

Микроскопия мазков-отпечатков. Для изготовления мазков-отпечатков и посева материала на питательные среды пробы мышц, лимфатических узлов, паренхиматозных органов, освобождают от жировой и соединительной ткани, погружают в спирт и обжигают дважды. Затем стерильными ножницами из различных мест пробы вырезают кусочки ткани величиной 2–3 см и готовят мазки-отпечатки. Из каждой отобранной пробы готовят от 3 до 10 мазков-отпечатков. Препараты высушивают на воздухе, фиксируют на пламени горелки, окрашивают по Граму, исследуют под микроскопом. При микроскопии мазков-отпечатков обращают внимание на наличие возбудителей инфекционных болезней, и прежде всего исключают *B. anthracis*, *Cl. botulinum*. При обнаружении в мазках-отпечатках грамположительных палочек размером от $4 \times 1,0$ до $8 \times 1,5$ мкм с обрубленными концами или цепочек, состоящих из таких палочек, напоминающих бамбуковую трость, возникает подозрение на присутствие в материале возбудителя сибирской язвы. В таких случаях проба мяса подвергается тщательному специальному исследованию, а в отношении туши и других продуктов переработки животных поступают согласно Правилам.

При обнаружении в мазках-отпечатках споровых грамположительных палочек размером от $4 \times 1,0$ до $6 \times 1,0$ мкм, напоминающих теннисную ракетку, можно подозревать присутствие возбудителя ботулизма.

Пробы мяса и внутренних органов при подозрении в обсеменении *Cl. botulinus* подвергаются специальному исследованию.

Устанавливают наличие возбудителей пищевых токсикоинфекций и токсикозов, а именно бактерий рода *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, а также кокковую микрофлору.

Посев на пластинчатый мясопептонный агар. Из обожженного образца пробы стерильными ножницами вырезают кусочек и проводят по поверхности пластинчатой среды МПА.

Посев на элективную среду ЭНДО. Среда ЭНДО состоит из агара, лактозы, нейтрализованного сернистого

натрия, насыщенного спиртового раствора основного фуксина. Посев производят аналогичным способом, что и на МПА. Для получения изолированных колоний посев следует производить следующим образом: чашечку со средой делят по донышку карандашом на несколько секторов, после чего кусочком исследуемого материала производят посев в первом секторе и продолжают поочередно засеивать последующие секторы.

Посев в среду накопления (МПБ с желчью). При посеве в среду накопления измельченные кусочки мяса засеивают в одну колбу, а паренхиматозных органов — в другую. Посевы выращивают при температуре 37°C 20–24 часа.

Посев в печеночный бульон (Китт–Тароцци). Из предварительно обожженного образца пробы вырезают кусочек, помещают в стерильную ступку, добавляют небольшое количество стерильного физиологического раствора и растирают стерильным пестиком. Подготовленную таким образом кашу засеивают в пробирки со средой Китта–Тароцци, т. е. вносят в каждую пробирку 2–3 мл исследуемого материала. Перед началом работы пробирки со средой подогревают на водяной бане при температуре 100°C в течение 20–30 минут, а затем быстро охлаждают до 55°C. Засеянные пробирки помещают в термостат при температуре 37°C и выдерживают 8–10 суток.

Контрольные вопросы

1. Описать органолептические показатели и патолого-анатомические изменения исследуемых образцов мяса и внутренних органов.
2. Описать морфологические свойства обнаруженных в мазках-отпечатках микроорганизмов.

9.2.

ЗАНЯТИЕ № 2

План работы

1. Произвести учет бактериальной обсемененности.
2. Изучить культуральные свойства микроорганизмов на МПА.

3. Изучить культуральные свойства микроорганизмов на среде ЭНДО.

4. Исследовать микроорганизмы из колоний, подозрительных на представителей пищевых токсикоинфекций, а именно произвести микроскопию мазков, определить подвижность, поставить реакцию агглютинации на предметном стекле с поливалентными сальмонеллезными сыворотками и сыворотками кишечной палочки.

5. Произвести посев микроорганизмов из подозрительных колоний в конденсационную воду скошенного агара.

6. Произвести посев на среды короткого пестрого ряда.

7. Произвести посев в полужидкий МПА для сохранения культуры.

Оборудование, реактивы и материалы для исследования. Микроскопы, лупы, предметные стекла с луночками, покровные стекла, пастеровские пипетки, бактериологические петли, среды Гисса, скошенный МПА, среда Плоскирева, среда типа Ресселя («скошенный столбик»), МПБ, дистиллированная вода, физраствор, поливалентные агглютинирующие сальмонеллезные и коли сыворотки, набор красок и реактивов для окраски по Граму, выросшие колонии микроорганизмов в МПА, на МПА, среде ЭНДО и в среде обогащения.

