxella nonliquefaciens	+	o/o	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0		0		0	0	
Moraxella phenylpyruvica	+	o/o	0	0	0	0	P+	0	0	0	+	0	0		0		0	+	
Moraxella lacunata	+	o/o	0	0	+1)	0	+	0	0	0	+	P	0		0		+	0	
Moraxella bovis	+	o/o	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+			+		+	0	
Zoogloea filipendula	+	o/o	0	+	0	0	0	0	0	0	+		0						
Pseudomonas testosteroni	+	o/o	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0							0
Pseudomonas pseudoalcaligenes		o/o	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+							+
Pseudomonas acidovorans	+	o/o	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+	0						P°
Alcaligenes faecalis	+	o/o	0	+	0	0	P	P2)	0	+	+		+			0			
Bordetella bronchiseptica	+	o/o	0	+	0	0	I	0	0	0	+		+	0		+			
Achromobacter xylosoxidans	+	o/o	0	+	0	0	+	P	0	+	+		+	+		0			
Pseudomonas alcaligenes	+	o/o	0	+	P°	0	0	0	0	+	+	0	+			0			+
Pseudomonas diminuta	+	o/o	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+	0						P°

1) Только в средах, обогащенных сывороткой крови или солями жирных кислот /бутират, к-проат/. 2) Преимущественно свеже-выделенные.

Таблица № 3

Систематизированная идентификация грамотрицательных неферментирующих цитохромоксидазо-положительных сахаролитов

Микроорганизмы	Основные ключевые признаки														Дополнительные призн
	Цитохромоксидаза	Окисление/ферментация глюкозы	Окисление мальтозы	Подвижность	Желатиназа	Окисление 10% лактозы	Нитратаза	Свободный азот	Утилизация С в минеральной среде с глюкозо	Утилизация С в минеральной среде с ацетатом натрия	Утилизация С в полноценной среде	Рост при 42°С	Утилизация этанола	Золотистый блеск	Пигмент
Alcaligenes paradoxus	+	/0	0	+	0	0	P	0	+	+	+	0	+		
Alcaligenes odorans	+	/0	0	+	0	0	+	P[1]	+	+	+	0	0		
Pseudomonas paffiani	+	/0	0	+	0	0	0	0	+	+	+	0	+	0	Бледно-желтый
Pseudomonas mendocina	+	/0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	
Pseudomonas chlororaphis	+	/0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	
Pseudomonas aeruginosa	+	/0	0	P[2]	P	0	+	+	+	+	+	+	+	+	феназин или 0
Pseudomonas putida	+	/0	0	P	+	0	0	0	0	+	+	+	0	0	флуоресцеин
Pseudomonas fluorescens	+	/0	P	+	+	0	P	P	+	+	+	0	+	0	флуоресцеин
Pseudomonas flava	+	/0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	0	+	0	блекно-желтый
Paracoccus denitrificans	+	/0	+	0	0	0		+	+	+	+				
Alcaligenes aquamarinus	+	/0	+	+	0	0	0	0	+	+	+				
Zoogloea ramigera	+	/0	+	+	0	+	0	0	+	+	+				
Pseudomonas stutzeri	+	/0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	P		0	
Pseudomonas pseudomallei	+	/0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		0	оранжево-кремовый

1) Преимущественно- слабо-выделенные
2) Продуцирующие капсулу-неподвижные

кольца при отрицательной нитратазной реакции и продуцию свободного азота), после чего при некоторых комбинациях этих признаков становятся излишними остальные тесты, либо намечается необходимость в проведении лишь некоторых из них, а иногда и использование рекомендуемых дополнительных тестов.

4.6. При массовых исследованиях могут быть выявлены культуры, не укладывающиеся в предлагаемый набор признаков. В зависимости от обстоятельств, такие варианты подлежат дополнительному изучению (если это вызвано необходимостью), либо исключаются в тех случаях, когда с той же селективно-дифференциальной среды сняты другие колонии, полностью отвечающие той или иной комбинации ключевых признаков и, следовательно, идентифицируемых как той или иной НФМ.

