



МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ
ВЕТЕРИНАРИИ
(с Государственной ветеринарной
инспекцией)

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

от _____ № 115-62

Москва



УТВЕРЖАЮ

Начальник Главного управления
ветеринарии Министерства
сельского хозяйства СССР

А.Д.Третьяков

30 декабря 1983 г.

По бактериологическому ис-
следованию молока и секрета
вымени коров

I. Общая часть

I.1. Настоящие Методические указания определяют методы и сроки исследования молока и секрета вымени коров; являются обязательным минимумом для ветеринарных лабораторий и диагностических отделов НИВС и НИВМ при диагностике мастита коров.

I.2. Приведенный в настоящих Указаниях набор питательных сред, применяемых при бактериологическом исследовании, является минимальным; сроки для каждого исследования (сообщения их результатов и заключений) считаются предельными.

I.3. Исследования молока (секрета) коров в ветеринарных лабораториях выполняют в порядке его поступления.

В целях равномерной загрузки лабораторий массовые исследования на мастит проводят по соответствующему календарному плану, согласованному с главным ветеринарным врачом района.

I.4. О результатах исследования лаборатории должны сообщить организациям, учреждениям, хозяйствам и предприятиям, приславшим материал, не позднее, чем в сроки, установленные настоящими указаниями.

В заключении указывается название возбудителя, его чувствительность к антибиотикам и рекомендации по лечению. В необходимых случаях дают указания о присылке материала для дополнительного исследования.

2. Специальная часть

2.1. Правила отбора проб молока (секрета)

2.1.1. Отбор проб молока сборного и подготовку его к исследованию проводят по ГОСТ 3622-68 и ГОСТ 13928-68.

2.1.2. Для бактериологического исследования молока на мастит отбирают пробы из четвертей вымени, реагирующих на быстрый маститный тест — мастидин или димастин и дающих положительную пробу отстаивания.

Пробы отбирает ветеринарная служба хозяйства один раз в месяц в период лактации и по мере запуска коров.

2.1.3. Молоко (секрет) для бактериологического исследования на мастит отбирают из четверти вымени с соблюдением правил асептики. Для этого перед взятием пробы молока соски вымени коров и руки дояров протирают ватным тампоном, смоченным 70% спиртом (этиловым или денатурированным), и отбирают в конце дойки 5-10 мл альвеолярного молока. При взятии пробы следят за тем, чтобы сосок не касался края пробирки. При повторном взятии пробы с целью подтверждения диагноза на мастит могут быть использованы как цистернальное, так и альвеолярное молоко.

2.1.4. Для выявления бактерионосителей среди животных, предназначенных для комплектования стада фермы и комплексов, отбирают пробы цистернального молока после сдаивания первых 2-3 струек.

2.2. Правила доставки проб

2.2.1. Пробы молока после их отбора доставляют в лабораторию так, чтобы оно не смачивало пробки. Доставка должна осуществляться в течение 3-4 часов с момента взятия проб в специальных емкостях, обеспечивающих температуру не выше 8-10°C, или в термосах со льдом.

2.3. Проведение исследований секрета на наличие возбудителей мастита

2.3.1. Пробы молока на наличие возбудителей мастита исследуют сразу после доставки их в лабораторию. Оставшееся молоко хранят при температуре не выше 6°C.

2.3.2. Посев молока проводят на МПА с 5% цитратной крови крупного рогатого скота (рецепт I) и на дифференциально-диагностические среды с целью выделения золотистого стафилококка,

стрептококков различных серологических групп, эшерихий, синегнойной палочки, грибов рода *Candida*.

2.3.3. При первичном обследовании стада, особенно с большим поголовьем или с большим процентом выделения коров с раздращениями вымени, рекомендуется взятые образцы молока с соблюдением правил асептики из реагирующих четвертей вымени, высевать на мясопептонный агар с 5% крови крупного рогатого скота. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37⁰С в аэробных условиях в течение 24 часов. В случае отсутствия роста посевы выдерживают еще 24-48 часов.

2.3.4. Для идентификации выросших культур изучают и культуральные свойства. Крупные выпуклые колонии, вне зависимости от наличия зоны гемолиза, ориентировочно относят к стафилококкам; мелкие розоватые - к стрептококкам; серые круглые колонии блестящие плоские обычно указывают на рост бактерий группы кишечной палочки. Появление колоний с зеленым оттенком дает основание предполагать наличие синегнойной палочки.

Слизистые гладкие или матовые колонии характерны для споровой микрофлоры, что свидетельствует о загрязнении молока при отборе пробы.

2.3.5. Из колоний, одинаковых по морфологическим свойствам, делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

При исследовании молока на наличие возбудителей мастита могут быть использованы также элективные среды.

Для выделения золотистого стафилококка - ДНК азно-новокаиновый агар, солевой агар, для стрептококков - среда Карташовой, для бактерий группы кишечной палочки - среда КОДА, для псевдомонад - МПБ, для грибов рода *Candida* - среда элективная дифференциально-диагностическая.

2.3.6. С целью исключения выделения случайных микроорганизмов, исследование образцов молока через 5-7 дней повторяют с применением элективных сред.

К возбудителям мастита относят бактерии с идентичными культуральными свойствами, которые выделены при повторном исследовании.