Определение общей микробной обсемененности мяса. Для того чтобы определить общее количество микроорганизмов в 1 г мяса, производят подсчет выросших колоний в МПА по всей поверхности чашки и умножают на разведение навески, т. е. на 10. Подсчет ведут по секторам, для чего дно чашки разделяют на 4–16 секторов остро заточенным карандашом; этим же карандашом отмечают каждую колонию.

Изучение выросших колоний на МПА. После 20–24-часового термостатирования посевов выросшие колонии исследуют с помощью лупы или под малым увеличением микроскопа. Особое внимание уделяют выявлению колоний с характерными признаками для сибиреязвенных бацилл, пастереллеза, рожи, а также стафилококков,

стрептококков и диплококков. Из обнаруженных подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму и исследуют под микроскопом. *Bac. anthracis* на МПА растут в виде серовато-белых тонкозернистых колоний с серебристым оттенком, похожих на снежинки. Стафилококки на МПА растут в виде круглых мелких колоний белого, оранжевого, лимонно-желтого или золотисто-желтого цвета. Стрептококки и диплококки на глюкозо-сывороточном агаре растут в виде мелких вевроватых, просвечивающих или слегка мутноватых колоний.

В зависимости от результатов микроскопии мазков и роста на МПА в дальнейшем производят специальные исследования для идентификации микроорганизма.

Диагноз на сибирскую язву устанавливают на основании микроскопии мазков-отпечатков, характера роста на питательных средах, серологического исследования и биопробы на лабораторных животных.

Диагноз на пастереллез и рожу устанавливают на основании микроскопии мазков, характера роста на питательных средах.

Диагноз на кокковые токсикоинфекции устанавливают на основании микроскопического исследования (грамположительные, неподвижные, круглые микроорганизмы, располагающиеся цепочками, гроздьями и в виде ланцетовидных диплококков) и характера роста на питательных средах.

Для дифференциации патогенных от непатогенных микроорганизмов этой группы производят специальные исследования.

Изучение выросших колоний на среде ЭНДО. Выросшие колонии просматривают с помощью лупы или под малым увеличением микроскопа. При изучении колоний на среде ЭНДО обращают внимание на характерные признаки роста для бактерий рода *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*. На среде ЭНДО *E. coli*, ферментирующая лактозу с образованием кислоты, отличается по цвету от колоний сальмонелл и протей, не ферментирующих этот сахар.

Бактерии группы *E. coli* образуют на этой среде крупные колонии красного цвета часто с металлическим блеском.

Бактерии группы *Salmonella* образуют колонии: небольшие круглые, бледно-розовые, бесцветные, прозрачные или полупрозрачные с голубоватым оттенком. Бактерии группы *Proteus* растут в виде тонкого прозрачного налета с голубоватым оттенком. В случаях отсутствия роста бактерий на среде ЭНДО через 20–24 часа производят посев из среды накопления (при посеве непосредственно материала на эту среду) на одну из элективных сред. Пересевы со сред обогащения целесообразнее всего производить на среду Плоскирева, так как эта среда ингибирует рост протей или он растет на ней в виде изолированных колоний, а число выделений сальмонелл на этой среде самое высокое.

Идентификация бактерий рода сальмонелл. Обнаруженные на среде ЭНДО подозрительные на сальмонеллы колонии отделяют для дальнейшего исследования. Из части колонии готовят мазок, красят по Граму и под микроскопом изучают морфологические признаки и чистоту культуры. Паратифозная группа бактерий представляет собой короткие тонкие палочки длиной 2–4 и шириной 0,5–1 мкм с закругленными концами, спор и капсул не образуют, по Граму окрашивается отрицательно. Другую часть колонии переносят петлей в пробирку с 2 мл подогретого до 40°C МПБ и выдерживают в термостате при температуре 37°C 3–4 часа, после чего из нее производят посев пастеровской пипеткой по 1–2 капли на питательные среды цветного ряда для определения биохимических свойств и определяют подвижность микроорганизмов в висячей капле. Для этого кончики покровного стекла замазывают вазелиновым маслом и в центре его пастеровской пипеткой наносят небольшую каплю бульонной культуры. На подготовленное таким образом стекло накладывают предметное стекло с луночкой, чтобы капля находилась в центре луночки. Затем предметное стекло, вместе с приклеенным к нему покровным, осторожно переворачивают и капля на покровном стекле оказывается в висячем положении,

т. е. обращена вниз. Для исследования под микроскопом необходимо сузить диафрагму, найти края капли под объективом 8 и, поместив найденную каплю в центр поля зрения, рассмотреть под объективом 40.