5. Ориентиры основных неферментирующих микроорганизмов

5.1. Включенный в таблицы набор не исчерпывает обилия неферментирующих микроорганизмов, обитающих в окружающей среде. Отобрали лишь имеющие медицинское и (или) санитарное значение НФМ, а также сапрофиты или фитопатогены, от которых их нужно дифференцировать. Характеристика включенных в таблицы НФМ и их ключевые признаки даны в соответствии с литературными данными последних лет и на основании собственного материала. В таблицах представлены роды Pseudomonas, Acinetobacter Moraxella, отдельные представители родов Bordetella, Flavobacterium, Achromobacter, Alcaligenes, а также Zoogloea, Xanthomonas, Paracoccus. В таблицы не включены провизорные группы "М5" и "М6" в роде Moraxella, "Ид-1", "Ид-2", "Ид-3" (Agrobacter radiobacter) в роде Achromobacter, "ПУе", "ПУе-2" в роде Bordetella, как имеющие лишь единичные ключевые признаки, отличающие их от легализированных видов.

5.2. Род Pseudomonas включает 265 видов, из которых по основным свойствам охарактеризовано 32, не считая фитопатогенных и морских псевдомонад. В таблицы включены наиболее часто встречающиеся и имеющие медицинское значение или симулирующие их I0 видов сахаролитов и 6 несахаролитов. Наибольший интерес представляет группа флуоресцирующих псевдомонад - P.aeruginosa P.fluorescens и P.putida, которые дифференцируются на основании ключевых признаков - глубокой редукции нитратов-нитритов с освобождением свободного азота при 42°С и при 35°С, желатиназной реакции, росте на средах Кинг-А и "блеск". Эти же тесты, как и некоторые дополнительные, могут служить ориентиром после определения основных ключевых признаков - р.цитохромоксидазы, окисдации глюкозы и мальтозы, и для остальных представителей рода.

5.3. Acinetobacter calcoaceticus. В практических целях удобнее изменить номенклатуру этого единственного вида рода Acinetobacter, считая его подвиды за самостоятельные виды: A.lwoffi, A.anitratus, A.haemolyticus (с двумя вариантами - haemolyticus и alcalifaciens). Все они цитохромоксидаза-отрицательны, неподвижны, утилизируют в минеральной среде этанол и, в зависимости от вида, глюкозу и (или) ацетат натрия. Ключевые признаки для A.anitratus - окисдация I0% лактозы, для A.haemolyticus - гемолиз, гидролиз желатина и продукция лецитиназы, для A.lwoffi - отсутствие всех этих свойств, но способность утилизировать ацетат натрия и этанол в минеральной среде.

5.4. Род Moraxella представлен 7 видами. Общие ключевые признаки: р.цитохромоксидазы положительна, подвижность и окисление глюкозы и других углеводов отсутствует. M.osloensis и M.urethralis способны утилизировать ацетат натрия в минеральной среде без дополнительных ростовых факторов, различаясь по способ-

ности ассимилировать цитрат натрия, а M.atlantae не утилизирует ни тот, ни другой источник С. M.bovis и M.lacunata расщепляют желатин, но последняя для проявления этой активности требует добавления к среде кровяной сыворотки или солей жирных кислот с высоким содержанием атомов углерода (бутират, капрат). M.bovis обладает выраженной гемолитической активностью, а при использовании "шоколадного" агара гемолитическую активность проявляет и M.lacunata, которая, в отличие от M.bovis продуцирует нитратазу, как и M.nonliquefaciens и в меньшей степени M.phenylpyruvica. Последняя дезаминирует фенилаланин и триптофан. Спорным является наличие фенилаланин-дезаминазы у M.urethralis. И, наконец, M.bovis и M.lacunata разжижают свернутую кровяную сыворотку. Провизорная группа "М5" будучи сходной с M.osloensis по большинству ключевых признаков, отличается по отсутствию способности утилизировать ацетат натрия в минеральной среде. Группа "М6" отличается от прочих видов моракселл по отсутствию каталазы.