2.3.7. Допускается также производить первичный высеv молока при обследовании стад на мастит на вышеуказанные среды в два этапа: в начале на среды для выделения золотистого стафилококка и стрептококков, так как им принадлежит преимущественная роль

при возникновении мастита микробной этиологии. В случае получения отрицательных результатов, пробы высевают через 24 часа на другие питательные среды.

2.3.8. Выделение золотистого стафилококка

2.3.8.1. Для выделения и количественного учета золотистого стафилококка из молока от одного животного (из удоя или отдельных четвертей вымени), а также из сборного молока и молочных продуктов используют ускоренный метод, который основан на применении селективной, дифференциально-диагностической среды - ДНК - новокаинового агара (рецепт 2).

Селективные свойства среды обусловлены ингибирующим действием на постороннюю микрофлору новокаина, дифференцирующие - добавлением натриевой соли дезоксирибонуклеиновой кислоты, позволяющей идентифицировать золотистый стафилококк по его дезоксирибонуклеазной активности.

Проведение исследований. Из доставленных проб молока готовят разведения 1:10 и 1:100 на стерильном физиологическом растворе.

В чашку Петри с ДНК - новокаиновым агаром (рецепт 2) вносят 0,1 мл молока из разведения 1:100 и равномерно распределяют стеклянным шпателем по всей поверхности питательной среды.

Засеянные чашки помещают в термостат крышками вниз и инкубируют при 37-38° в течение 22-24 часов. На ДНК - новокаиновом агаре золотистый стафилококк растет в виде крупных круглых колоний с ровными краями.

Для выявления ДНК-азной активности золотистого стафилококка поверхность среды в чашках с выросшими культурами заливают 5-7 мл 1 N раствора соляной кислоты. Чашки с кислотой выдерживают 2-3 минуты, за которые вокруг колоний образуются круглые зоны просветления. Затем кислоту осторожно сливают и приступают к учету результатов исследования. В том случае, если культура стафилококка была выделена на кровяном агаре, то ДНК-азная активность может быть определена путем пересева на ДНК-агар (рецепт 4)

Определение ДНК-азной активности может быть проведено при выращивании изолированной культуры.

Учет результатов исследования. Чашки просматривают в проходящем свете. Обнаружение колоний, окруженных зоной просветления

с четкими границами, указывает на наличие в исследуемом материале золотистого стафилококка.

Для определения количества золотистого стафилококка в 1 мл исследуемого материала подсчитывают колонии с зонами просветления по всей поверхности среды, и полученное число колоний умножают на 10 (т.к. высевали 0,1 мл) и на степень разведения материала.

Например: Высеяно 0,1 мл молока из разведения 1:100.

В результате подсчета получено 15 колоний.

Следовательно в 1 мл молока - 15000 микробных клеток золотистого стафилококка ($15 \times 10 \times 100$).

2.3.8.2. При высеве образцов на кровяной агар учитывают рост выпуклых колоний с гладкой или шероховатой поверхностью, в которых при микроскопии обнаружены грамположительные кокки, расположенные в виде гроздеподобных скоплений, тетрадами или одиночно, выделенную культуру относят к стафилококкам и проверяют на каталазную активность. Для этого часть колоний растирают в капле 10%-ной перекиси водорода, нанесенной на предметное стекло. Каталазоположительные стафилококки содержат фермент каталазу, которые при контакте с перекисью водорода образуют интенсивное газообразование. Одновременно по изменению кровяного агара учитывают гемолитические свойства стафилококков. На кровяном агаре с эритроцитами крупного рогатого скота растут стафилококки, обладающие α -гемолитическими свойствами (прозрачная зона вокруг колоний), β -гемолитическими свойствами (матовая зона гемолиза), чаще со смешанным α, β -гемолизом; иногда зона гемолиза отсутствует.

2.3.8.3. Для определения плазмокоагуляции стафилококков, делают высев полученной культуры в пробирки с мясо-пептонным бульоном и через 3 часа выращивания в термостате при 37°C ставят реакцию плазмокоагуляции с цельной или сухой плазмой крови кролика.

Плазму крови кролика разводят стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:5 и разливают в агглютинационные пробирки по 0,5 мл. Бульонную культуру стафилококка по 0,1 мл (2 капли) вносят в пробирки с разведенной плазмой. Для контроля в одну пробирку с плазмой не вносят культуру, а в другую - засевают заведомо плазмокоагулирующий стафилококк. Пробирки поме-

щают в термостат при 37°C и через каждый час в течение трех часов, затем через 18 и 24 часа учитывают результаты.

При положительной реакции плазмокоагуляции образовавшийся сгусток не выпадает из пробирки при наклоне или плавает в плазме.

2.3.8.4. Определение отношения к манниту в анаэробных условиях. 3–4 капли испытуемой бульонной культуры стафилококка высевают в пробирку с 0,15%-ным полужидким агаром, содержащим 0,5% маннита и индикатор Андресе, под вазелиновым маслом (рецепт 5). Посевы инкубируют при температуре 37°C . Результат учитывают через каждые 24 часа. Окончательный результат через 5 суток. Изменение цвета индикатора (появление розового окрашивания) указывает на ферментацию маннита в анаэробных условиях, что является дифференцирующим характерным признаком для золотистого стафилококка.

2.3.8.5. Фаготипирование стафилококка.