Одновременно с культурой подозреваемой колонии ставят реакцию агглютинации на стекле, вначале с агглютинирующей адсорбированно поливалентной сальмонеллезной сывороткой (*A B C D E*), затем при наличии материала с каждой монорецепторной сывороткой (III, IV, VII, VIII, IX, X). На предметное стекло пастеровской пипеткой наносят каплю агглютинирующей сыворотки и рядом каплю физиологического раствора. Бактериологической петлей берут часть исследуемой колонии и растирают вначале на краю капли, а затем по всей ее поверхности. Такую процедуру делают вначале с физиологическим раствором, потом с агглютинирующей сывороткой.

При продолжительной реакции через 1–2 минуты в капле с сывороткой образуются хлопья или комочки, они отчетливо видны, если предметное стекло покачивать так, чтобы смесь сыворотки с культурой переливались от одного края предметного стекла к другому. В капле физиологического раствора должно отмечаться равномерное помутнение. Если с поливалентной сывороткой реакция положительная, проводят реакцию агглютинации на стекле с монорецепторными сыворотками. В случае положительной реакции агглютинации одной из монорецепторных сывороток с остальными сыворотками реакцию проводить не следует.

В основном бактерии из рода сальмонелл подвижны, к неподвижным формам относятся только галлиарум и пуллорум.

Характерный рост колоний на элективной среде ЭНДО, положительной агглютинации с одной из монорецепторных сывороток, наличие грамтрицательных и подвижных палочек дают основание для предварительного заключения об обнаружении сальмонелл.

В случае отрицательных результатов агглютинации на стекле, по характерным признакам роста на элективной

среде и соответствующим морфологическим показателям, принадлежность культуры к сальмонеллам устанавливается по биохимической реакции.

По действующим Правилам, при обнаружении в туше или органах сальмонелл, внутренние органы направляют на техническую утилизацию, а мясо проваривают или перерабатывают на мясные хлеба и в консервы.

9.2.1. ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Идентификация бактерий группы протей. Бактерии этой группы представляют собой небольшие тонкие, подвижные, грамотрицательные палочки. На пластинчатом МПА и дифференциальной среде ЭНДО основной вид этой группы палочек (*Bacillus*) *B. proteus vulgaris* образует типичные роящиеся колонии в виде прозрачного налета. Характерным культуральным тестом для определения бактерий этой группы является своеобразный рост культуры, высеянной в конденсационную воду скошенного агара (по Шукевичу), а биохимическим — способность протей разлагать мочевины. С целью окончательной идентификации этой культуры подозрительные колонии высевают в конденсационную воду свежескошенного МПА (по Шукевичу) и в «скошенный столбик» (типа Ресселя с мочевиной). В состав среды «скошенного столбика» входит: 1% мочевины, 4% лактозы, 0,1% глюкозы и индикатор ВР (смесь розоловой кислоты и водного голубого).

9.2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ КОККОВЫХ ФОРМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Стафилококки. Имеют шарообразную форму. Величиной 0,6–1 мкм, образуют скопления неправильных кучек в виде гроздей винограда. На пластинчатом МПА стафилококк образует круглые блестящие колонии с ровными краями с различной пигментацией. По цвету пигмента колоний стафилококк принято делить на три подгруппы:

золотистый, белый и лимонно-желтый. Довольно обширная группа стафилококков помимо болезнетворных, включает большое количество апатогенных стафилококков. Для определения патогенности стафилококков в настоящее время пользуются реакцией плазмокоагуляции и посевом на маннит в анаэробных условиях. Для определения плазмокоагуляционных свойств культур берут свежеполученную кроличью кровь, смешивают с 5% -ным раствором лимоннокислого натрия (2 мл на 8 мл крови) и центрифугируют, после чего плазму отсасывают и разводят физиологическим раствором в 4 раза. Полученную смесь разливают по 0,5 мл в пробирки, в которые вносят бактериологической петлей суточную культуру стафилококка и помещают в термостат при температуре 37°C. Патогенные штаммы стафилококков коагулируют плазму в течение 1–6 часов.

Стрептококки. Это шаровидные микроорганизмы, которые группируются в разной длины цепочки. На МПА стрептококки растут в виде мелких прозрачных колоний, которые затем мутнеют. Среди них имеются патогенные и апатогенные виды. По росту на агаре с кровью стрептококки делятся на гемолитические (вокруг круглой колонии образуется светлая зона гемолиза), зеленающие (образующие зеленоватую зону гемолиза) и негемолитические. Первые два вида относятся к патогенным, последний — непатогенный. Гемолитическую активность стрептококков определяют на чашках Петри с агаром, соединяющим 5% дефибринированной кроличьей или бараньей крови, которые выдерживают в термостате при 37°C 18 часов.

Контрольные вопросы

1. Описать характер роста на МПА возбудителей сибирской язвы, рожи, пастереллеза, стафилококка и стрептококка.
2. Описать характер роста на дифференциальной среде ЭНДО сальмонелл, кишечной палочки и протей.
3. Дать заключение о принадлежности выделенных из мяса микроорганизмов на основании морфологических, культуральных и серологических показателей.