5.5. Achromobacter xylosoxidans, входящий в группу цитохромоксидаза-положительных несахаролитов, единственный в этой группе ферментирует ксилозу, особенно четко при 10% концентрации последней. Провизорные группы этого рода "Vd-1", "Vd-2" и "Vd.3" (Agrobacter radiobacter) отличаются от A.xylosoxidans по энергичной уреазной активности, последние две по оксидации сахарозы, мальтозы и маннита.

5.6. Flavobacterium meningosepticum отличается от сходной с ним по другим признакам Pseudomonas cepacia по отсутствию оксидации сахарозы, а от сходных видов рода Achromobacter и провизорной группы „I" по оксидации маннита. Для этого НЗМ, как и для P.maltophilia и P.cepacia характерно двоякое отношение к оксидазной реакции: они положительны по оксидазе и отрицательны по цитохромоксидазе.

5.7. Виды рода Bordetella , в зависимости от цитохромоксидазной реакции расположены в первой и второй таблицах. Отличия их от сходных НКМ других родов даны в таблицах. Вид B.pertussis исключен из таблиц, как требующий особых методов культивирования. Для B.bronchiseptica характерна высокая уреазная активность (гидролиз мочевины в первые 4 часа инкубации) и отсутствие утилизации цитрата натрия в минеральной среде (потребность в дополнительных факторах роста), в отличие от провизорной группы "IУ-2э", ассимилирующей цитрат натрия. Провизорная группа "IУэ" отличается от B.bronchiseptica по редукции нитрата до образования свободного азота.

5.8. Наиболее распространенный и изученный вид рода Alcaligenes - A.faecalis , отличается от сходных с ним P.acidovirans по утилизации цитрата натрия, а от B.bronchiseptica по отсутствию уреазной активности. Виды A.odorans и A.liquefaciens объединены в таблице 2 с A.faecalis , поскольку ключевыми признаками этих видов (по Bergey - синонимов A.faecalis служат нитратазная активность и выделение при редукции нитрата. (A.denitrificans) или нитрита (A.odorans) свободного азота. Однако, нитратаза обнаружена и у 43-62% A.faecalis свежевыделенные штаммы которого могут также выделять свободный азот. Виды A.paradoxus , A.eutrophus и A.aquamarinus необычны по оксидации глюкозы, а последний и мальтозы, и включены в таблицу 3 как подлежащие дальнейшему изучению с позиций их принадлежности к роду Pseudomonas (сходство в строении ДНК).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целях облегчения идентификации выделяемых при исследованиях объектов окружающей среды грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов (НФМ), представляющих медицинский (эпидемиологический) и санитарный (гигиенический) интерес, предлагаются наиболее существенные ключевые признаки, систематизированные по основным решающим ключовым признакам на группы: I. Цитохромоксидаза-отрицательных НФМ; 2. Цитохромоксидаза-положительных не оксидирующих глюкозу (несахаралитов) НФМ и 3. Цитохромоксидаза-положительных, оксидирующих глюкозу (сахаралитов) НФМ, с подразделением в каждой группе на основе оксидации мальтозы и подвижности на подгруппы и с последующим использованием других ключевых признаков. Применение такой систематизированной идентификации, основанной на небольшом наборе тестов, позволит ориентироваться в большом количестве разнообразных по своим свойствам НФМ и дифференцировать их от сапрофитарных и хемолитотрофных НФМ, обитающих в воде и почве.

Достаточность данного набора ключевых признаков для идентификации основных, имеющих медицинское и санитарное значение неферментирующих микроорганизмов, обоснована изучением большого количества штаммов НФМ, выделенных на протяжении трех лет из воды поверхностных водоемов, сточных жидкостей и объектов окружения больных в лечебных учреждениях.

Ограниченный набор предназначенных для идентификации НФМ методов и питательных сред, не требующих специального лабораторного оборудования, дефицитных, импортных или дорогостоящих реактивов и материалов, может быть использован не только в лабораториях научно-исследовательских институтов и кафедр гигиенического и эпидемиологического профиля, но и в санитарно-эпидемиологических станциях по соответствующим показаниям.

Д 11478-1 от 20 II Объем п. л. № 1856 Тир 300
Типография Министерства здравоохранения СССР

gost.e-ecolog.ru