Постановка реакции. Поскольку фаги высушивают в объеме 0,1 мл, то при добавлении 1 мл МПБ (с 0,4% глюкозы и 0,2% CaCl_2) получают основное разведение 10^{-1} (1:10). Из этого основного разведения готовят два рабочих разведения, соответствующие 1 тест-разведению (ТР) и 10ТР . Разведение, соответствующее 1 ТР, указано на этикетке фага.

Бактериофаги в жидком состоянии следует хранить при температуре 4°C . Основное разведение фагов 10^{-1} при таком способе хранения можно использовать в течение 1,5–2 месяцев. Разведение, соответствующее 1 ТР, следует готовить заново каждые 7 дней из основного разведения 10^{-1} .

Методика фаготипирования. Суточную агаровую культуру испытуемого штамма засевают в 2,5 мл бульона Хоттингера, Мартена или мясо-пептонного бульона (рН 7,2–7,4) и выращивают 3–4 часа при 37° (до появления заметной мути). Одновременно готовят чашки с 1,2%-ным агаром, приготовленным на бульоне Хоттингера, содержащего 200 мг аминного азота, 0,4% глюкозы и 0,02% CaCl_2 (рецепт 6)

По 25–30 мл расплавленного агара разливают в чашки Петри и после застывания его подсушивают 30–40 минут при 37° . Выросшую трехчасовую бульонную культуру стафилококка вносят пастеровской пипеткой в чашки и орошают поверхность агара. Избыток культуры отсасывают пипеткой и удаляют, агар вновь подсушивают 30–40 минут при 37° .

Дно засеянной чашки расчерчивают карандашом на квадраты по графариету соответственно числу используемых фагов и в каждый квадрат засеянной среды пастеровской пипеткой с тонко оттянутым концом вертикально наносят каплю соответствующего фага. Один квадрат оставляют для контроля без фага. После нанесения каждого фага пастеровскую пипетку выбрасывают. После подсыхания капель фага чашки переворачивают вниз и инкубируют 5-7 часов при температуре 37°, а затем оставляют на 18-20 часов при комнатной температуре. Для нанесения фагов на чашки с агаром может быть использован специальный аппарат для фаготипирования стафилококков. Аппарат состоит из 25 металлических стержней, вмонтированных в квадратную пластинку, соединенную с поршнем. Основанием прибора служит площадка из органического стекла, на которой находится свободно передвигающаяся вторая площадка с гнездом для фиксации засеваемой чашки и пластинки из фторопласта с резервуаром для фагов. В резервуары стерильной фторопластовой пластинки, помещенной в стерильную чашку Петри, наливают по 3-5 капель фагов (всегда в одном порядке). Чашку с агаром и пластинку с фагами помещают на подвижную пластинку. Поочередным передвижением площадки устанавливают под металлическими стержнями сначала пластинку с фагами, а затем чашку с агаром. Опуская и поднимая стержни с помощью поршня, переносят капли фагов на чашку с агаром, едва касаясь его поверхности. Чашки меняют в зависимости от числа типлируемых культур.

Чашки с фагами оставляют на столе на 30-40 минут и затем их орошают 4-часовой бульонной культурой стафилококков. После подсыхания культур чашки переворачивают крышкой вниз и инкубируют 18-20 часов при 30°C или 5-6 часов при 37°C и оставляют до следующего утра при комнатной температуре.

Фаготипирование штаммов начинают с I TP (тест-разведения). Штаммы, которые не лизировались хотя бы одним фагом, на следующий день типируют повторно со I00 TP.

Учет и регистрация результатов. Степень лизиса культуры разными разведениями фага регистрируют по следующей схеме: (++++) - сливной полный лизис, (+++) - полусливной лизис (незначительный рост культуры в зоне лизиса), (++) - наличие в месте нанесения капли фага свыше 50 пятен лизиса, (+) - от 20 до 50 пятен лизиса, (-) - полное отсутствие лизиса. Для упрощения схемы учета степени лизиса обозначения +++, ++ и называемые "сильной реакцией", можно регистрировать одним обозначением ++.

Штамм считается типизируемым, если хотя бы один фág вызвал сильную реакцию. Если при типировании культуры фáгом I TP получены только слабые реакции или лизис полностью отсутствует, то такой штамм типизируют повторно фáгом в IOO TP или считают нетипизируемым, (если его типировали IOO TP). Результаты типирования регистрируют, записывая против названия штамма разведение фáгов, с помощью которых был получен положительный результат (I TP или IOO TP), а также номера фáгов, обусловивших сильную реакцию. Отдельно в скобках следует записать наличие слабых реакций, если таковые имелись.

Стафилококковые штаммы чаще лизируются не одним, а несколькими фáгами, что дает для каждого штамма характерную фáгомозаику.

Если культуры стафилококка при типировании в один и тот же день дают мозаики, различающиеся на одну сильную реакцию, их следует считать идентичными; если разница составляет две и более сильные реакции, штаммы следует признать разными.

2.3.8.6. Оценка результатов.

Стафилококки, обладающие гемолитической активностью, плазмокоагулирующими свойствами, разлагающие маннит в аэробных и анаэробных условиях, фáготипизуемые относят к золотистым - *Staph. aureus*

Срок лабораторного исследования идентификации стафилококков - 3 дня, при необходимости фáготипирования и определения отношения к манниту - 5 дней.

2.3.9. Выделение стрептококков.

2.3.9.1. Для выделения стрептококков используют среду Карташовой (рецепт 7), на которую высевают I мл исследуемого молока или пересевают выросшие на кровяном агаре росинчатые колонии. После 18-24 часов инкубирования посевов при 37°С из пробирок с измененным цветом среды делают мазки и окрашивают их по Граму.

2.3.9.2. Одним из отличительных признаков бактерий рода стрептококков от стафилококков является каталазная активность. Стрептококки - каталазоотрицательные, не содержат фермент-каталазу. Для определения каталазной активности исследуемую культуру отвивают на косячок сыровоточного агара (рецепт 8), выращивают в течение 24-48 часов. Выросшую культуру снимают петлей и растирают в капле 10%-ной перекиси водорода (перегидроль разводят в соотношении 1:3) на предметном стекле. Выделение газа, в отличие от стафилококков, у стрептококков не наблюдается.

2.3.9.3. Наличие гемолитических свойств стрептококков определяют путем посева на кровяной агар (рецепт I), который используют одновременно и для определения гемолитических свойств стафилококков. Большинство выделяемых из молока стрептококков дают непрозрачную (матовую) зону гемолиза. Дальнейшую идентификацию стрептококков ведут по таблице (приложение 2). Для определения свойств устойчивости к желчи культуру стрептококков выращивают предварительно на МПБ с 1% глюкозы (рецепт 9), а затем вносят 1 мл культуры в пробирки с 5 мл МПБ, содержащего 40% желчи (рецепт 10) и ставят в термостат при температуре 37°C на 24 часа. Полное просветление бульона указывает на лизис культуры, помутнение – на рост. Терморезистентность стрептококков определяют путем прогрева бульонной культуры стрептококка при 60°C в течение 30 минут. Пробирки с бульонной культурой ставят в водяную баню с указанным температурным режимом. После прогрева культуру высевают на МПБ и инкубируют в термостате в течение 24–48 часов. Наличие роста в бульоне указывает на терморезистентность культуры. Кроме того, проверяется способность роста на МПБ с содержанием 0,5% сорбита и на МПБ с рН 9,6.

2.3.9.4. Для определения способности культуры обесцвечивать метиленовый голубой производят посев культуры в пробирку с молоком, содержащим этот индикатор в концентрации 1:1000 (рецепт II). Посевы инкубируют в термостате в течение 24 часов при температуре 37°C.

2.3.9.5. Постановка КАМП-теста. Суточную культуру β -гемолитического стафилококка высевают на агар с 5% крови крупного рогатого скота (рецепт I). Посев делают петлей сплошной линией по диаметру чашки. Перпендикулярно к линии посева стафилококка, не доходя 5–6 мм, высевают ровным штрихом испытуемую культуру стрептококков. На одной чашке можно проверить 3–10 культур. Чашки помещают в термостат на 24 часа при 37°C. КАМП-тест считают положительным, если четко выражена зона гемолиза испытуемого стрептококка в виде усеченного треугольника или полукруга в зоне β -гемолитического стафилококка. При необходимости серологической идентификации выделенных штаммов стрептококков, последние направляют в научно-исследовательские учреждения.

Оценка результатов исследований производится по таблице приложения-2
Срок лабораторного исследования на стрептококк – 3 дня.

2.3.10. Выделение бактерий группы кишечной палочки (БГКП)

Образцы молока или колоний с кровяного агара, морфологические свойства которых напоминают БГКП, высевают на среду КОДА (рецепт 12) и помещают в термостат при 37°C на 24 часа. Изменение цвета среды из фиолетового в зеленый свидетельствует о наличии в пробах молока БГКП. Для идентификации бактерий рода эшерихий производят посев из пробирок с измененным цветом на среду Симмонса (цитратный тест) и пептонную воду (для реакции на индолообразование). На среде Симмонса эшерихии не растут, а следовательно не изменяют цвета. При определении индолообразования покраснение фильтровальной бумаги, пропитанной реактивом Эрлиха-Бома, находящейся в пробирках с посевами на пептонной воде, свидетельствует о наличии эшерихий, в классической реакции – образование розового (индольного) кольца на границе двух жидкостей: эфирной вытяжки и реактива Эрлиха-Бома.

Посевом со среды КОДА на среду Олькеницкого (рецепт 13) можно идентифицировать эшерихий, бактерий рода энтеробактер от сальмонелл и протей.

Посев на среду Олькеницкого в пробирках производят петлей по поверхности скоса среды и внутрь столбика. Посевы культивируют в термостате при 37°C в течение 24 часов. Изменение цвета (глюкоза + лактоза +) столбика и скоса среды Олькеницкого из красного в желтый при отсутствии почернения внутри столбика свидетельствует о росте бактерий из рода эшерихий. Изменение скоса среды и столбика в малиновый цвет (мочевина +) и почернение внутри столбика (сероводород +) указывает на рост протей. Изменение скоса в красный, столбика в желтый цвет и почернение внутри столбика указывает на рост сальмонелл.

В случае необходимости дальнейшей идентификации БГКП следует пользоваться таблицей приложения 3. Срок лабораторного исследования – 3 дня.

2.3.11. Выделение *Pseudomonas aeruginosa*

Образцы молока или колонии с кровяного агара, при микроскопии которых обнаружены грамтрицательные палочки, высевают на МПА и МПБ, культивируют в термостате при 37°C в течение 24–48 часов. Появление сине-зеленого окрашивания МПБ и МПА, рост гладких плоских колоний с ровными или изрезанными краями указывает на рост синегнойной палочки. *Pseudomonas aeruginosa* вырабатывает сине-зеленый пигмент пиоцианин, за счет которого происходит окра-

шивание питательных сред. Имеются отдельные виды синегнойной палочки, которые не вырабатывают пиоционин. *Pseudomonas aeruginosa* не всегда активно вырабатывает пигмент. Пигментообразование можно наблюдать лишь на 2-3 сутки. Поэтому посеvy на МПБ и МПА следует дополнительно просматривать через 48-72 часа. Сине-зеленое окрашивание МПБ лучше проявляется, если пробирку с МПБ встряхнуть и обеспечить доступ кислорода.

Из МПБ и МПА делают мазки и окрашивают их по Граму. *Pseudomonas aeruginosa* представляет собой короткую, тонкую грамотрицательную палочку.

При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек и изменение цвета сред в сине-зеленый ставят реакцию для обнаружения пиоционина. Для этого в пробирку с МПБ добавляют 1 мл хлороформа, пробирку встряхивают, хлороформ приобретает зеленый цвет и опускается на дно.

У пигментообразующих сапрофитных бактерий в хлороформе пигмент не растворяется.

Принадлежность выделенной культуры к *P. aeruginosa* подтверждают следующими признаками. Синегнойная палочка может расти при температуре от +15 до +43°C, способна расти при пересеве в физиологическом растворе, вызывает гидролиз желатинy, свертывание молока, не растет на среде Китт-Тарощи, не ферментирует углеводы за исключением глюкозы, индол не образует, выделяет аммиак, гидролизует мочевины. Реакция на каталазу - положительная.

Срок лабораторного исследования - 3 дня.

2.3.12. Выделение и идентификация грибов рода *Candida*

Из доставленных в лабораторию проб молока делают высевы по 0,1-0,3 мл на чашки Петри со средой (рецепт I4). Посевы делают на 2 чашки Петри. Высеванный материал равномерно, не повреждая среды, растирают по всей поверхности ее стерильным шпателем, делая круговое движение.

Засеванные чашки помещают в термостат вверх дном при температуре 37°C на 18-20 часов.

Контролем служит посев культуры этого гриба на ту же самую селективную дифференциально-диагностическую среду.

После инкубации чашки Петри просматривают и проводят второй этап микологического исследования. Для чего проводят микроскопию окрашенных препаратов по Граму или другим методом для проверки

чистоты культуры и изучения морфологии, а также пересев из колонии в пробирки на ту же самую среду для выделения чистой культуры и выявления псевдомонеллы. Чашки Петри с выросшими культурами оставляют далее при комнатной температуре. Засеянные пробирки выдерживают при 37°C 24 часа, затем оставляют на 2 суток при комнатной температуре (18–22°C). После этого выросшие колонии микроскопируют.

Первичный учет результатов делают через 20 часов инкубации материала, а окончательный учет — на 4-й день исследования.

Для идентификации грибов до рода достаточно определения псевдомонеллы. В большинстве случаев псевдомонеллы на селективной дифференциально-диагностической среде определяет через 20 часов путем микроскопии окрашенных препаратов, а когда это не удается, на 4 день исследования. Кроме псевдомонеллы обнаруживают почкующиеся клетки (споры, истинный мицелий, а иногда и хламидоспоры).

Колонии грибов рода *Candida* гладкие, морщинистые, плоские, беловато-серые, кремо-беловатые, кремовые, мягкой консистенции, кожистые.

Срок лабораторного исследования — 4 дня.

2.3.13. Определение чувствительности выделяемых микроорганизмов к антибиотикам.

Для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам должны быть использованы:

- МПА или агар Хоттингера-рецепт I5 (для стафилококков, кишечной палочки, псевдомонад);
- сывороточный МПА-рецепт I0 (для стрептококков).

Добавление сыворотки обеспечивает рост стрептококков

Сыворотку вносят в расплавленный и охлажденный до 37°C МПА.

Среду разливают по 20 мл в стерильные чашки Петри, расположенные на горизонтальной поверхности.

Выделенные культуры выращивают на одной из указанных сред, смывают стерильным физиологическим раствором и готовят бактериальную взвесь с концентрацией 1 млрд микробных тел в 1 мл. Это соответствует I0 ед. по оптическому стандарту.

На поверхность среды наливают 1 мл взвеси культуры, орошают ею всю поверхность. Наклонив чашку, излишек культуры отсасывают пастеровской пипеткой. Чашки с посевами подсушивают при комнатной температуре в течение 40 минут, после чего на поверхность засеянной среды накладывают диски с антибиотиками.

Диски раскладывают стерильным пинцетом на расстоянии 2 см от края чашки и слегка прижимают к агару. Каждая чашка может служить для испытания 5–6 видов антибиотиков.

Для лучшей диффузии антибиотика в агар чашки с засеянной культурой и разложенными дисками выдерживают в течение 2 часов при комнатной температуре, затем помещают в термостат при температуре 37°C вверх дном.

Результаты учитывают через 16–18 часов, для чего определяют линейкой диаметр зоны задержки роста микробов вокруг бумажных дисков, включая и размер дисков.

Отсутствие зоны задержки роста микробов вокруг диска указывают на то, что испытуемая культура не чувствительна к данному виду антибиотика.

2.3.14. Ускоренный (пробирочный) метод определения чувствительности микрофлоры молока к антибиотикам (метод ориентировочный, без выделения микроорганизмов).

Исследуемое молоко с соблюдением стерильных условий разливают по 2 мл в стерильные пробирки. Пробирок должно быть на две больше, чем дисков с антибиотиками.

В одной из пробирок определяют реакцию (рН) молока, добавляя в него 0,1 мл 0,5%-ного спиртово-водного раствора индикатора (0,5 г бромтимолблау растворяют в начале в 50 мл спирта, затем доливают 50 мл дистиллированной воды. В зависимости от рН молока смесь окрашивается от желтого, салатового, зеленого (кислое молоко) до синего цвета (щелочное молоко). Записав результат (цвет смеси), данную пробу исключают из опыта. В оставшиеся пробирки (кроме одной) добавляют по одному диску различных антибиотиков.

Все пробирки с молоком выдерживают при 37°C в течение 18–20 часов в термостате или автоматически регулируемой водяной бане, после чего во всех пробирках проверяют кислотность молока раствором бромтимолблау.

Если кислотность молока в пробирке без антибиотиков до опыта и после выдерживания в течение 18–20 часов в термостате одинакова, значит бактерий в молоке нет. При наличии микрофлоры кислотность молока в пробирке без антибиотиков после выдерживания в термостате увеличивается. В этом случае проверяется кислотность молока в пробирках с антибиотиками.

Если кислотность молока с тем или иным антибиотиком (после выдерживания в термостате) не выше первоначальной (до выдерживания в термостате), значит, бактерии, находящиеся в молоке, высокочувствительны к данному антибиотику. Если кислотность молока в пробирках с антибиотиками после выдерживания в термостате увеличивается, значит находящиеся в молоке бактерии устойчивы к данному антибиотику и причем выше кислотность молока, тем устойчивее микроорганизмы к антибиотику.

2.3.15. Определение количества соматических клеток в молоке.

2.3.15.1. Подсчет с помощью электронных счетчиков ("Культер", целлюскоп, "Фоссоматик").

2.3.15.2. Камерный метод.

Для подсчета соматических клеток в молоке используют счетную камеру Фукса-Розенталя. При отсутствии ее можно использовать камеру Горяева, Тома, Предтеченского, Бюркера.

Для растворения жировых шариков, в молоко добавляют солибилизирующий раствор, который готовят в следующем порядке. Синтанол ДС-10 расплавляют в водяной бане, отмеривают в колбу 1 мл, смешивают с 12,5 мл этилового спирта, добавляют 1 мл формальдегида и доливают 0,9%-ным раствором хлористого натрия до 100 мл. Полученный солибилизирующий раствор прогревают при 60°C в течение 20 минут, после чего добавляют 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина и фильтруют через бумажный фильтр. В связи с тем, что при длительном хранении краситель выпадает из раствора в осадок, его добавляют к солибилизирующему раствору непосредственно перед применением, а солибилизирующий раствор в герметическом сосуде сохраняется длительное время.

Для подсчета клеток в пробирки, содержащие 4,9 мл солибилизирующего раствора с красителем, добавляют 0,1 мл молока, тщательно перемешивают и прогревают 30 минут на водяной бане при 80°C. После перемешивания каплю жидкости вносят под притертое покровное стекло счетной камеры.

Подсчет клеток ведут под микроскопом при объективе 10x-20x. В поле зрения на прозрачном фоне видны четко окрашенные клетки, легко поддающиеся подсчету. Если при этом выявлено повышенное содержание соматических клеток в сборном молоке (от 500 тыс./мл до 1 млн. и более), то всех лактирующих коров стада исследуют на мастит по общепринятой схеме.

Подсчет клеток с помощью камеры Фукса-Розенталя проводят на площади всей камеры. Полученное количество клеток в камере умножают на коэффициент 15625, что соответствует количеству соматических клеток в 1 мл молока. При использовании камеры Горяева подсчет соматических клеток ведут в 100 больших квадратах. В этом случае полученное количество клеток умножают на коэффициент 125000.

2.3.15.3. Метод Прескота и Брида.

Чистое предметное стекло кладут на лист бумаги, расчерченный на квадраты, сторона квадрата 1 см. Пробу молока (секрета) тщательно смешивают, затем микропипеткой наносят на каждый квадрат предметного стекла 0,005 мл молока (секрета) и тщательно распределяют на площади квадрата. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом или спирт-эфиром (лучше изобутиловым спиртом) в ванночке при вертикальном положении мазка, окрашивают 15-20 минут по Романовскому-Гимза (на 1 мл дистиллированной воды 1-2 капли краски). Вместо метода Романовскому-Гимза можно окрашивать мазки по Ньюмансу раствором следующего состава: спирт абсолютный - 50 мл, ледяная уксусная кислота - 20 мл, хлороформ - 50 мл, фуксин основной - 0,1 г, метиленовая синь - 1,0 г. Краски растворяют в смеси спирта и хлороформа, нагретой до 50°. После охлаждения до комнатной температуры в раствор добавляют ледяную уксусную кислоту и выдерживают в течение 18 часов, а затем используют для окрашивания. После окрашивания препарат сушат и промывают трехкратно теплой водой (37-40°). Мазок тщательно высушивают и просматривают под микроскопом. В каждом мазке просматривают 100 полей зрения. Подсчитанное количество клеток умножают на коэффициент для подсчета с учетом объектива и окуляра (для микроскопа МБ-1 при объективе 90 и окуляре 7 этот коэффициент равен 6260; при окуляре - 10-10200; при окуляре 15 - 33200).

При содержании соматических клеток в 1 мл молока от 800 тыс. - 1 млн. и более, а также выделении патогенной микрофлоры животное считают подозрительным в заболевании маститом. Окончательный диагноз устанавливают на основании клинических признаков и других тестов (проба с димастинном, мастидином и проба отстаивания).

Приложение I

Рецепты питательных сред

Кровяной агар цитратный. (Рецепт I)

Для приготовления кровяного агара у здоровой коровы из яремной вены берут 250 мл крови в стерильную колбу, в которую предварительно вносят 50 мл стерильно приготовленного 5% раствора лимоннокислого натрия. По мере взятия кровь в колбе смешивают с лимоннокислым натрием путем встряхивания. Полученную цитратную кровь проверяют на стерильность путем посева на МПА и только после этого используют для приготовления кровяного агара. Цитратная кровь при необходимости может сохраняться в условиях холодильника в течение 10-14 дней. Мясопептонный агар расплавляют в колбе, затем охлаждают до 45°C и стерильной пипеткой вносят в него 10-15% цитратной крови, равномерно смешивая, после чего разливают в чашки Петри по 15 мл. Застывший агар помещают в термостат при температуре 37°C на 24 часа для проверки на стерильность.

Для приготовления кровяного агара может быть использована также дефибринированная кровь барана.

ДНК-новокаиновый агар (Рецепт 2)

К 150 мл расплавленного стерильного 2%-ного МПА (рН 8,6) добавляют 150 мг ДНК, предварительно растворенной в 10 мл (подсеченной 2 каплями 10%-ного раствора едкого натра) дистиллированной воды, и 3 г (2%) новокаина.

После перемешивания среду прогревают в течение 30 минут в кипящей водяной бане.

К остывшей до 45-50°C среде добавляют 7-8 мл (5%) сыворотки крови крупного рогатого скота и 1,2 мл 10%-ного раствора хлористого кальция, перемешивают и разливают в чашки Петри.

Примечание: ДНК-натриевая соль выпускается научно-производственным объединением "Биохимреактив" Латвийской ССР г.Слайне.

Дифференциально-диагностическая среда (Рецепт 3)

На 1 л дистиллированной воды берут: МПА - 15 г, пептон - 10 г, NaCl - 75 г, маннит - 10 г, фенол-рот - 0,025 г, рН - 7,4.

Агар с ДНК для определения ДНК-азной активности стафилококков. (Рецепт 4)

К 150 мл расплавленного 2%-ного МПА (рН 8,6) добавляют 150 мг ДНК, растворенной в 10 мл дистиллированной воды, с 2 каплями 10%-ного едкого натрия, среду прогревают 30 мин в кипящей водяной бане, затем охлаждают до 50-60°C и добавляют 1,2 мл 10%-ного стерильного хлористого кальция и 13-14 мл (8-9%) сыворотки КРС или 8 мл (5%) дрожжевого экстракта.

Среда Гисса для определения ферментативных свойств стафилококков. (Рецепт 5)

К полужидкой пептонной среде (1% пептона, 0,5% хлорида натрия, 0,15% агар-агара) рН 7,4, после ее расплавления, добавляют 0,5% маннита и 1% индикатора Андреде, перемешивают, разливают в пробирки по 10 мл. Стерилизуют при 0,5 атм 30 минут, после чего наслаивают стерильное вазелиновое масло высотой 1 см.

Среда для стафилококкового флага (Рецепт 6).

Для приготовления 1 л среды требуются: агар-агара - 12 г, гидролизата Хоттингера - 200 мл, свежей мясной воды - 400 мл, водопроводной воды - 400 мл, глюкозы - 4 г, хлористого кальция - 0,2 г (последний добавляют непосредственно к готовой расплавленной среде перед разливом ее в чашки Петри - 2 мл 10% стерильного раствора).

Среда Карташовой для выделения стрептококков. (Рецепт 7)

К 500 мл готового ^{стерильного} мясо-пептонного бульона добавляют 2,5 г лактозы, 1 мл спиртово-водного раствора 1:100 бромкрезолпурпура (после растворения 1 г порошка в 50 мл спирта добавляют 50 мл дистиллированной воды). Колбу со средой ставят в холодную водяную баню доводят до кипения и кипятят 5-7 минут. Охлаждают среду до 50-55°C и добавляют 50 мл сыворотки и 50 ЕД/мл неомипина. Среду разливают в стерильные пробирки по 50 мл.

Сывороточно-глюкозовый агар. (Рецепт 8)

МПА - 95 мл

Стерильная сыворотка лошади - 5 мл без консерванта

Глюкоза - 1 г

рН - 7,4.

Глюкозу вносят в МПА перед стерилизацией. Среду стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 минут. Перед внесением сыворотки агар расплавляют и охлаждают до 45°C, вносят асептически сыворотку, перемешивают и разливают в чашки или пробирки.

Глюкозный бульон. (Рецепт 9).

В 100 мл МПБ добавляют 1 г глюкозы среду стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 минут. pH среды должен быть 7,2-7,4.

Мясо-пептонный бульон с желчью. (Рецепт 10).

К 90 мл стерильного МПБ, pH 7,4, добавляют асептически 10 мл стерильной бычьей желчи, перемешивают, разливают в пробирки и стерилизуют при 0,5 атм 20 минут.

Молоко с метиленовым голубым. (Рецепт 11).

0,2 г метиленового голубого растворяют в 20 мл горячей дистиллированной воды, раствор пропускают через бумажный фильтр и стерилизуют при 0,5 атм 20 минут. К стерильному обезжиренному молоку добавляют 1% приготовленного раствора.

Среда КОДА (Рецепт 12)

Среда выпускается в виде порошка Дагестанским НИИ питательных сред и готовится в соответствии с инструкцией.

Среда Олькиницкого. (Рецепт 13).

К 100 мл стерильного питательного агара добавляют 1 г лактозы, 0,02 г соли Мора, 0,03 г гипосульфита, 1 г сахарозы, 0,1 г глюкозы, 1 г мочевины и 0,4 мл 0,4%-ного раствора фенолового красного. Предварительно растворяют соль Мора с гипосульфитом в одной пробирке с небольшим количеством воды, а в другой - мочевины с углеводами. После растворения все смешивают с агаром и профильтровывают через стерильную марлю. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 20 минут. Горячую среду скашивают, оставляя столбик высотой 2 см. Среда прозрачная, имеет красный цвет с коричневым оттенком.

Элективная дифференциально-диагностическая среда для выделения и идентификации грибов рода *Candida* (ЭДДС). (Рецепт 14)

Элективная дифференциально-диагностическая среда для выделения и идентификации грибов рода *Candida*. обусловлена вве-

дением карамели (солод поджаренный при 150–170°C в течение 2,5 час.), что дает обогащение минерального состава среды.

В качестве субстрата употребляется фильтрат сусла, имеющего углеводов 15–17% по Баллингу, и расплавленный в дистиллированной воде агар-агар.

18–20 г агар-агара растворяют при кипячении в 500 мл дистиллированной воды, затем добавляют до 1 л фильтрат сусла, имеющего карамели 6–8%. После установления pH 6,6–6,8 среду разливают в колбы и автоклавируют в автоклаве при 1 атм – 15 минут. Для проверки на стерильность среду ставят в термостат на 24 часа при 37°C. По истечении этого срока ее нагревают до 100°C и остывшую до 47–50°C разливают в чашки Петри или в пробирки. Чашки со средой можно хранить в холодильнике в течение 15–30 дней, защитив от высыхания путем помещения чашек в целлофановые мешки.

Агар Хоттингера. (Рецепт 15).

Среда из триптического перевара мяса (перевара Хоттингера) с содержанием 120–140 мг% аминного азота и 1–2% агара, pH среды 7,2–7,4.

Таблица групповой идентификации стрептококков

Серологическая группа	Наименование стрептококка	Гемолиз		КАМП-тест	Среда Карташовой	МПБ с 6,5% NaCl	МПБ с 40% желчи	60° 30 мин	Молоко с метиленовым голубым I:1000	МПБ с 0,5% сорбита	МПБ с pH 9,6
		α	β								
A	<i>St. pyogenes</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
B	<i>St. agalactiae</i>	±	±	+	+	-	±	-	-	-	-
C	<i>St. dysgalactiae</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	±	-
E	<i>St. uberis</i>	-	+	-	+	-	±	-	-	±	-
D	<i>St. faecalis</i>	-	±	-	+	+	+	+	+	±	+
N	<i>St. lactis</i>	±	±	-	-	-	±	-	±	-	-
N	<i>St. nonmotilis</i>	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-

Основные дифференцирующие признаки некоторых бактерий из семейства *Enterobacteriaceae*.

Р о д	Лактоза	Индол	Метил-рот	Реакция Фогес-Проска-Уэра	Усвое-ние цитра-та	Образо-вание серово-дорода	Разложе-ние мочевины	Разложение желатины	Маннит
<i>Escherichia</i>	+ или х	+ реже (-)	+	-	-	-	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	+	- или х	+	-	+	+	- или (+)	-	+
<i>Enterobacter</i>	+	- или х	-	+	+	-	-	-	+

Обозначения: + - положительный результат через 24-48 часов; х - запоздалый или непостоянный положительный результат; (-) - отрицательный результат; (+) - слабopоложительная реакция (ферментация углевода слабая, желатина разжижается слабо и т.д.).

СОДЕРЖАНИЕ

- 1. Общая часть.**
 - 2. Специальная часть.**
 - 2.1.** Правила отбора проб молока (секрета).
 - 2.2.** Правила доставки.
 - 2.3.** Проведение исследований секрета вымени на наличие возбудителей мастита.
 - 2.8.** Выделение золотистого стафилококка.
 - 2.9.** Выделение стрептококков.
 - 2.10.** Выделение бактерий группы кишечной палочки.
 - 2.11.** Выделение псевдомонад.
 - 2.12.** Выделение грибов рода Кандида.
 - 2.13.** Определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам.
 - 2.14.** Ускоренный метод определения чувствительности микрофлоры молока к антибиотикам.
 - 2.15.** Определение количества соматических клеток.
- Приложения.

Настоящие методические указания разработаны Всесоюзным научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии.