



**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральная служба по ветеринарному  
и фитосанитарному надзору**

# **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

**по лабораторной диагностике иерсиниоза  
животных и обнаружению возбудителя  
болезни в мясном сырье, молоке  
и растительных кормах**

**Москва, 2005**



# ХайМедиа Лабораториз Пвт. Лтд.

*Для драгоценной жизни*

Компания HiMedia Laboratories Pvt Ltd (Индия) - мировой лидер по производству высококачественной продукции для бактериологии и вирусологии, предназначенной для организаций системы здравоохранения, санитарно-эпидемиологической службы, сертификационных центров, биотехнологических предприятий, научно-исследовательских институтов и для предприятий фармацевтической промышленности.



Система управления качеством сертифицирована по международным стандартам ISO 9001:2000, ISO 13485:2003, WHO GMP, Европейскому стандарту качества (CE).  
Продукция зарегистрирована в Комиссии по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США (US FDA)

**HIMEDIA®**

**Микробиология на службе человечеству**

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО СЕЛЬСКОМУ  
ХОЗЯЙСТВУ

УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

Орликов пер., д. 1/11, Москва, 107139

Для телеграмм: Москва 84

Тел./факс: (095) 975-51-05

E-mail: secmin@ud.mcx.ru

<http://www.mcx.ru>

3. 10. 2005 № 5-1-14/971

На № \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Управления  
ветеринарии  
Федерального агентства по  
сельскому хозяйству

  
АПАЛЬКИН

2005 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**  
по лабораторной диагностике иерсиниоза животных  
и обнаружению возбудителя болезни в мясном сырье,  
молоке и растительных кормах

Москва, 2005

Разработчики:

д.в.н., профессор **Каврук Л. С.** (Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии); д.в.н., профессор **Шумилов К. В.**; к.б.н., с.н.с. **Мельниченко Л. П.**; к.в.н., с.н.с. **Скляр О. Д.**, д.б.н, профессор **Обухов И. Л.** (ФГУ "Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов"); д.м.н., профессор **Смирнов И. В.** (ЗАО "Инфамед"); д.м.н., профессор **Зыкин Л. Ф.**; д.б.н., профессор **Щербаков А. А.** (Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова)

# 1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

**1.1. Иерсиниоз** - острое инфекционное заболевание людей и животных разных видов, включая птиц. Возбудителями болезни являются патогенные штаммы *Yersinia enterocolitica*, относящиеся к роду *Yersinia*, семейству *Enterobacteriaceae*.

1.2. Бактерии вида *Y. enterocolitica* широко распространены в природе ввиду высокой адаптации к сапрофитному образу жизни, что является одной из характерных биологических особенностей данного вида бактерий. Наряду с сапрофитными свойствами многие штаммы иерсиний проявляют патогенные свойства за счет токсигенности, адгезивности, инвазивности и способности противостоять фагоцитозу в организме теплокровных животных. Резервуаром возбудителя иерсиниоза помимо больных животных являются объекты окружающей среды - вода, почва, растительные корма, пищевые продукты, особенно молоко.

Большую роль в распространении возбудителя иерсиниоза играют синантропные грызуны (серые крысы, мыши), в связи с тем, что с их экскрементами иерсинии часто попадают на овощи в период хранения.

Температура от +4 до +40°C является благоприятной для размножения *Y. enterocolitica*, что способствует накоплению иерсиний на объектах животноводческих помещений - стойл, полов, подстилке, навозной жиже, овощехранилищах и пр.

1.3. Иерсиниоз чаще протекает в кишечной форме, но иногда развивается бактериемия с поражением различных внутренних органов. В зависимости от продолжительности болезни она может иметь острое и подострое течение.

Заболеванию особенно подвержен молодняк, у которого иерсиниоз проявляется в виде спорадических случаев или энзоотической вспышки, чему способствуют многие факторы, связанные с несоблюдением технологических, ветеринарно-санитарных, зоогигиенических и общих противоэпизоотических требований при его выращивании.

Клиническая картина болезни не имеет специфических особенностей и характеризуется признаками, свойственными кишечным инфекциям, вызванным другими микроорганизмами. У больных животных наблюдается потеря аппетита, понос, нарастающая слабость, адинамия, учащенное и поверхностное дыхание, учащенный пульс, интоксикация, поражение центральной нервной системы - судороги, депрессия, чередующаяся с возбуждением. При затяжном течении болезни возникает обезвоживание организма, западание глазных яблок, истощение. У некоторых животных могут быть серозно-катаральные или серозно-гнойные истечения из носовой полости, хрипы в области бронхов и легких, конъюнктивит, артриты. Температура тела обычно в пределах нормы или повышена на 0,5-1,0°C, в предагональном состоянии - ниже нормы.

При кишечной форме возбудитель болезни локализуется в желудочно-кишечном тракте и мезентериальных лимфатических узлах; при септической - еще и в паренхиматозных органах, крови, костном и головном мозге и регионарных

лимфатических узлах.

У взрослых животных клинические признаки болезни обычно отсутствуют. В отдельных случаях могут быть артриты, аборт, эндометриты, маститы и еще реже - диарея.

Основной путь заражения - алиментарный. Не исключается возможность инфицирования при контакте с больными животными, а также с ранее переболевшими животными и работниками животноводческих ферм - бактерионосителями. Выздоровевшие животные могут длительное время оставаться бактерионосителями и выделять возбудителя болезни в окружающую среду.

У животных-бактерионосителей клинические признаки отсутствуют. У крупного рогатого скота иерсинии встречаются в кишечнике, у свиней - на слизистой корня языка, миндалинах глотки, в подчелюстных лимфатических узлах, у лактирующих животных - в молоке.

1.4. Патологоанатомические изменения у погибших от иерсиниоза животных имеют картину катарального или катарально-геморрагического гастроэнтерита с наличием точечных, пятнистых и полосчатых кровоизлияний на слизистой оболочке тонкого и толстого отделов кишечника; мезентериальные лимфатические узлы увеличены, на разрезе розово-красного или вишневого цвета. В брюшной полости может содержаться серозный экссудат светло-желтого цвета. Селезенка иногда имеет утолщенные края или слегка увеличена с точечными кровоизлияниями под капсулой; печень нередко перерождена, глинистого цвета, пульпа на разрезе имеет дряблую консистенцию и легко снимается присоскобе.

В почках под капсулой могут быть точечные кровоизлияния. На разрезе граница коркового и мозгового слоев в ряде случаев сглажена. На эндокарде в области клапанов сердца часто отмечаются точечные и пятнистые кровоизлияния. Легкие могут иметь мраморный рисунок с наличием лобарной пневмонии. В бронхах и трахее - пенистый экссудат. Сосуды головного мозга сильно гиперемированы, мозговая ткань отечна.

Указанные изменения наблюдаются в отдельных или одновременно в нескольких органах.

1.5. Диагноз иерсиниоза у животных ставят на основании результатов бактериологического и молекулярно-генетического исследования (ПЦР) с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков болезни и патологоанатомической картины.

1.6. При убойе и разделке туш животных-бактерионосителей может происходить контаминация иерсиниями мяса этих животных и получаемых от них субпродуктов, в результате загрязнения частицами фекалий, помета птиц, содержимого кишечника, через режущие необеззараженные инструменты, тару и пр.

У лактирующих животных-бактерионосителей иерсинии могут содержаться в молоке и приготовленном из него сливках или попадать в молоко с контаминированной поверхностью молочной железы во время доения коров, необеззараженных доильного оборудования и молочной посуды.

1.7. Возможность контаминации различных растений, корнеплодов, злаковых и бахчевых культур иерсиниями обусловлена способностью этих бактерий длительное время выживать и размножаться при температуре от +4 до 40°C в воде и влажной почве, богатой органическими веществами. В связи с этим растительные культуры и приготовленные из них салаты и корма могут быть источником заражения людей и

животных патогенными штаммами иерсиний. Установлено, что в период вегетации растений, выросших на почвах, в которые попадают сточные воды с животноводческих ферм, иерсинии проникают внутрь растений. И хотя в таких случаях в смывах с овощей указанные бактерии не удается обнаружить, но при измельчении зеленой массы из выделяемого сока может быть выделена культура иерсиний.

## 2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

2.1. Целью бактериологического исследования материала на иерсиниоз является выделение чистой культуры возбудителя болезни с изучением ее морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных свойств и определением ее патогенности в пластинчатой РА с помощью диагностической агглютинирующей сыворотки к патогенным штаммам иерсиний (СПИ), входящей в состав "Тест-системы для идентификации патогенных штаммов *Yersinia enterocolitica*".

### 2.2. Взятие материала и пересылка его для лабораторного исследования

2.2.1. Для прижизненной диагностики иерсиниоза в лабораторию направляют материал от больных животных, не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами, отобранный в стерильные пробирки (флаконы) с резиновыми пробками:

а) фекалии в количестве 2-3 г, отобранные непосредственно из прямой кишки с помощью предварительно прокипяченного резинового катетера или в момент дефекации;

б) молоков в количестве 10-15 мл, взятое выборочно от 15-20 коров стада после санитарной обработки молочной железы и сдаивания первых порций молока - одна сборная проба. В зависимости от поголовья коров на ферме количество сборных проб молока может варьировать в пределах от 3 до 5. Молоко должно быть доставлено в лабораторию для исследования в день взятия пробы. При отсутствии такой возможности молоко консервируют кристаллической борной кислотой (0,1 г на 10 мл). Консервированное молоко пригодно для исследования в течение 10 дней.

2.2.2. Для посмертной диагностики в лабораторию направляют материал от погибших или вынуждено убитых животных, желательно не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами.

Трупы мелких животных (поросят, пушных зверей, птиц и др.) направляют целиком (2-4 тушки).

От крупных животных посылают следующий материал: сердце, перевязанное лигатурой вблизи разреза сосудов и аорты; селезенку; долю печени с желчным пузырем; почку; пораженные участки тонкого или толстого отдела кишечника с содержимым, перевязанные с двух концов лигатурой, вместе с регионарными мезентериальными лимфатическими узлами (в отдельной посуде или полиэтиленовом пакете); голову; трубчатую кость; подчелюстные лимфатические узлы; у свиней и поросят еще и соскобы с задней стенки глотки, с поверхности корня языка и глоточных миндалин, взятые стерильным скальпелем.

2.2.3. Для диагностики иерсиниоза птиц из неблагополучных секций птичника направляют по 3-5 свежих трупов или 3-5 птиц с клиническими признаками диареи. Большую птицу убивают в лаборатории и подвергают патологоанатомическому и бактериологическому исследованию.

2.2.4. Пробы мясного сырья, молока и сливок для бактериологического исследования отбирают согласно правилам и в количествах, предусмотренных следующими ГОСТами:

- мясо - ГОСТ 7269-79. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести;
- мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих - ГОСТ Р 50396.0-92. Методы отбора проб и подготовка их к микробиологическим исследованиям;
- молоко и сливки - ГОСТ 13928-84. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу.

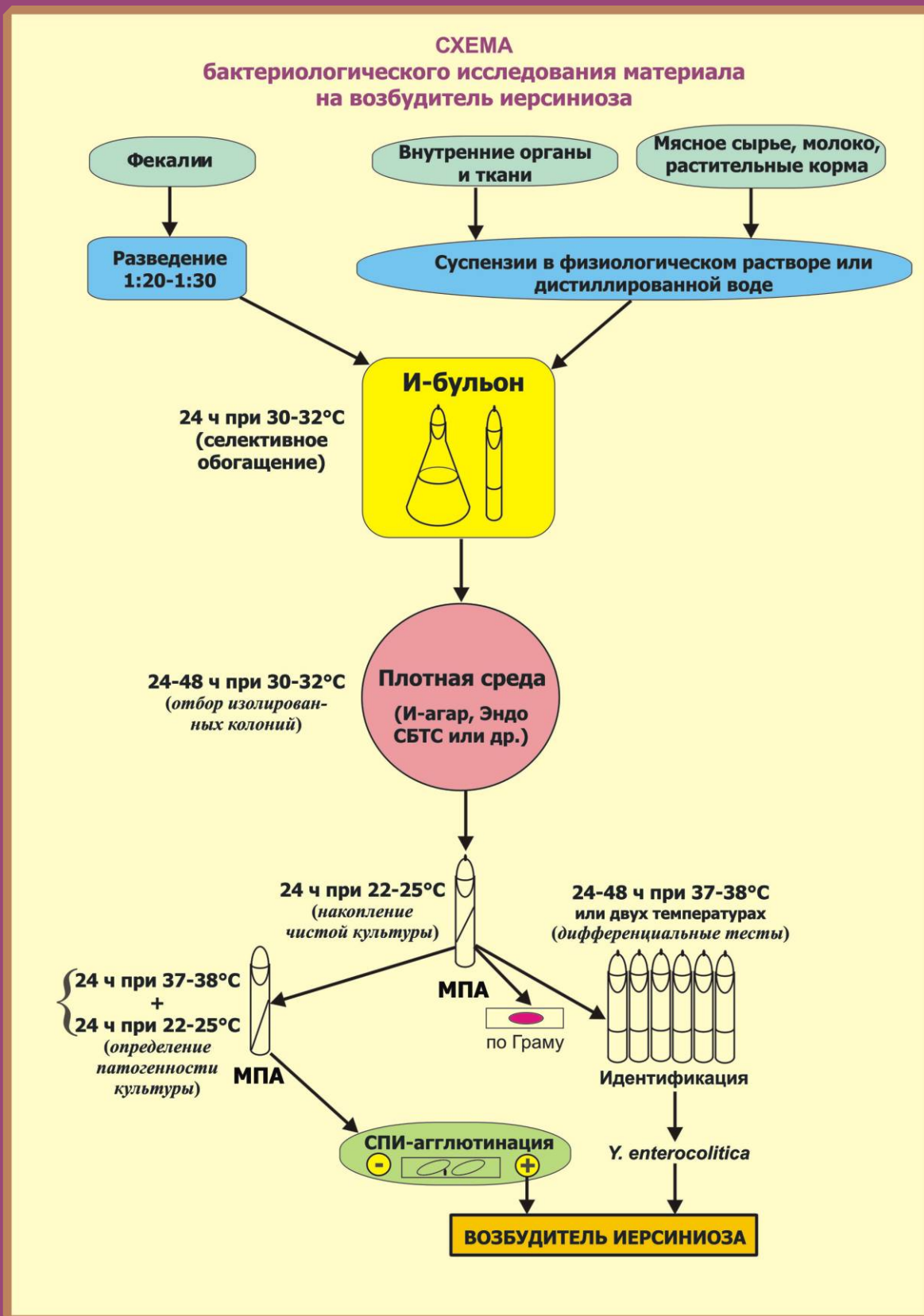
2.2.5. Корнеплоды, хранящиеся в овощехранилищах или буртах, подвергают исследованию не ранее, чем через 30 дней после их закладки. Пробы растительных кормов для исследования на наличие в них бактерий вида *Yersinia enterocolitica* отбирают согласно следующим ГОСТам:

- корма растительного происхождения - ГОСТ 27662-87. Методы отбора проб (зеленый корм, сено, силос, сенаж);
- комбикорма, сырье - ГОСТ 13496.0-80. Методы отбора проб (кормовая мука, травяная мука, сушеный свекловичный жом, сухие кукурузные корма и т.д.);
- картофель свежий продовольственный - ГОСТ Р 51808-2001. Методы отбора проб;
- свекла столовая, кормовая свежая - ГОСТ Р 1811-2001.



2.2.6. Пробы материала, отобранные для бактериологического исследования, упаковывают в полиэтиленовые пакеты или во влагонепроницаемую тару и в тот же день направляют в лабораторию. Если материал (органы, ткани и фекалии животных)

доставить в лабораторию в течение 3-4 ч не представляется возможным, особенно в теплое время года, его консервируют стерильным 30%-ным водным раствором химически чистого глицерина, объем которого должен превышать объем материала в 2-3 раза.



### 2.3. Исследование материала

2.3.1. Присланный в лабораторию материал исследуют в день его поступления, соблюдая правила асептики.

2.3.2. Для выделения иерсиний из исследуемого материала используют жидкую селективную среду обогащения (И-бульон, разлитый в пробирки в количестве 4-5 мл) и одну из плотных дифференциально-диагностических или селективных сред, разлитую в чашки Петри и подсушенную в течение 40-60 мин в термостате: И-агар; селективные среды для выделения иерсиний компании "HiMedia Laboratories Limited" или фирмы "OXOID"; агар Эндо; среду с желчью и индикатором бромтимоловым синим, СБТС; или среду для выделения иерсиний (г. Махачкала).

2.3.3. Пробы фекалий и соскобы со слизистой кишечника, корня языка и запяточных миндалин (две последние пробы можно объединить) в количестве приблизительно 0,5 г переносят в пробирки с 8-10 мл стерильного физиологического раствора и суспендируют. Взвесь отстаивают при комнатной температуре в течение 10-15 минут. Надосадочную жидкость после оседания крупных частиц в количестве 0,2-0,4 мл высевают в И-бульон в пробирке.

В тех случаях, когда пробы фекалий консервированы глицериновым раствором, последний сливают и 0,5 г фекалий разводят физиологическим раствором, последующее исследование проводят, как указано в 2.3.2.

2.3.4. Из печени, селезенки, почки, лимфатических узлов вырезают ножницами кусочки размером не менее 1-1,5 см<sup>3</sup>, увлажняют спиртом, обжигают поверхность до сгорания спирта, после чего помещают в пробирки с 3-5 мл стерильного физиологического раствора, суспендируют и высевают взвесь по 0,2-0,3 мл в И-бульон в пробирке.

Внутренние органы можно исследовать и другим образом. Поверхность органа прижигают раскаленным шпателем. Стерильной пастеровской пипеткой в участке фламбированной поверхности отсасывают ткань в объеме 0,2-0,3 мл и высевают ее в И-бульон в пробирке.

2.3.5. Кровь сердца, желчь, головной и костный мозг отсасывают по 0,2-0,3 мл пастеровскими пипетками и вносят в пробирки с И-бульоном, которые встряхивают для перемешивания материала.

2.3.6. Для исследования мяса и субпродуктов из средней пробы материала отвешивают навеску в 25 г, нарезают ножницами на мелкие кусочки, последние растирают в стерильной фарфоровой ступке с небольшим количеством стерильного физиологического раствора или дистиллированной воды, затем суспензии переливают в колбы, встряхивают и отстаивают в течение 10-15 мин для осаждения крупных частиц, надосадочную жидкость переносят в колбу, содержащую 100 мл И-бульона и тщательно перемешивают.

2.3.7. Пробы мясного фарша, сырого молока и полученных из него сливок в количестве по 25 г вносят в колбы, содержащие 100 мл И-бульона, которые встряхивают в течение 2-3 мин с целью размешивания материала.

2.3.8. Для исследования овощей (корнеплодов) из сборной пробы делают навески по 0,5 кг, обмывают

поверхность корнеплодов ватно-марлевыми стерильными тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором или дистиллированной водой, которые затем погружают в колбу со стерильным физиологическим раствором или дистиллированной водой в объеме 80-100 мл.

Содержимое колбы тщательно встряхивают в течение 4-5 мин, отстаивают 10-15 мин для осаждения крупных частиц грунта и вносят по 25 мл в колбы со 100 мл И-бульона.

2.3.9. Пробы растительных кормов отбирают в количестве 25 г, измельчают предварительно прокипяченными ножницами или ножом на мелкие кусочки и вносят в колбы со 100 мл И-бульона, закрывают стерильными резиновыми пробками и тщательно встряхивают в течение 10-15 мин вручную или на шуттель-аппарате.

### 2.4. Выделение и идентификация культур иерсиний

2.4.1. Пробирки (колбы) с засеянным исследуемым материалом в И-бульоне инкубируют при температуре 30-32°C в течение 24 ч.

2.4.2. Культуры, полученные в И-бульоне, пересевают бактериологической петлей частыми широкими штрихами в отдельные чашки Петри с И-агаром или одной из плотных питательных сред (см. п. 2.3.2) по всей поверхности агара или на отдельные секторы чашек, которые помещают в термостат на 48 ч.

2.4.3. Через 24-48 ч учитывают характер роста колоний, выросших в чашках Петри на поверхности одной из плотных питательных сред, визуально и с помощью лупы (табл. 2.1, рис. 1-3).

Таблица 2.1

Характер роста *Y. enterocolitica* на различных плотных средах

Питательная среда	Характеристика колоний через 48 ч роста
Селективный И-агар	Колонии диаметром 0,8-1,5 мм, бесцветные, округлые, матовые, с темно-красным бугорком в центре. Края колоний с небольшими неровностями. Цвет среды остается розовым.
Среда для выделения иерсиний	Колонии диаметром 0,5-1,5 мм, бледно-розовые с сиреневым оттенком, крупные, блестящие, выпуклые. Цвет среды остается светло-коричневым.
(г. Махачкала) Среда с желчью и бромтимоловым синим (СБТС)	Колонии диаметром 2-3 мм, темно-оливкового цвета, более светлые к периферии, сильно шероховатые, с выпуклым более темным центром, края изрезанные, фестончатые. Темно-зеленая с бирюзовым оттенком среда вокруг колоний обесцвечивается и приобретает оливковый цвет - более светлый, чем основной фон. Колонии других энтеробактерий выпуклые, сочные, округлой формы, более крупные, темно-зеленого, коричневого или черного цвета.
Агар Эндо	Колонии диаметром 1,0-1,5 мм, округлые. Периферическая часть колоний розовая, блестящая, прозрачная. Центр колоний выпуклый шероховатый, окрашен в темно-розовый цвет. Цвет среды - бледно-розовый.



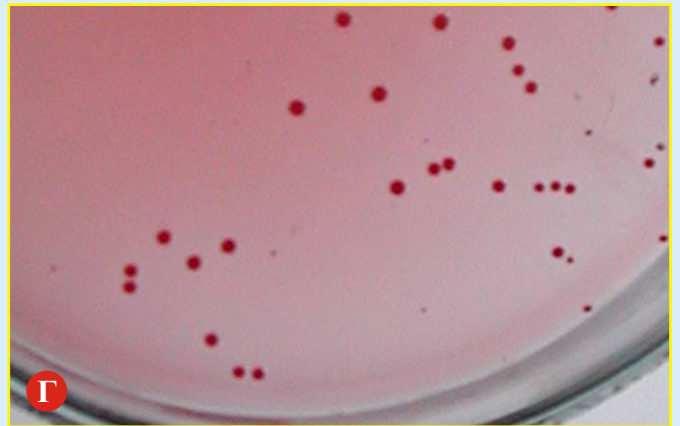
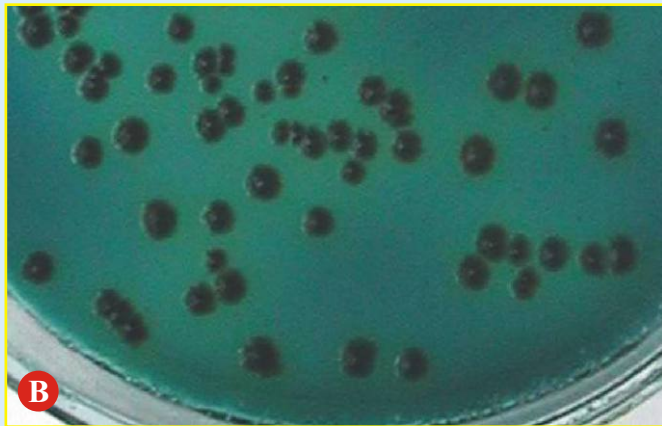
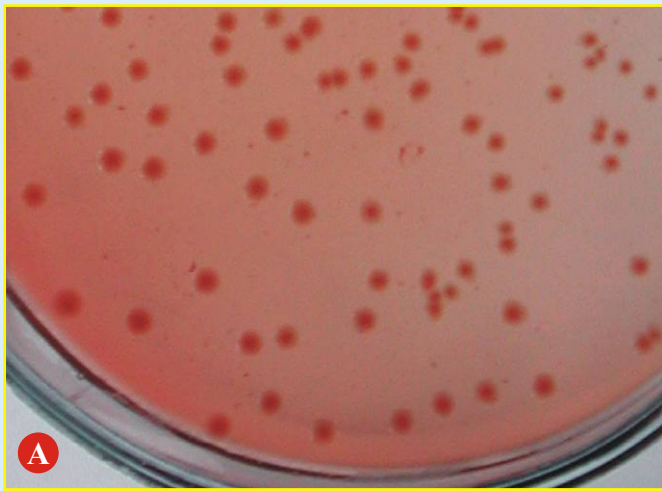


Рис. 1. Чистая культура *Y. enterocolitica* (через 48 ч при 37°C) на агаре Эндо (А), “Дагестанском” агаре (Б), среде СБТС (В) и агареСМ653 (Г).

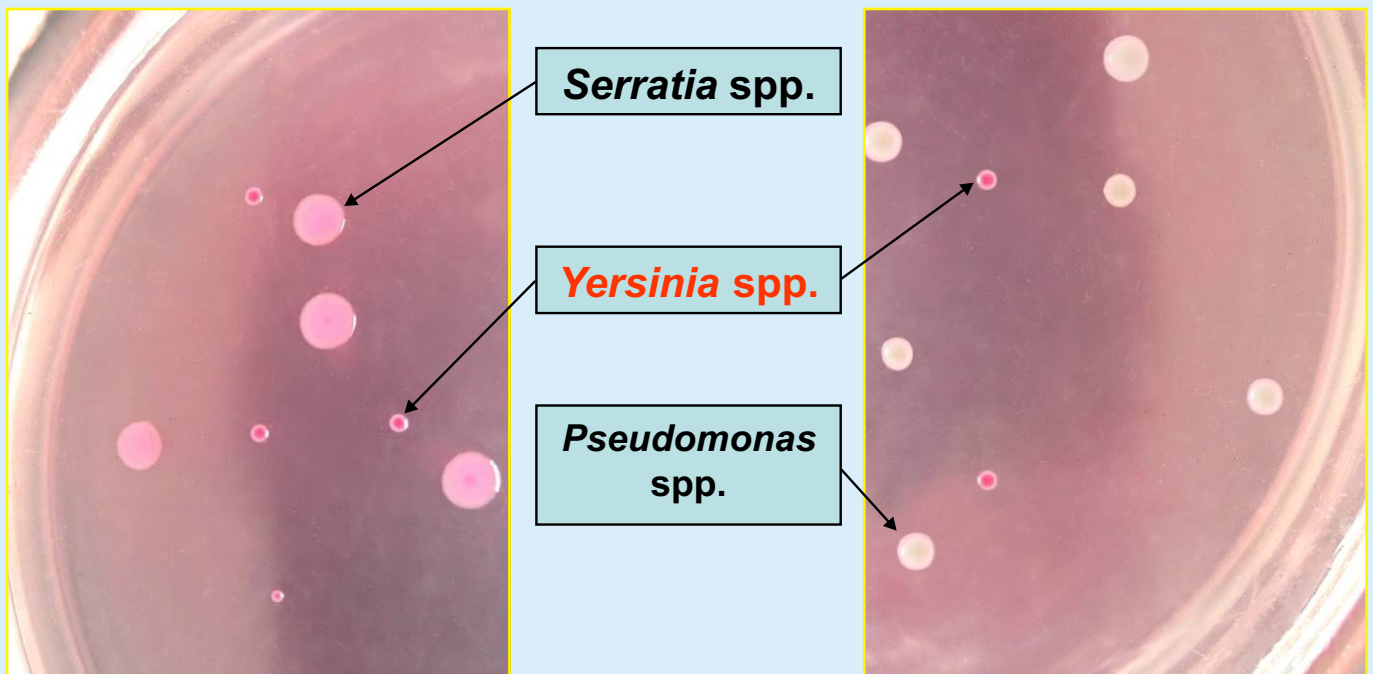
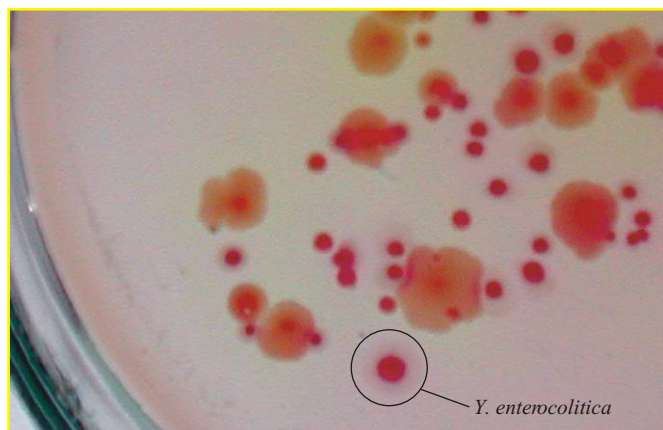
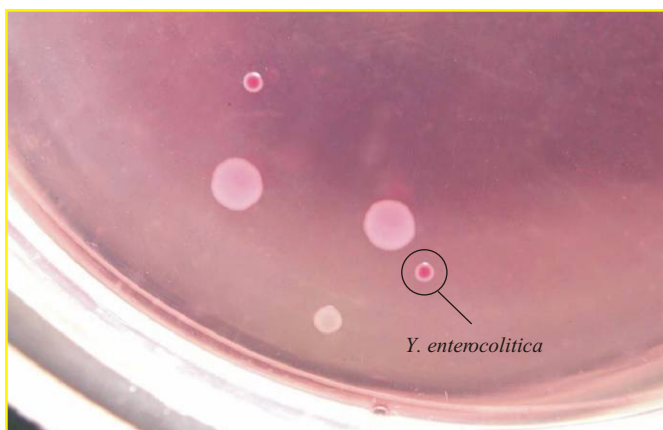


Рис. 2. Рост колоний *Y. enterocolitica*, сerratий и псевдомонад на И-агаре через 24 ч при 32°C. Состав И-агара: Основа селективного агаря для иерсиний (M843, HiMedia), иргасан (селективная добавка FD208, HiMedia)



**Рис. 3. Рост колоний *Y. enterocolitica*, серраций и псевдомонад на Селективном агаре для иерсиний (M843, HiMedia) через 24 ч при 32°C.**

**Рис. 4. Рост колоний *Y. enterocolitica* и псевдомонад на И-агаре через 48 ч при 32°C.**

Селективные и дифференциально-диагностические среды для выделения иерсиний подавляют рост многих видов посторонней микрофлоры, однако это обстоятельство не исключает необходимость идентификации культур бактерий, подозрительных на иерсинии, по биохимическим свойствам.

2.4.4. Типичные для иерсиний колонии отсевают на скошенный МПА (с каждой чашки 1-2 колонии), инкубируют при 22-25°C в течение 24 ч и затем проводят изучение морфологических, тинкториальных и биохимических свойств выделенных культур.

2.4.5. Из суточных агаровых культур бактерий, выращенных на скошенном МПА, делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

*Y. enterocolitica* - биполярные полиморфные овоидные или палочкообразные грамотрицательные бактерии размером от 0,5 до 2,0 мкм, не образующие спор и капсул, расположенные одиночно или короткими цепочками. В молодых развивающихся культурах микробные клетки могут быть более крупными, часто располагаются цепочками или в виде длинных изогнутых нитей, состоящих из неразделившихся клеток, что особенно характерно для R-форм. Старые культуры в отличие от молодых содержат одиночно расположенные более мелкие и коккообразные клетки.

2.4.6. Для определения подвижности бактерий выделенные культуры выращивают при 22-25°C и при 37-38°C в полужидком МПА (0,25-0,3%). Посев проводят уколом в столбик полужидкого агара. Подвижными считают штаммы, выросшие диффузно, вызывающие помутнение среды; неподвижными - растущие только по ходу укола.

Определение подвижности бактерий можно проводить у односуточных агаровых культур в препарате "раздавленная капля". *Y. enterocolitica* подвижны при 22-25°C и неподвижны при 37-38°C.

2.4.7. Характерными свойствами бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, к которому относится род *Yersinia*, является отсутствие фермента оксидазы и наличие фермента каталазы.

2.4.8. Для изучения ферментативных свойств используют односуточные агаровые культуры, выращенные на МПА при 22-25°C, которые пересевают в следующие среды:

- с углеводами (глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, мальтоза, сорбит, рамноза) и индикатором Андреде или полужидкие с индикатором ВР;

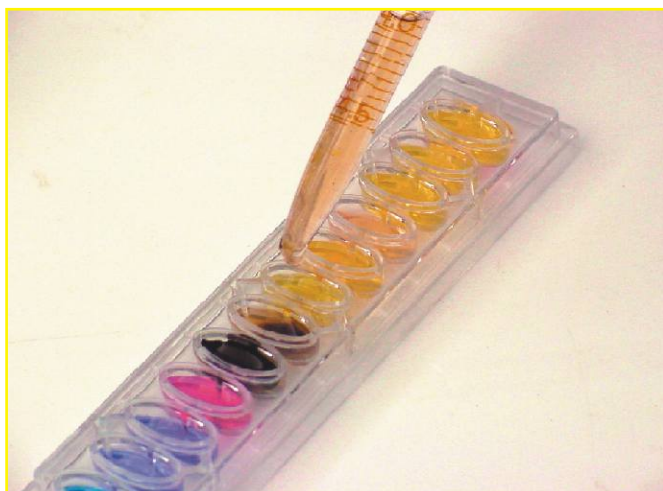
- с мочевиной по Кристенсену или Преусу;
- цитратную среду Симмонса;
- среду Кларка (для реакций с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра);
- среду с фенилаланином;
- среду с сульфатом железа (для определения продукции H<sub>2</sub>S);
- МПБ, 1%-ную пептонную воду или бульон Хоттингера (для определения индола).

Посев в среду Кларка для постановки реакции Фогеса-Проскауэра проводят в две пробирки, одну из которых инкубируют при 22-25°C, а другую при 37°C; остальные посевы инкубируют также при 37°C.

Родовую и видовую принадлежность выделенных культур бактерий устанавливают по показателям таблицы 2.2.

Бактерии вида *Y. enterocolitica* расщепляют мочевину, не обладают фенилаланиндезаминазной активностью, не утилизируют цитрат, не образуют сероводород, ферментируют углеводы с образованием кислоты без газообразования (глюкозу, сахарозу, маннит, сорбит, мальтозу), не ферментируют лактозу, рамнозу, неподвижны при 37-38°C и подвижны при 22-25°C. Реакция Фогеса-Проскауэра также положительна при 22-25°C и отрицательна при 37-38°C. Часть штаммов возбудителя иерсиниоза образуют индол.

Иерсинии вида *Y. pseudotuberculosis*, в отличие от *Y. enterocolitica*, дают отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра при 22-25°C, не ферментируют сахарозу и сорбит, но часто ферментируют рамнозу (табл. 2.3.)



## Основные дифференциальные признаки лактозоотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*\*

ТЕСТЫ	<i>Yersinia</i>					<i>Proteus</i>			<i>Providencia</i>			
	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Salmonella</i> **	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. murrayi</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>P. alcalifaciens</i>
Оксидаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+Г	+	+Г	+Г	+Г	+Г	+Г	+	+	+Г
Метилловый красный	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фогеса- 22-25°C	+	-	+	-	-	-	P	+	-	-	-	-
Проскауэра 37-38°C	-	-	P	-	-	-	P	+	-	-	-	-
Цитрат 22-25°C	-	-	+	P	-	P	P	P	-	+	+	+
Симмонса 37-38°C	-	-	P	+	-	P	P	P	-	+	+	+
Индол	P	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Сероводород	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Мочевина	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	P	-
Фенилаланин	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	P	-
Маннит	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Мальтоза	P	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Рамноза	-	P	+	+	-	-	-	-	-	P	-	-
Сорбит	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Подвиж- 22-25°C	+	+	+	P	P	+	+	+	+	+	+	+
Ность 37-38°C	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Примечания:* \* если не указана другая температура, представлены результаты тестов, проводимых при 37-38°C; \*\* кроме сальмонелл тифо-паратифозной группы; обозначения: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «P» - различные показатели у разных штаммов; «Г» - образование газа.

### 2.5. Определение патогенности выделенных культуриерсиний

2.5.1. Определение патогенности культур *Y. enterocolitica* проводят с использованием "Тест-системы для идентификации патогенных штаммов *Yersinia enterocolitica*", в состав которой входят:

➤ сыворотка диагностическая к патогенным иерсиниям адсорбированная кроличья (СПИ) в разведении 1:10; 2 флакона по 10 мл;

➤ сыворотка нормальная кроличья в разведении 1:10; 2 флакона по 10 мл.

СПИ содержит агглютинины к поверхностным антигенам патогенных штаммов *Yersinia enterocolitica*, имеющих плазмиду вирулентности (pYV), и предназначена для идентификации плазмидосодержащих штаммов (pYV+) *Yersinia enterocolitica* в реакции агглютинации (РА) на стекле.

Сыворотка нормальная кроличья предназначена для контроля исследуемой культуры на отсутствие способности к спонтанной агглютинации.

Таблица 2.3

### Основные дифференциальные признаки *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* (при 37-

ТЕСТЫ	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. Pseudotuberculosis</i>
Сахароза	+	-
Рамноза	-	P
Сорбит	+	-
Орнитин-декарбоксилаза	+	-
Индол	P	-
Фогеса- 22-25°C	+	-
Проскауэра 37-38°C	-	-

2.5.2. Порядок применения тест-системы

2.5.2.1. Подготовка компонентов реакции

Культуру, предназначенную для исследования, выращивают на скошенном МПА в течение 24 ч при 37-38°C, а затем еще 24 ч - при 22-25°C с целью оптимального

формирования антигенов вирулентности у (pYV+) *Yersinia enterocolitica*. Для исследования в РА используют культуры, подвергнутые пересевам не более 5 раз при 22-38°C.

Сыворотки после вскрытия флаконов пригодны к использованию в течение трех месяцев при условии хранения в холодильнике при 2-10°C.

#### 2.5.2.2. Проведение РА на стекле

На предметное стекло или стеклянную пластину наносят одну каплю (0,04 - 0,05 мл) СПИ и рядом одну каплю нормальной сыворотки, в которых бактериологической петлей суспендируют исследуемую культуру иерсиний. После смешивания компонентов рекомендуется легкое покачивание предметного стекла или пластины.

#### 2.5.3. Учет результатов и оценка реакции

2.5.3.1. Реакцию учитывают в косо падающем свете на темном фоне визуальнo или с помощью лупы 5-7-кратного увеличения в течение 3-х минут после смешивания компонентов с оценкой в крестах по следующей схеме:

- ++++ - четко выраженный агглютинат с полным просветлением жидкости;
- +++ - хорошо выраженный агглютинат на фоне слабого помутнения жидкости;
- ++ - нечеткий агглютинат со слабым просветлением жидкости;
- +
- - гомогенная мутная жидкость.

#### 2.5.3.2. Оценка результатов реакции

Иерсинии, содержащие плазмиду вирулентности, должны давать положительную реакцию агглютинации



Рис. 5. РА на стекле с культурой патогенных (pYV+) *Y. enterocolitica*, выращенной на МПА (24 ч при 37°C + 24 ч при 26°C):  
слева - контроль (НКС),  
справа - положительная реакция (СПИ).

в капле СПИ с оценкой не менее чем на 3 креста в течение 3-х минут после смешивания компонентов, при отсутствии агглютината в капле нормальной сыворотки (допускается агглютинация с оценкой на один крест). В случае положительной реакции с СПИ и отрицательной - с нормальной кроличьей сывороткой (НКС) культуру *Y. enterocolitica* считают патогенной и относят к возбудителю болезни. Общий срок бактериологического исследования материала - до 8 суток.

#### 2.6. Оформление результатов бактериологического исследования

Результаты бактериологического исследования формулируют следующим образом: при положительном результате - "Из присланного материала (указать какого) выделен возбудитель иерсиниоза (указать вид бактерий)", при отрицательном результате - "В присланном материале (указать каком) возбудитель иерсиниоза не обнаружен".

### Алгоритм идентификации и дифференциации энтеропатогенных иерсиний

ТЕСТЫ	РЕЗУЛЬТАТЫ	
Оксидаза	-	-
Глюкоза	К	К
Цитрат Симмонса	-	-
Мочевина (уреаза)	+	+
Сахароза	+	-
Салицин	-	-/+
Сорбит	+	-
Рамноза	-	+
Глицерин	+	+/-
Мальтоза	+	+

ВИД	<i>Y. enterocolitica</i>		<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Индол	+	-	-
Ксилоза	+	+	-

БИОВАР	II	III	IV	-
--------	----	-----	----	---

## 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИЕРСИНИОЗА\*

3.1. Выявление возбудителя иерсиниоза проводят методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) при помощи тест-системы на ДНК *Yersinia enterocolitica* ("ЭНТЕРКОЛ").

В основе метода лежит амплификация специфического участка ДНК возбудителя за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных заготовок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с использованием фермента Таq-полимеразы и дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов.

Тест-система предназначена для выявления ДНК возбудителя иерсиниоза *Yersinia enterocolitica* в фекалиях животных, моче, содержимом кишечника, лимфатических узлах, внутренних органах, крови, молоке, кормах и воде.

3.2. В состав тест-системы, рассчитанной на 100 анализов, включая контрольные пробы, входят:

- набор для выделения ДНК (набор «ДНК-сорб-В»);
- набор для проведения ПЦР - амплификации участка ДНК (набор «АмплиСенс-100»);
- набор для электрофоретического анализа продуктов ПЦР (набор «ЭФ-200»);
- набор контрольных образцов (вкладывается в набор «АмплиСенс-100»).

Транспортируют и хранят тест-систему при температуре 2-8°C. Тест-система пригодна для применения в течение 6 мес от даты изготовления.

3.2.1. Набор для выделения ДНК состоит из следующих компонентов:

- лизирующий раствор (1 флакон; 30,0 мл);
- отмывочный раствор № 1 (1 флакон; 30,0 мл);
- отмывочный раствор № 2 (1 флакон; 100,0 мл);
- суспензия сорбента (2 пробирки по 1,25 мл);
- буфер для элюции ДНК (2 пробирки по 5,0 мл);

3.2.2. Набор для проведения ПЦР состоит из следующих компонентов:

- ПЦР-смесь № 1 «*Y. enterocolitica*» (1 проб.: 0,55 мл);
- ПЦР-смесь № 2 «2,2 мМ Mg<sup>++</sup>» (1 пробирка; 1,2 мл);
- воск для ПЦР (1 пробирка; 1,7 мл);
- масло минеральное (2 флакона по 4,0 мл).

3.2.3. Набор для электрофоретического анализа продуктов ПЦР состоит из следующих компонентов:

- концентрат буфера с бромидом этидия (2 по 25,0 мл);
- агароза для электрофореза (2 флакона по 1,8 г).

3.2.4. Набор контрольных образцов состоит из следующих компонентов:

- положительный контрольный образец (ПКО) ДНК *Y. enterocolitica* (1 пробирка; 0,1 мл);
- отрицательный контрольный образец (ОКО) (1 пробирка; 1,6 мл);
- ДНК-буфер для разведения и хранения ДНК-контролей (1 пробирка; 1,0 мл).

### 3.3. Отбор материала для исследования

3.3.1. При отборе образцов материала, а также при подготовке проб для исследования необходимо соблюдать как меры личной безопасности, так и меры, предупреждающие обсеменение объектов внешней среды, руководствуясь при этом соответствующими правилами и инструкциями.

3.3.2. Для исследования используют фекалии животных (свежие порции), мочу, содержимое

кишечника, лимфатические узлы, кусочки паренхиматозных органов вынужденно убитых или погибших животных, кровь, молоко, корма, сточные воды.

3.3.3. Материалы доставляют в лабораторию в день взятия или на следующий день. Допускается хранение материала при минус 20°C в течение 30 сут.

3.3.4. Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся пипеточными дозаторами переменных объемов (типа "Ленпипет") с использованием одноразовых полипропиленовых пробирок вместимостью 1,5 мл и 10,0 мл (ПО "Ленполимер") и наконечников с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) после использования необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий 10%-ный раствор хлорной извести или 5%-ный раствор хлорамина Б. После 24-часовой дезинфекции раствор выливают в канализацию, а отработанный пластик выбрасывают в мусорный контейнер.

3.3.5. Пробы фекалий массой 0,3-0,8 г тщательно суспендируют в 5,0 мл фосфатного буфера или физиологического раствора. Смесь центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость (супернатант) переносят в пробирку типа «эппендорф» и 0,1 мл его используют для выделения ДНК.

3.3.6. Пробы паренхиматозных органов размером 1 см<sup>3</sup>, а лимфоузлы целиком помещают в пробирки вместимостью 5-10 мл, тщательно растирают отдельными стеклянными палочками, тефлоновыми пестиками и т.п. (при необходимости пользуются стерильными фарфоровыми ступками с пестиками, стеклянными гомогенизаторами), добавляют по 1 мл фосфатного буфера (т.е. примерно равный объем) и тщательно перемешивают. Смесь отстаивают при температуре 20-25°C. Через 30 мин верхнюю фазу переносят в пробирки вместимостью 1,0-1,5 мл и используют для выделения ДНК.

3.5.7. Пробы молока и других жидкостей, кроме крови, в объеме 10 мл (при необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления физиологического раствора), центрифугируют при 10 тыс об/мин. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив примерно 0,2 мл жидкости, которую смешивают с осадком и 0,1 мл суспензии используют для выделения ДНК.

3.3.8. Кровь в объеме 5-10 мл берут в пробирки, содержащие 3 %-ный раствор трилона Б (ЭДТА), из расчета 10:1, и используют для выделения ДНК без предварительной подготовки.

3.3.9. Корма в количестве 1 г помещают в пробирки вместимостью 5-10 мл, тщательно растирают отдельными стеклянными палочками, тефлоновыми пестиками и т.п. (при необходимости пользуются фарфоровыми ступками с пестиками, стеклянными гомогенизаторами), добавляют по 1 мл фосфатного буфера или физ. раствора (т.е. примерно равный объем) и тщательно перемешивают. Смесь отстаивают при 20-25°C в течение 30 мин, затем верхнюю фазу переносят в пробирки вместимостью 1,0-1,5 мл, ее используют для выделения ДНК.

\* Используется в лабораториях, имеющих условия для проведения амплификации и анализа фрагментов нуклеиновых кислот.

### 3.4. Проведение ПЦР-анализа

ПНР-анализ проводят в три этапа в отдельных комнатах(зонах).

3.4.1. **ЗОНА 1** (для выделения ДНК из испытуемого материала).

Оборудование:

- настольный бокс с бактерицидной лампой типа "Циклотемп" (СП "РТС");
- термостат для пробирок типа "эппендорф" на 25-100°C (например, фирмы "Биоком");
- микроцентрифуга до (12-16) $\cdot 10^3$  об/мин ("Elmi", "Hettish" или др.);
- центрифуга/вортекс типа "Micro-Spin", "Minigen" ("Биоком");
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером (например, фирм "Биоком", "Хеликон");
- одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл типа "эппендорф" (например, "Хеликон");
- холодильник на 2-8°C с морозильной камерой на минус 18-20°C.

3.4.2. **ЗОНА 2** (для проведения амплификации - ПЦР).

Оборудование:

- амплификатор(например, фирм "ДНК-технология", "Perkin Elmer");
- ПЦР-бокс типа "Циклотемп" (СП "РТС") или отдельный столс УФ-лампой;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- одноразовые наконечники в штативах;
- одноразовые микропробирки для ПЦР на 0,5 мл (например, "Хеликон");
- штативы для микропробирок на 0,5 мл;
- холодильник на 2-8°C, морозильник на минус 18-20°C для хранения выделенной ДНК;
- термостат для микропробирок с воском на 95°C (например, "Биоком").

3.4.3. **ЗОНА 3** (для электрофоретического анализа продуктов ПЦР).

Оборудование:

- камера для горизонтального электрофореза на 50 проб (например, фирм "Хеликон", "ДНК-технология");
- источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например, "ДНК-технология");
- ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей (например, фирмы "Биоком");
- фотоаппарат для фотографирования гелей или видеосистема с цифровой видеокамерой;
- фотопленка "Микраг-300", бачок для проявления пленки, проявитель, фиксаж;
- аквадистиллятор;
- отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки;
- отдельная автоматическая пипетка 10-40 мкл и наконечники в штативе;
- мерный цилиндр вместимостью 1 л;
- колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы;
- электроплитка или микроволновая печь для плавления агарозы;
- пластиковая емкость для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

### 3.5. Порядок работы

3.5.1. ЭТАП 1 (зона №1). Выделение ДНК из исследуемого материала.

3.5.1.1. Подготовительная часть работы

Проверяют состояние сорбента: при отстаивании он должен занимать приблизительно половину объема суспензии.

Лизирующий раствор после хранения при 2-8°C прогревают при 65°C до полного растворения кристаллов.

Готовят контрольные пробы первого этапа анализа (контроли выделения ДНК). В две пробирки вместимостью 1,5 мл вносят по 100,0 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО из набора контрольных образцов).

Если подготовка проб велась с использованием физиологического раствора, то готовят еще один отрицательный контроль (50 мкл физиологического раствора смешивают с 50 мкл ОКО).

3.5.1.2. Основная часть работы

В маркированные пробирки вместимостью 1,5 мл, установленные в штатив, вносят по 100,0 мкл исследуемых проб. Продолжая этот ряд, в штатив устанавливают пробирки контролей выделения ДНК. Во все пробирки добавляют по 300 мкл лизирующего раствора (в каждую пробу отдельным наконечником с аэрозольным барьером) и тщательно перемешивают на вортексе или пипетируют 5-10 раз до полного лизиса пробы, стараясь при этом не вспенивать раствор.

Прогревают пробирку 5 мин при 65°C, еще раз тщательно перемешивают на вортексе и центрифугируют на микроцентрифуге при 5000 об/мин в течение 5 с для сброса капель с крышки пробирки. Если биологическая проба растворилась не полностью, пробирку необходимо центрифугировать на микроцентрифуге при (10-12) $\cdot 10^3$  об/мин в течение 5 мин и перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Положительный контроль выделения ДНК («ПК») получают путем добавления в одну из пробирок со 100 мкл лизированного ОКО 10 мкл ПКО ДНК *Y. enterocolitica*.

Оставшаяся пробирка с ОКО служит отрицательным контролем выделения ДНК («ОК»).

В каждую пробирку отдельным наконечником добавляют 20 мкл сорбента, ресуспендированного на вортексе, хорошо перемешивают содержимое пробирок на вортексе и оставляют в штативе на 2 мин для осаждения сорбента, еще раз перемешивают и отстаивают 5-10 мин.

Осаждают сорбент на микроцентрифуге при 5000 об/мин в течение 30 с, после чего удаляют надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником. Для этого удобно использовать вакуумный отсос с колбой-ловушкой для отбираемой жидкости.

В пробирку вносят по 300 мкл отмывочного раствора №1. Содержимое пробирки перемешивают на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Если сорбент плохо разбивается, тогда его разбивают пипетированием, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Необходимо помнить, что во избежание перекрестной контаминации реакционной смеси, открывать пробирку можно лишь "сбросив" капли с крышки кратковременным центрифугированием: 5 с при (5-10) $\cdot 10^3$  об/мин.

**Программа для амплификации ДНК  
*Y. enterocolitica* в зависимости от типа  
амплификатора**

<i>с регулированием температуры по матрице</i> (скорость нагрева-охлаждения - не менее 1°C/сек)	<i>с активным регулированием температуры</i> (по раствору в пробирке)
Например, «Ампли-3» (Биоком), «MiniCycler», «PТС-100»(MJ Research) или др.	«GeneAmp PSR System 2400» (Perkin Elmer), «Терцик» (ДНК-технология) или др.
95°C; 5 мин 1 цикл	95°C; 5 мин 1 цикл
95°C; 1 мин } 42 цикла	95°C; 10 с } 42 цикла
65°C; 1 мин } 42 цикла	65°C; 10 с } 42 цикла
72°C; 1 мин } 42 цикла	72°C; 10 с } 42 цикла
72°C; 2 мин 1 цикл	72°C; 2 мин 1 цикл
10°C; 12-14 час (хранение)	10°C; 12-14 час (хранение)

*Примечание:* длина амплифицированного специфического фрагмента ДНК *Y. enterocolitica* - 270 п.н.

Осаждают сорбент на микроцентрифуге при 5000 об/мин в течение 30с и удаляют супернатант, как указано выше.

Вносят по 500 мкл отмывочного раствора №2. Содержимое пробирки перемешивают на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, осаждают сорбент на микроцентрифуге при 10000 об/мин в течение 30 с, затем удаляют супернатант.

Повторяют процедуру отмывки раствором №2, удаляют супернатант и высушивают осадок сорбента при открытых крышках пробирок в термостате при 65°C в течение 5-7 мин.

В пробирки вносят по 50 мкл элюирующего буфера, ресуспендируют осадок, помещают в термостат при 65°C на 5-6 мин, встряхивая каждую пробирку на вортексе через минуту. Центрифугируют смесь на микроцентрифуге при  $(10-12) \times 10^3$  об/мин в течение 1 мин. Супернатант содержит очищенную ДНК, которую используют в ПЦР.

3.5.2. ЭТАП 2 (зона №2). Постановка ПЦР (амплификация участка ДНК).

3.5.2.1. Подготовительная часть работы

Пробирку с воском ставят в термостат при 95°C до полного его расплавления.

В микропробирки для ПЦР вносят по 5,0 мкл ПЦР-смеси №1, сверху наслаивают по 10,0 мкл расплавленного воска так, чтобы он полностью покрыл жидкость, закрывают крышки, на верхней части которых делают пометки "У.е.". Если воск покрыл жидкость неровно или образовались пузырьки воздуха, то пробирки прогревают в амплификаторе в течение 2 мин при 95°C, после чего охлаждают. В таком виде пробирки хранят в морозильной камере холодильника в течение нескольких месяцев. Можно приготовить сразу 100 пробирок.

Готовят положительный контроль ПЦР (ПКО) - ДНК *Y. enterocolitica*. Для хранения ПКО ДНК *Y. enterocolitica* его разводят в 10 раз ДНК-буфером (см. паспорт к ПКО).

3.5.2.2. Основная часть работы

В штатив ставят ряд пробирок с ПЦР-смесью №1 в соответствии с количеством испытуемых проб, включая контрольные из 1-го этапа анализа (контроли выделения ДНК), продолжая ряд, добавляют 2 пробирки для контролей второго этапа анализа (контроли ПЦР). Пробирки маркируют.

На поверхность застывшего воска вносят по 10,0 мкл ПЦР-смеси № 2, при этом она не должна проникать под воск и смешиваться с ПЦР-смесью № 1. В противном случае пробирку бракуют и утилизируют.

Сверху вносят по 1 капле минерального масла. Под масло вносят по 10 мкл испытуемых ДНК-проб и контролей выделения ДНК. В пробирку отрицательного контроля амплификации («К-») вносят 10 мкл ДНК-буфера для разведения ДНК (набор контрольных образцов). В пробирку положительного контроля амплификации вносят 10 мкл приготовленного 10-кратного разведения ПКО ДНК («К+»).

Набирают на амплификаторе нужную программу (см. таблицу 5.1.). Через 1-2 мин после запуска программы, когда температура в ячейке амплификатора достигнет 95°C, ставят программу на паузу, помещают пробирки в ячейки, закрывают крышку прибора, убирают паузу и ждут окончания реакции (2,5 часа на амплификаторе с регулированием температур по матрице и 1 час 40 мин на амплификаторе с активным регулированием).

После окончания реакции (в тот же день или после хранения утром следующего дня) собирают пробирки в отдельный пакет (одноразовый штатив) и отправляют в комнату (зону 3) для анализа продуктов ПЦР, проводимого разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

3.5.3. ЭТАП 3 (зона № 3). Электрофоретический анализ продуктов ПЦР

Работа с амплифицированными ДНК должна проводиться в отдельной комнате лаборантом или сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в пре-ПЦР помещении ("Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения.", утвержденные Департаментом ветеринарии МСХ РФ 27 января 1997 г. (№13-7-2/840).

3.5.3.1. Подготовительная часть работы

В мерный цилиндр наливают 25,0 мл концентрированного буфера, объем доводят дистиллированной водой до 500,0 мл, закрывают цилиндр парафинированной пленкой ("PARAFILM") и перемешивают.

Агарозу из одной пробирки набора пересыпают в стеклянную колбу из термостойкого стекла объемом 250 мл, наливают 100 мл готового буфера и расплавляют на электроплитке или в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Если используется электроплитка, содержимое колбы необходимо периодически перемешивать стеклянной палочкой, чтобы предотвратить пригорание агарозы.

После расплавления агарозы ее осторожно перемешивают, доводят до кипения и немного охлаждают, вращая колбу. Затем заливают агарозный гель в форму по размеру используемой камеры толщиной слоя 5-6 мм. Гребенки помещают на расстоянии не менее 3 см друг от друга. После полного застывания геля (примерно через 30 мин) осторожно вынимают гребенки, не повредив лунки. Помещают пластину геля в электрофорезную камеру лунками в сторону отрицательного электрода (ДНК из лунки должна двигаться к положительному электроду). Наливают приготовленный буфер в таком объеме, чтобы он покрывал поверхность геля на 4-5 мм.

### 3.5.3.2. Основная часть работы

Пробирки с продуктами амплификации размещают в штативе последовательно. Из-под слоя масла отбирают 12,5 мкл амплификата и вносят его на дно лунки. Можно пользоваться одним наконечником, промывая его (пипетируя 1-2 раза) буфером из камеры после внесения каждой пробы.

Камеру подключают к источнику тока, соблюдая полярность. Если нет нарушения контактов, то при прохождении тока от электродов должны подниматься пузырьки. Электрофорез проводят в градиенте напряжения 10 В/см до того момента пока краситель (ксиленцианол) не пройдет примерно половину длины геля. Затем выключают источник тока, переносят гель на трансиллюминатор, расположив его горизонтально лунками вверх. Просматривают расположение полос ДНК под ультрафиолетовым излучением. Глаза и лицо должны быть защищены специальной маской или стеклянной пластиной.

Электрофореграмму фотографируют, используя оранжевый светофильтр в проходящем ультрафиолете на поляроидную пленку или "Микрат 300", указав порядок нанесения проб. Документирование результатов можно проводить с помощью других систем: Insta Doc I, Insta Doc II (фотографирующие), Gel Doc 1000 или Шатер ДВ (компьютерные).

После использования буфера и геля, содержащих бромид этидия, их необходимо дезактивировать. Для этого к одному объему буфера и геля добавляют равные объемы 0,5 М  $KMnO_4$  и 2,5 М  $HCl$ , выдерживают смесь 4-6 часов, затем добавляют один объем 2,5 М  $NaOH$ , осторожно перемешивают и сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

### 3.6. Учет и интерпретация результатов

3.6.1. Учет результатов ПЦР-анализа следует начинать с результатов амплификации «контролей выделения ДНК» и «контролей ПЦР». В дорожке, соответствующей положительному контролю амплификации ПКО ДНК *Y. enterocolitica* (этап 2), должна быть яркая специфическая светящаяся полоса на уровне 270 п.н., такая же полоса должна присутствовать в дорожке соответствующей положительному контролю выделения ДНК (этап 1). В дорожках, соответствующих отрицательным контролям, такая полоса отсутствует (см. таблицу 5.2). Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу большей или меньшей интенсивности на том же уровне, что и полоса с ПКО ДНК *Y. enterocolitica*, т.е. 270 п.н.

Отрицательными считают пробы, в дорожках которых отсутствует специфическая полоса.

Кроме полос 270 п.н. могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, располагающиеся ниже уровня 100 п.н. (в нижней части дорожки).

Таблица 5.2

Учет результатов амплификации контрольных образцов

Контроли	Название реагента	Наличие полосы 270 п.н.
1-го этапа	ОКО	-
	ОКО + физиологический раствор	-
	ОКО + ПКО ДНК <i>Y. enterocolitica</i>	+
2-го этапа	Буфер для элюции	-
	ПКО ДНК <i>Y. enterocolitica</i> 1:10	+

Если результаты анализа контрольных образцов не совпадают с показателями, приведенными в таблице 5.2., то соответствующий этап анализа считают невыполненным и исследование повторяют. При несоблюдении температурного режима могут появляться слабые полосы на разных уровнях, отличающихся от 270 п.н. Если интерпретация результатов затруднена, необходимо провести повторную ПЦР теми же ДНК-пробами.

Повторную ПЦР следует также провести при наличии специфической полосы очень низкой интенсивности (гораздо ниже интенсивности положительных контролей). Если первично полученный результат не повторяется, то его считают сомнительным. Для уточнения результата необходимо провести повторное исследование.

При работе с материалом, содержащим значительное количество клеток (кровь, лимфатические узлы, селезенка и пр.) в ПНР участвует большое количество неспецифической геномной ДНК. В таких случаях в дорожках геля появляются характерные шмеры, равномерно располагающиеся от лунки до самого низа дорожки или концентрирующиеся около лунки. На фоне шмера в положительном образце видна специфическая полоса. При наличии большого количества геномной ДНК может происходить ингибирование ПЦР (в дорожке отсутствует специфическая полоса 270 п.н.), в этом случае рекомендуется переставить амплификацию данной ДНК-пробы, разведя ее в 5 раз буфером для элюции (набор № 1).

3.6.2. Результаты анализа не учитываются, если в дорожке любого отрицательного контроля (выделения ДНК и (или) ПЦР) выявляется специфическая полоса, что может быть обусловлено контаминацией реактивов и проб положительной ДНК и (или) продуктами амплификации положительной ДНК в процессе работы. Для проверки реактивов необходимо поставить не менее трех отрицательных контролей на этапе выделения ДНК и столько же на этапе постановки ПЦР для выявления источника контаминации. Если результат повторяется, необходимо сменить реактивы.

3.7. Результаты молекулярно-генетического анализа формулируют следующим образом: при положительном результате - «В присланном материале (указать каком) обнаружена ДНК возбудителя иерсиниоза (указать вид бактерий)», при отрицательном результате - «В присланном материале (указать каком) ДНК возбудителя иерсиниоза не обнаружена.»

\* \* \*

С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают действие «Методические указания по выявлению *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* в пищевых продуктах животного происхождения», утвержденные Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ 23.09.1998 г.



## ПРИЛОЖЕНИЕ

### ГЛИЦЕРИНОВЫЙ РАСТВОР ДЛЯ КОНСЕРВИРОВАНИЯ ФЕКАЛИЙ

#### Состав:

- глицерин нейтральный, 300 мл;
- натрий хлористый, 5 г;
- вода дистиллированная, 700 мл.

Раствор стерилизуют при 1 атм (121°C) в течение 20 мин или прогревают в водяной бане (100°C) в течение 30-40 мин.

### И-БУЛЬОН

#### Состав основы среды:

- пептон - 5 г;
- дрожжевой экстракт - 2,5 г;
- натрий хлористый - 10 г;
- вода дистиллированная - до 500 мл;
- коммерческая селективная добавка для иерсиний (в расчете на 500 мл среды).

Все компоненты, за исключением селективной добавки, растворяют в воде и устанавливают pH 7,2-7,4. После этого среду кипятят 10-15 мин, фильтруют в горячем состоянии через бумажный фильтр и стерилизуют при 1 атм. (121°C) в течение 20 мин.

Коммерческую селективную добавку для иерсиний (например, FD034 компании HiMedia Laboratories Pvt. Limited) растворяют в 2 мл раствора этанола (1 мл 96° спирта-ректификата смешивают с 1 мл стерильной дистиллированной воды). Основу питательной среды охлаждают до 45-50°C и стерильной пипеткой вносят в нее спиртовой раствор селективной добавки, тщательно размешивают и разливают по 4-5 мл в стерильные пробирки.

**Коммерческая селективная добавка для иерсиний** (состав, в расчете на 500 мл основы питательной среды):

- цефсулодин - 7,5 мг;
- иргасан - 2,0 мг;
- новобиоцин - 1,25 мг.

### И-АГАР (M843 - Основа селективного агара для иерсиний)

#### Состав:

- пептон - 20 г;
- дрожжевой экстракт - 2 г;
- маннит - 20 г;
- натрия хлорид - 20 г;
- натрия пируват - 2 г;
- нейтральный красный - 0,03 г;
- кристаллический фиолетовый - 0,001 г;
- агар-агар - 12,5 г;
- иргасан (триклозан) - 0,004 г;
- вода дистиллированная - до 1000 мл.

Все компоненты, за исключением иргасана, растворяют в дистиллированной воде, устанавливают pH 7,2-7,4. После чего среду кипятят 10-15 мин, фильтруют в горячем состоянии через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при 0,5 атм (121°C) в течение 20 мин. Навеску иргасана, равную 4 мг, растворяют в 2 мл спиртово-водной смеси, которую готовят также, как для селективной добавки И-бульона, и вносят в основу среды, расплавленную и охлажденную до 45-50°C.

Среду тщательно размешивают и разливают в стерильные чашки Петри.

**Примечание:** Продажу основы среды (M843), селективной добавки (FD034) и иргасана (FD208) осуществляют представители компании **HiMedia Laboratories Pvt. Limited** по адресу: **124498, Москва, а/я 130. Контактные телефоны: (495) 940-33-12, 940-33-96, 940-33-97.**

### ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЕРСИНИЙ, СУХАЯ.

Среду готовят согласно указанию на этикетке флакона. Заявки на приобретение среды направлять по адресу: 367025, Республика Дагестан, г. Махачкала, ул. Леваневского, 24, отделение НПО "Питательные среды". Контактные телефоны: (872)2-62-82-30; 2-62-47-68

### СРЕДА С ЖЕЛЧЬЮ И БРОМТИМОЛОВЫМ СИНИМ (СБТС)

СБТС изготавливает НПО "Питательные среды" при Государственном научном центре прикладной микробиологии. Среду готовят согласно указанию на этикетке флакона. Заявки на приобретение среды направляют по адресу:

142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ГНЦПМ, отделение "Питательные среды". Контактные телефоны: (0967) 36-00-92, 36-00-99.

### ТЕСТ НА КАТАЛАЗУ

Этот тест дает возможность определить наличие или отсутствие фермента каталазы, за счет которого разлагается перекись водорода с образованием молекулярного кислорода.

Тест проводят с односуточной агаровой культурой. На зону роста наносят несколько капель 3%-ного раствора перекиси водорода. Для теста непригодны культуры, выращенные на средах с добавлением крови, так как каталаза крови может давать ложный положительный результат. Исследование культуры можно проводить на предметном стекле в капле реактива, суспендируя в нем исследуемую культуру запаянным концом пастеровской пипетки или стеклянной палочки. О положительном результате свидетельствует активное выделение пузырьков газа. Реактив хранят в стеклянной посуде из темного стекла в холодильнике (4-6°C).



## ТЕСТ НА ОКСИДАЗУ

Данный тест позволяет выявлять наличие фермента оксидазы. Определение оксидазной активности проводят у односуточной культуры бактерий, выращенной на скошенном МПА при 22-25°C. Культуру снимают с поверхности агара платиновой петлей (петли из другого металла не используют, т.к. могут появиться ложные положительные результаты) или запаянным концом пастеровской пипетки и суспендируют в 1%-ном водном растворе тетраметил-парафенилендиамина дигидрохлорида или диметил-парафенилендиамина гидрохлорида.

Навески тетраметил-парафенилендиамина дигидрохлорида или диметил-парафенилендиамина гидрохлорида по 100 мг вносят в пробирки с ватными пробками. Пробирки хранят в сосуде из темного стекла. На дно сосуда насыпают немного сернокислого кальция для поглощения влаги. Перед использованием к содержимому одной пробирки добавляют 10 мл дистиллированной воды, растворяют реактив и переливают раствор в небольшую капельницу. Водные растворы стабильны в течение одной недели при хранении в холодильнике (4-6°C) или неограниченно долго в замороженном состоянии.

При наличии фермента оксидазы суспензия приобретает красный цвет (положительная реакция), указывающий, что выделенная культура не относится к семейству энтеробактерий.

Для определения оксидазы можно использовать оксидазную индикаторную бумагу (входит в состав СИБ, выпускаемых предприятием по производству бактериальных препаратов Нижегородского НИИЭМ), на которую наносят культуру стеклянной палочкой или платиновой петлей.

## СРЕДА КЛАРКА (используется для реакций с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра)

### Состав:

- пептон - 5 г;
- глюкоза - 5 г;
- калия гидрофосфат ( $K_2HPO_4$ ) - 5 г;
- вода дистиллированная - до 1000 мл.

Компоненты растворяют в воде, кипятят 2-3 мин, фильтруют через бумагу, устанавливают pH 6,9-7,0. Среду разливают в пробирки по 4 мл и стерилизуют 20 мин при 112°C или текучим паром три дня подряд по 20 мин.

## ПРОБА С МЕТИЛОВЫМ КРАСНЫМ

Проба с метиловым красным позволяет определять способность бактерий образовывать стабильные кислые конечные продукты при сбраживании глюкозы. При расщеплении глюкозы, содержащейся в этой среде, происходит снижение pH среды, что улавливается при помощи индикатора метилового красного в диапазоне pH 4,4-6,0.

В среду Кларка, разлитую в пробирки по 4 мл, засевают бактериологической петлей испытуемую культуру и инкубируют при 22-25°C в течение 2 сут.

Для проведения реакции в пробирку с выросшей культурой добавляют 5-6 капель спиртового раствора метилового красного. Изменение соломенного цвета среды на красно-малиновый свидетельствует о положительной реакции (pH 4,0-5,0); при

отрицательном результате среда приобретает желтый цвет (pH 6,0-7,0); оранжевая окраска указывает на сомнительную реакцию.

## Раствор метилового красного

Раствор метилового красного готовят путем добавления 0,01 г кристаллической краски к 30 мл 96° этилового спирта. После растворения красителя добавляют 20 мл дистиллированной воды. Хранят реактив при комнатной температуре. Срок хранения - 1 год в темном месте.

## РЕАКЦИЯ ФОГЕСА-ПРОСКАУЭРА

Реакция Фогеса-Проскауэра позволяет определять способность микроорганизмов образовывать при сбраживании глюкозы ацетилметилкарбинол (ацетонин). Испытуемую культуру выращивают 2 сут в среде Кларка в двух пробирках. Одну пробирку инкубируют при 25°C, другую при 37°C. Из обеих пробирок переносят по 2 мл культуры в другие чистые пробирки и добавляют в каждую вначале по 1,0 мл 6%-ного спиртового раствора а-нафтола, а затем 0,4 мл 40%-ного водного раствора КОН. Содержимое пробирок встряхивают и проводят учет реакции через 15-30 мин. При положительной реакции (наличие ацетилметилкарбинола) культура окрашивается в розовый цвет; при отрицательной - в желтый; при сомнительной - в светло-оранжевый. 6%-ный а-нафтол в 96° этиловом спирте хранят в темном месте при комнатной температуре не более 30 суток.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОВОДОРОДА

Источником образования сероводорода могут быть различные соединения серы: органические (цистеин, цистин, метионин) и неорганические (сульфат, сульфит, тиосульфат).

При наличии у микроорганизмов фермента тиосульфатредуктазы тиосульфат натрия восстанавливается в сульфит с выделением сероводорода. Сероводород взаимодействует с сернокислым железом, образуя сульфит железа черного цвета. Для обнаружения сероводорода используют следующие среды.

## Среда для обнаружения сероводорода

### Состав:

- железа (II) сульфат ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) - 0,2 г;
- натрия тиосульфат ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ) - 0,3 г;
- лактоза - 1 г;
- феноловый красный (0,2%-ный водн.) - 12 мл;
- мясо-пептонный агар (МПА; 1,7%-ный) - До 1000 мл.

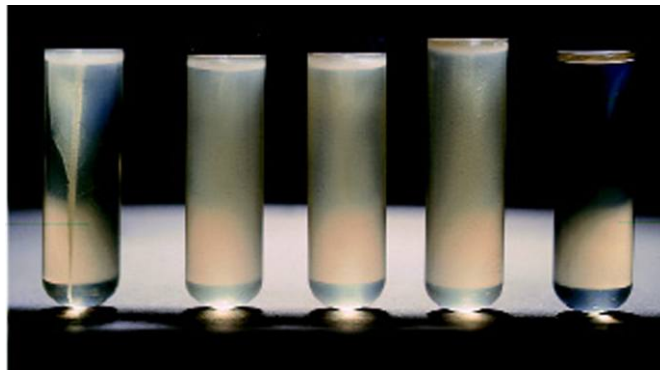


Рис. 7. Определение подвижности на полужидком агаре производства компании HiMedia (M260): крайняя пробирка справа - незасеянная среда (контроль)

В расплавленном стерильном МПА растворяют остальные компоненты, разливают в стерильные пробирки по 6-7 мл и стерилизуют текучим паром однократно в течение 20 мин. Готовая среда имеет бордово-красный цвет.

Перед употреблением среду скашивают так, чтобы столбик агара был не менее 2,5-3 см. Среду засевают агаровой культурой бактерий вначале на скошенную поверхность, а затем уколом в столбик. В случае образования сероводорода среда в столбике окрашивается в черный цвет. При отрицательном результате почернения средине наступает.

### Среда Клиглера

#### Состав:

- мясная вода- 1000 мл;
- пептон- 20 г;
- натрия хлорид- 5 г;
- натрия сульфат ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )- 0,4 г;
- натрия тиосульфат ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )- 0,08 г;
- агар питательный, сухой- 20 г;
- лактоза- 10 г;
- сахароза- 10 г;
- глюкоза- 1 г;
- железа (II) сульфат ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )- 0,5 г;
- феноловый красный (0,2%-ный раствор в 50%-ном этаноле)- 12 мл.

В мясную воду добавляют пептон, соли натрия и агар. Смесь кипятят до растворения агара, устанавливают рН 7,2-7,4. Вновь кипятят, фильтруют через вату, добавляют растворенное в небольшом количестве воды сернокислое железо, лактозу, сахарозу, глюкозу и индикатор. Среду разливают по 6-7 мл в пробирки, автоклавируют 15-20 мин при 0,5 атм ( $112^\circ\text{C}$ ). Готовая среда оранжево-красного цвета. При образовании сероводорода столбик среды чернеет.

Коммерческую сухую среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке.

### Трехсахарный агар с мочевиной по Олькеницкому

Эту среду применяют также для определения способности микроорганизмов сбраживать те или иные углеводы, добавленные в основную среду, с образованием или без образования газа.

#### Состав:

- агар питательный, сухой- 25 г;
- лактоза- 10 г;
- сахароза- 10 г;
- глюкоза- 1 г;
- железа (II) аммонийного сульфат [ $\text{FeSO}_4 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ]- 0,2 г;
- натрия тиосульфат ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )- 0,3 г;
- мочевины- 10 г;
- феноловый красный (0,4%-ный водный раствор)- 4 мл;
- вода дистиллированная- до 1000 мл.

Соли растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды. Углеводы и мочевины также растворяют в небольших объемах воды при подогревании в водяной бане. Сухой питательный агар расплавляют в оставшемся объеме воды при нагревании и помешивании. Затем все ингредиенты смешивают с расплавленным агаром, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают рН 7,2-7,4. После

добавления индикатора среду хорошо перемешивают, разливают в пробирки по 6-7 мл. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 20 мин или при 0,5 атм ( $112^\circ\text{C}$ ) 15 мин. Среду скашивают, оставляя столбик не менее 2,5-3,0 см. Готовая среда бледно-розового цвета. Учет результатов проводят через 24 и 48 часов.

При образовании сероводорода происходит почернение среды в столбике. О ферментации лактозы и сахарозы в средах Клиглера и Олькеницкого судят по появлению желтой окраски в скошенной части агара. О ферментации глюкозы - по окрашиванию столбика в аналогичный цвет. В культурах, ферментирующих лактозу и сахарозу, вся среда (столбик и косяк) приобретает желтый цвет. Газообразование устанавливают по наличию пузырьков в среде, разрывов агара или его отслоению от дна и стенок пробирок.

В случае гидролиза мочевины происходит окрашивание столбика и косяка среды Олькеницкого в малиновый цвет.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ФЕРМЕНТАЦИИ УГЛЕВОДОВ

Для изучения ферментации углеводов с образованием кислоты или кислоты и газа используют среды Гисса.

#### Состав:

- пептон- 10 г;
- натрия хлорид- 5 г;
- индикатор Андреде- 10 мл;
- углевод для теста- 10 г.
- вода дистиллированная- до 1000 мл;

Среду нагревают до полного растворения компонентов. Затем фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 7,0-7,2, добавляют углевод. Приготовленную среду разливают в пробирки со стеклянными поплавками по 5 мл и стерилизуют при  $112^\circ\text{C}$  15 мин.

### Индикатор Андреде

#### Состав:

- фуксин кислый- 0,2 г;
- натрия гидроксид (1 N раствор NaOH)- 16 мл;
- дистиллированная вода- до 100 мл.



Рис. 7. Определение сахаролитической активности и образования сероводорода на трехсахарном железосодержащем агаре производства компании HiMedia (M021): крайняя пробирка слева - незасеянная среда (контроль)

Индикатор стерилизуют автоклавированием при 121°C в течение 20 мин. Фуксин растворяют в дистиллированной воде, затем добавляют NaOH. Раствор выдерживают в течение суток. Если фуксин недостаточно обесцветился (не бледно-желтого цвета), добавляют дополнительно 0,1-0,2мл щелочи.

Для изучения ферментативных свойств бактерий можно использовать сухие питательные среды с углеводами и индикатором ВР (НПО "Питательные среды"), которые готовят согласно указанию на этикетке, или готовые бумажные тест-системы.

### ГИДРОЛИЗ МОЧЕВИНЫ

Уреазоактивные бактерии гидролизуют мочевину с образованием аммиака и углекислоты. При этом рН среды сдвигается в щелочную сторону, что устанавливают при помощи индикатора фенолового красного.

Для определения способности бактерий расщеплять мочевину применяют среды с мочевиной по Кристенсену или по Преусу.

#### Среда Кристенсена

##### Состав:

- пептон - 1 г;
- натрия хлорид - 5 г;
- агар-агар - 20 г;
- калия дигидрофосфат ( $KH_2PO_4$ ) - 2 г;
- глюкоза - 1 г;
- феноловый красный (0,2%-ный раствор) - 6 мл;
- мочевина (20%-ный водный раствор) - 100 мл;
- вода дистиллированная - 900 мл.

Все компоненты, кроме мочевины, растворяют в воде, устанавливают рН 6,9-7,0 и стерилизуют 15-20 мин при 112° С. Раствор мочевины, профильтрованный через фильтр Зейтца, добавляют в расплавленную и охлажденную до 50°C стерильную среду и тщательно размешивают. Перед употреблением среду расплавляют, разливают в пробирки по 5 мл и скашивают. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет.

#### Среда Преуса

##### Состав:

- бульон Хоттингера или мартеновский бульон - 1000 мл;
- агар-агар - 15 г;
- глюкоза - 5 г;
- мочевина (50%-ный водный раствор) - 20 мл;
- бромтимоловый синий (0,2%-ный раствор) - 12 мл.

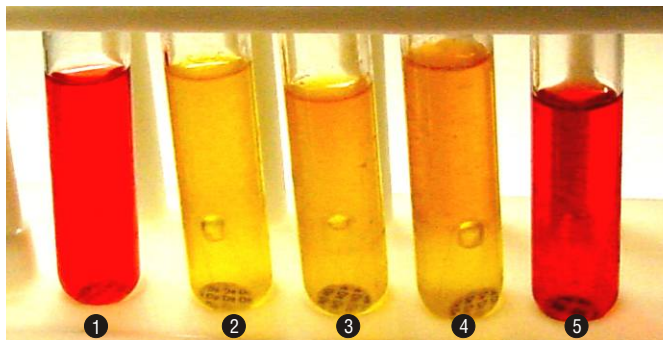


Рис. 8. Определение сахаролитической активности с помощью дифференциальных дисков HiMedia (DD): 1 - рост *Alcaligenes faecalis*; 2-4 - рост энтеробактерий (кислота+газ); 5 - незасеянная среда (контроль)

К стерильному расплавленному агару в бульоне Хоттингера или мартеновском бульоне с рН 6,9-7,0 добавляют глюкозу, растворы мочевины и индикатор бромтимоловый синий. Расплавленную среду разливают в стерильные пробирки по 5 мл и стерилизуют однократно текучим паром 20-30 мин или при 112°C в течение 15 мин. Перед употреблением среду расплавляют и скашивают. Готовая среда имеет зеленовато-оливковый цвет.

Испытуемую культуру засевают на одну из сред с мочевиной частыми штрихами и инкубируют при 37°C в течение 2 сут. При положительном результате (щелочение среды) среда Кристенсена окрашивается в красно-малиновый цвет, а среда Преуса - в синий; при отрицательном результате окраска этих сред не изменяется.

### УТИЛИЗАЦИЯ ЦИТРАТА НАТРИЯ

Способность иерсиний утилизировать соли цитрата в качестве единственного источника углерода определяют путем посева на среду Симмонса.

#### Среда Симмонса

##### Состав:

- натрия хлорид - 5 г;
- магния сульфат ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) - 0,2 г;
- аммония дигидрофосфат ( $NH_4H_2PO_4$ ) - 1 г;
- калия гидрофосфат ( $K_2HPO_4$ ) - 1 г;
- натрия цитрат - 3 г;
- агар питательный сухой - 20 г;
- бромтимоловый синий - 0,08 г;
- дистиллированная вода - до 1000 мл.

В дистиллированной воде расплавляют агар. Соли растворяют отдельно в небольшом объеме воды и затем смешивают с расплавленным агаром, доводя объем до 1000 мл. Устанавливают рН 7,0-7,2, после чего добавляют 40 мл 0,2%-ного водного раствора бромтимолового синего, компоненты перемешивают. Среду разливают по 5-7 мл в пробирки и стерилизуют 15 мин при 121°C. Перед употреблением среду скашивают. При положительной реакции отмечается рост культуры на среде и изменение зеленовато-оливкового цвета на синий. При отсутствии у бактерий способности усвоения цитратных солей роста культуры не наблюдается и цвет среды не изменяется.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНИЛАЛАНИНДЕЗАМИНАЗЫ

Метод основан на выявлении фенилпировиноградной кислоты, образующейся из фенилаланина. Культуру высевают на среду, содержащую фенилаланин.

##### Состав:

- дрожжевой экстракт (сухой) - 3 г;
- натрия хлорид - 5 г;
- L-фенилаланин - 1 г;
- натрия гидрофосфат ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ) - 1 г;
- агар питательный сухой - 12 г;
- вода дистиллированная - до 1000 мл.

После растворения дрожжевого экстракта в воде среду нагревают, добавляют остальные компоненты и кипятят до расплавления агара. Устанавливают рН среды 7,0-7,2. Горячую среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки по 3-4 мл и стерилизуют при 112°C 30 мин. Перед употреблением среду скашивают.

При использовании готовой сухой среды с фенилаланином ее готовят согласно указанию на этикетке флакона.

Среду с фенилаланином засевают суточной агаровой культурой штрихом по скосу агара и через 12-18 часов инкубирования пробирок на культуру наносят 5-6 капель 10%-ного водного раствора хлористого железа (трехвалентного). Более длительное инкубирование может привести к ложноотрицательному результату при исследовании представителей семейства *Enterobacteriaceae*. *Окрашивание культуры в зеленый цвет свидетельствует о дезаминировании фенилаланина, при отрицательном результате культура имеет желтый цвет.*

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДОЛА

Исследуемую культуру бактерий культивируют в одной из жидких питательных сред (в МПБ, бульоне Хоттингера; 2%-ной пептонной воде) в течение 2 сут, после чего, наклоняя пробирку, на ее стенку добавляют 0,3-0,5 мл реактива Эрлиха или Ковача и встряхивают культуру. Учет результатов проводят через 3-5 мин.

#### Реактив Эрлиха

##### Состав:

- пара-диметиламинобензоальдегид - 1 г;
- этиловый спирт (96°) - 95 мл;
- кислота соляная концентрированная - 20 мл.

В этиловом спирте растворяют пара-диметиламинобензоальдегид, затем медленно добавляют кислоту. Реактив готовят в небольшом количестве и хранят при температуре 4-6°С не более 6 мес. При образовании индола на поверхности культуры появляется розовое окрашивание в виде диска. Окрашивание поверхности культуры в желтый цвет указывает на отсутствие индола.

#### Реактив Ковача

##### Состав:

- пара-диметиламинобензоальдегид - 5 г;

- спирт амиловый - 75 мл;
- соляная кислота концентрированная - 25 мл.

Приготовление, хранение и применение аналогичны реактиву Эрлиха. В случае образования индола за счет реактива Ковача верхний слой культуры окрашивается в красный цвет, при отрицательной реакции - в желтый.

#### Индикаторные бумажки для определения индола

Для приготовления индикаторных бумажек готовят реактив.

##### Состав:

- пара-диметиламинобензоальдегид - 5 г;
- ортофосфорная кислота концентрированная ( $H_3PO_4$ ) - 10 мл;
- спирт этиловый 96° - 50 мл.

Реактив переливают в эмалированный металлический кювет, в который помещают кусочки фильтровальной бумаги. Пропитанные реактивом бумажки высушивают на воздухе при комнатной температуре, затем нарезают полосками размером 0,7-0,8x10-12 см. Бумажки имеют желтый цвет. Хранят их в банке из темного стекла, закрытой резиновой или корковой пробкой.

Для приготовления индикаторных бумажек можно использовать реактив Эрлиха или Ковача.

Применение: после посева изучаемой культуры на любую из сред для определения индола в пробирку помещают полоску индикаторной бумажки, верхний конец которой прижимают ватно-марлевой пробкой. Нижний конец бумажки должен быть на расстоянии не менее 3-4 см от поверхности среды. Засеянные пробирки инкубируют в термостате в течение двух суток. При наличии индолообразования нижний конец индикаторной бумажки окрашивается в малиново-красный цвет, при отрицательной - цвет бумажки не изменяется.

Москва, 03.10 2005



### Компьютерная программа для бактериологов ЭнтероИД-плюс

Внимание ветеринарных микробиологов! Если в Вашей лаборатории уже есть компьютер, но Вы не в состоянии приобрести и обслуживать микробиологический анализатор, начните с программного обеспечения. Если Вы работаете на анализаторе - позаботьтесь об экономии расходных материалов (идентификационных пластин).

При помощи компьютерной программы "ЭнтероИД-плюс" Вы сможете решать проблемы идентификации бактерий и грибов быстрее, дешевле и с высоким качеством.

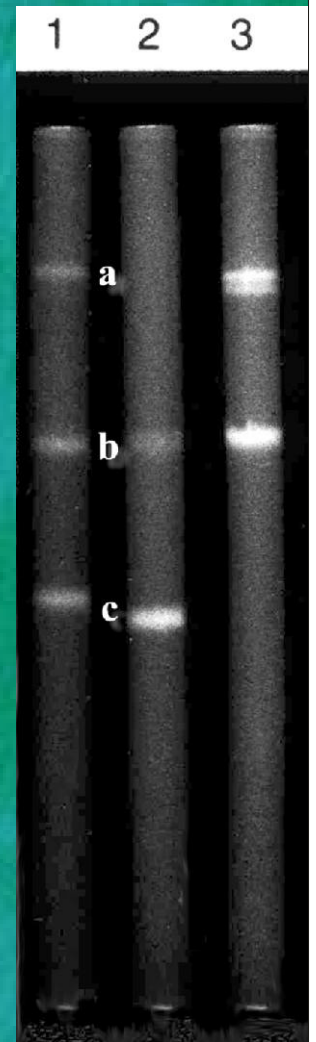
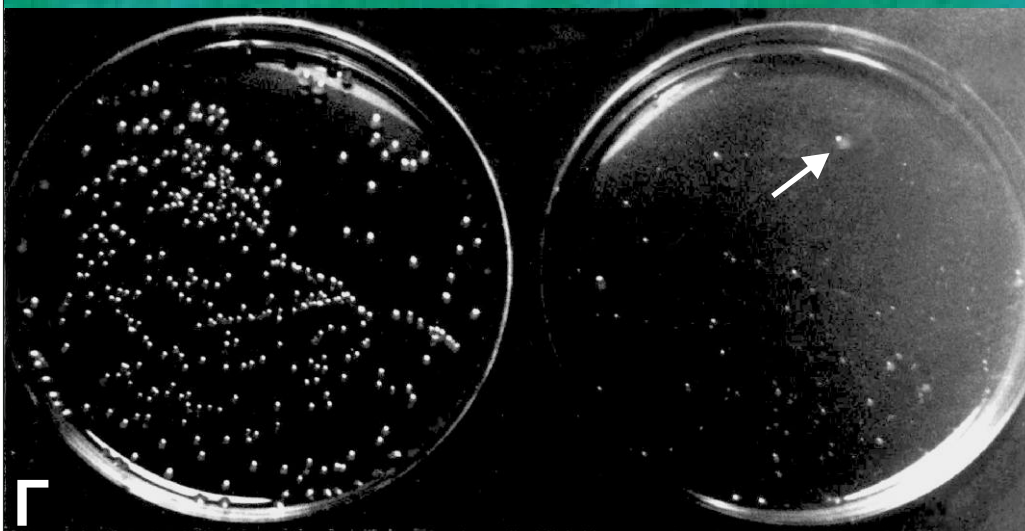
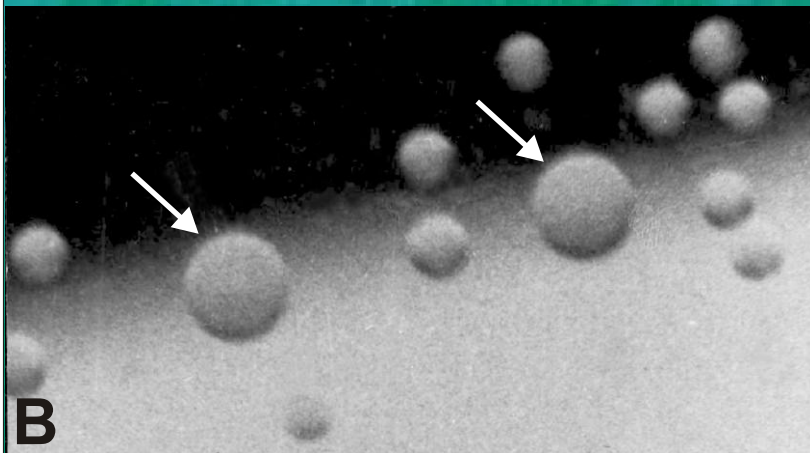
**Отличительные особенности программы:**

- Оригинальный алгоритм, позволяющий использовать программу в качестве экспертной и обучающей системы
- Автоматизированная идентификация более 500 таксонов бактерий и грибов
- Произвольное количество и сочетание идентификационных тестов, независимость от производителей тест-систем (открытая система)
- Корректный подбор дополнительных тестов для дифференциации
- Клинически значимые виды (варианты) имеют специальные пометки
- Для работы с программой не требуется глубокое знание компьютерной техники

На 1 января 2006 г стоимость установки Программы на 1 компьютер составляет всего **6700 рублей** (включая НДС, пересылку, обширное руководство для пользователей и методическую литературу).  
Дополнительная информация - по адресу: [i\\_sm@mail.ru](mailto:i_sm@mail.ru)  
и на сайте: [www.enteroid.narod.ru](http://www.enteroid.narod.ru)

© Смирнов И.В., Смирнов А.И., 1998-2005

## Признаки патогенных иерсиний



**А и Б - аутоагглютинация:** рост на среде Кларка в пробирках (А) и планшете (Б) через 24 ч инкубирования при 37°C *Y. enterocolitica* O3/B4 (слева – бесплазмидный (pYV-) вариант; справа – исходный (pYV+) вариант).

**В - температурозависимая морфология колоний:** через 48 ч инкубирования при 37°C *Y. enterocolitica* O3/B4/pYV+ на агаре АГВ (стрелками отмечены колонии бесплазмидных (pYV-) клонов).

**Г - кальцийзависимость роста:** через 48 ч после посева *Y. enterocolitica* O3/B4/pYV+ на кальцийдефицитный агар (слева – после инкубирования при 26°C, справа – при 37°C).

**Д - препараты ДНК из культур возбудителей иерсиниоза и псевдотуберкулеза после электрофореза в агарозном геле (окраска бромидом этидия, УФО):** 1 - *Y. enterocolitica* O3/B4/pYV+, 2 - ее кальцийнезависимый клон (pYV-), 3 - *Y. pseudotuberculosis* O1/pYV+; а - плазида вирулентности pYV, б - хромосомная ДНК, с - плазида стрептомицинрезистентности

# HiMedia Laboratories Private Ltd.

Фирменная упаковка питательных сред компании ХайМедиа позволяет хранить их в течение длительного срока (до 5 лет) без потери качества и обеспечивает максимальное удобство в работе.



Для удобства работы добавки (FD034 или FD208) рассчитаны на 500 мл среды; срок хранения добавок - 2 года при 2...8°С.



Представительство в РФ, странах СНГ и Балтии.

*Почтовый адрес:* 124498, Москва, а/я 130

*Офис:* 123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 13 а, стр. 3

*Тел/Факс:* (495) 940-33-96/ 940-33-97/ 940-33-98, 940-33-12/ 940-33-13/ 940-33-14

*E-mail:* [himedia@orc.ru](mailto:himedia@orc.ru) *Website:* [www.himedialabs.ru](http://www.himedialabs.ru)

## Питательные среды компании HiMedia, имеющие отечественные аналоги (по назначению)

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Агар Байрд-Паркер	M043* / M1140	Baird-Parker Agar Base / Baird-Parker Agar Base with Sulpha / Основа агара Бэрда-Паркера / Основа агара Бэрда-Паркера с сульфаметазином <b>FD046</b> Egg Yolk Tellurite Emulsion / Эмульсия яичного желтка с теллуридом <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка <b>FD047</b> Potassium Tellurite 3.5% / Теллурид калия 3,5% раствор <b>FD069</b> B P Sulpha Supplement / Добавка с сульфаметазином для среды Бэрда-Паркера
Агар дезоксихолат-цитрат лактозный по Leifson в модификации Hynes	M066	Deoxycholate Lactose Agar (Hynes) / Дезоксихолат-лактозный агар
Агар для выделения стафилококков	M521	Staphylococcus Agar No.110 / Агар для выделения стафилококков №110
Агар желточный для анаэробов	M902*	Anaerobic Egg Agar Base / Основа анаэробного желточного агара <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка
	M911*	C.botulinum Isolation Agar Base / Основа селективного агара для клостридий ботулизма <b>FD049</b> C.B.I. Supplement Селективная добавка для клостридий ботулизма <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка
Агар желточный с маннитом, полимиксина В или полимиксина М сульфатом и феноловым красным	M833*	Bacillus cereus Agar Base / Основа агара для Bacillus cereus <b>FD003</b> Polymyxin B Selective Supplement / Селективная добавка с полимиксином В <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка
Агар желточный с натрия хлоридом, полимиксина В или полимиксина М сульфатом и 2, 3, 5-трифенилтетразола хлоридом	M1139*	MYP Agar Base / Основа желточного агара с полимиксином <b>FD003</b> Polymyxin B Selective Supplement / Селективная добавка с полимиксином В <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка
Агар Клигlera-ГРМ	M078	Kligler Iron Agar / Среда Клигlera
Агар Кристенсена с мочевиной	M112* / M112I*	Urea Agar Base (Christensen) / Основа уреазного агара (по Кристенсену) <b>FD048</b> Urea 40% / Мочевина 40% раствор
Агар лактозный с бриллиантовым зеленым и феноловым красным	M121*	Brilliant Green Bile Broth 2% / Желчный бульон с бриллиантовым зеленым
Агар МакКонки	M081 / MU081 / ME081 / M081B	MacConkey Agar / Агар МакКонки -«-, по прописи Американской Фармакопеи -«-, по прописи Европейской Фармакопеи -«-, по прописи Британской Фармакопеи



Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Агар микробиологический (Агар-агар)	RM026	Agar powder, Bacteriological / Агар-агар (бактериологический)
	RM301 ГОСТ	Agar Powder (Extra Pure) / Агар-агар (ультрачистый)
Агар питательный (Сухой мясо-пептонный агар)	M012	Nutrient Agar with 1% Peptone / Питательный агар с 1% пептона
	M1269	Nutrient Agar No.2/ Питательный агар N2
	M001	Nutrient Agar / Питательный агар
Агар с бриллиантовым зеленым, феноловым красным, лактозой и сахарозой	M016* MU016* ME016* M016B*	Brilliant Green Agar Base, Modified / Основа дифференциального агара с бриллиантовым зеленым модифицированного <b>FD068 Sulpha Supplement</b> / Селективная добавка для выделения сальмонелл
Агар с кристаллическим фиолетовым, лактозой, нейтральным красным, глюкозой и желчью	M581	Violet Red Bile Agar / Глюкозо-желчный агар с кристаллвиолетом и нейтральным красным
	ME581 M581B	-«-, по прописи Европейской Фармакопеи -«-, по прописи Британской Фармакопеи
Агар с цитратом	M099	Simmons Citrate Agar / Цитратный агар Симмонса
Агар Сабуро	M063	Sabouraud Dextrose Agar / Агар Сабуро с глюкозой
Агар трехсахарный с цитратом железа	M021	Triple Sugar Iron Agar / Трехсахарный железосодержащий агар
Агар триптозо-сульфит-циклосериновый (для <i>Clostridium perfringens</i> )	M837*/ M837I*	Perfringens Agar Base / Основа агара для <i>Clostridium perfringens</i> <b>FD014 S.F.P. Supplement (Perfringens S.F.P. Supplement)</b> / Добавка с цикloserином <b>FD045 Egg Yolk Emulsion</b> / Эмульсия яичного желтка
	M1233*	Tryptose Cycloserine Dextrose Agar Base / Основа глюкозо-триптозного агара с цикloserином <b>FD014 S.F.P. Supplement (Perfringens S.F.P. Supplement)</b> / Добавка с цикloserином
Агар цитратный Кристенсена	M143	Christensen Citrate Agar / Цитратный агар Кристенсена
Агар Хоттингера	M1425*	Hottinger Broth / Бульон Хоттингера
Агар Чистовича	M043*/ M1140*	Baird-Parker Agar Base / Baird-Parker Agar Base with Sulpha / Основа агара Бэрда-Паркера / Основа агара Бэрда-Паркера с сульфаметазинином <b>FD046 Egg Yolk Tellurite Emulsion</b> / Эмульсия яичного желтка с теллуридом <b>FD045 Egg Yolk Emulsion</b> / Эмульсия яичного желтка <b>FD047 Potassium Tellurite 3.5%</b> / Теллурид калия 3,5% раствор <b>FD069 B P Sulpha Supplement</b> / Добавка с сульфаметазинином для среды Бэрда-Паркера
Агар Шадлера	M291	Schaedler Agar / Агар Шадлера
Агар щелочной сухой	M189	TCBS Agar / ТЦЖС агар
	M870	TCBS Agar Selective / Селективный агар TCBS
Агар селективный для выделения стафилококков (Солевой агар)	M118	Mannitol Salt Agar / Солевой агар с маннитом
Азидно-глюкозный бульон	M345	Azide Dextrose Broth / Сахарный бульон с азидом натрия
	M1271	Azide Dextrose Broth w/BCP / Сахарный бульон с азидом натрия и бромкрезоловым пурпурным

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Ацетатный агар сухой (Ацетат агар)	M339	Acetate Differential Agar / Ацетатный дифференциальный агар
Бактоагар Плоскирева (SS-агар)	M108	Salmonella Shigell Agar (SS Agar) / Агар Сальмонелла-Шигелла (SS agar)
Бифидум-среда	M1395	Bifido bacterium Broth / Бульон для бифидо бактерий
	M1396	Bifido bacterium Agar / Агар для бифидо бактерий
Бордетелагар	M175*	Bordet Gengou Agar Base / Основа агара Борде-Жангу
Бульон для определения аргининдегидролазы	M689	Broth with Arginine Hydrochloride / Бульон с аргинином
Бульон для определения декарбоксилаз	M393*	Moeller Decarboxylase Broth Base / Основа бульона для определения декарбоксилаз по Мюллеру
Бульон для определения лизиндекабоксилазы	M687	Broth with Lysine Hydrochloride / Бульон с лизином
Бульон для определения орнитиндекарбоксилазы	M688	Broth with Ornithine Hydrochloride / Бульон с орнитином
Бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью	M121	Brilliant Green Bile Broth 2% / Желчный бульон с бриллиантовым зеленым
Бульон МакКонки	M083	MacConkey's Broth / Бульон МакКонки
	ME083	-«-, по прописи Европейской Фармакопеи
	M083B	-«-, по прописи Британской Фармакопеи
Бульон на гидролизатах сои и казеина	M011	Soyabean Casein Digest Medium / Триптон-соевый бульон
	MU011	-«-, по прописи Американской Фармакопеи
	ME011	-«-, по прописи Европейской Фармакопеи
	M011B	-«-, по прописи Британской Фармакопеи
Бульон питательный (Сухой мясо-пептонный бульон)	M244	Nutrient Broth with 1% Peptone / Питательный бульон с 1% пептона
	M002	Nutrient Broth / Питательный бульон
Бульон с тетраонатом, бриллиантовым зеленым и желчью (Тетраонатная среда Мюллера-Кауфмана)	M1255	Tetrathionate Brilliant Green Bile Broth / Тетраонатный бульон с желчью и бриллиантовым зеленым
	ME1255	-«-, по прописи Европейской Фармакопеи
	M1255B	-«-, по прописи Британской Фармакопеи
Бульон триптиказо-пептонно-глюкозный с дрожжевым экстрактом и с трипсином	M969	Tryptone Peptone Glucose Yeast Extract Broth Base / Основа бульона для <i>Clostridium botulinum</i>
Бульон Фразера	M1327*	Fraser Broth Base / Основа бульона Фрейзера <b>FD125I</b> Fraser Selective Supplement / Селективная добавка Фрейзера <b>FD141</b> Fraser Supplement / Добавка Фрейзера
	M1083R*	Fraser Enrichment Broth Base / Основа бульона обогащения для листерий <b>FD125I</b> Fraser Selective Supplement / Селективная добавка Фрейзера
Бульон Хоттингера	M1425	Hottinger Broth / Бульон Хоттингера
Буферный глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью	M287I	EE Broth, Mossel / Бульон для накопления энтеробактерий (бульон EE)
Висмут-сульфит агар	M027	Bismuth Sulphite Agar / Висмут-сульфит агар

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Гидролизат казеина	RM014	Casein Enzyme Hydrolysate, Type-I (Tryptone) / Ферментативный гидролизат казеина
Глюкозо-триптонный агар	M092	Dextrose Tryptone Agar / Глюкозо-триптонный агар
Глюкозо-триптонный бульон	M122	Dextrose Tryptone Broth / Глюкозо-триптонный бульон
Глюкозо-фосфатный (буферный) бульон (Среда Кларка)	M070	MR-VP Medium (Buffered Glucose Broth) / Среда для тестов с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра
ГНК-агар (Гонококковый агар)	M434*	GC Agar Base (w/o Supplement) / Основа гонококкового агара
ГРМ-агар	M001	Nutrient Agar / Питательный агар
ГРМ-бульон	M002	Nutrient Broth / Питательный бульон
Дезоксихолат-цитратный агар	M065 ME065 M065B	Deoxycholate Citrate Agar / Дезоксихолат-цитратный агар -«-, по прописи Европейской Фармакопеи -«-, по прописи Британской Фармакопеи
Дифференциальный агар для сальмонелл, модифицированный	M1082	Salmonella Differential Agar / Дифференциальный агар для сальмонелл, модифицированный (Среда Радж Ханса)
Дрожжевой питательный агар	M456	Yeast Extract Agar / Дрожжевой агар
Дрожжевой экстракт	RM027	Yeast Extract Powder / Дрожжевой экстракт
Желатин-лактозная среда (для <i>Clostridium perfringens</i> )	M628	Lactose Gelatin Medium / Лактозо-желатиновая среда
Железо-сульфитная среда	M868	Iron Sulphite Agar / Железосодержащий сульфитный агар
Желточно-солевой агар	M118*	Mannitol Salt Agar / Солевой агар с маннитом <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка
Желчтисульфатный бульон	M242	G N Broth, Hajna / «Грамнегативный» бульон
Желчный бульон (агар), для идентификации энтерококков	M972	Bile Esculin Agar / Желчно-эскулиновый агар
Забуференная пептонная вода (Забуференный раствор пептона с натрия хлоридом, рН 7,0)	M1275 ME1275 M1275B	Buffered Peptone Water w/NaCl / Пептонная вода забуференная -«-, по прописи Европейской Фармакопеи -«-, по прописи Британской Фармакопеи
Иерсиниозная среда (Питательная среда для выделения иерсиний; И-агар)	M843*	Yersinia Selective Agar Base / Основа селективного агара для иерсиний <b>FD034</b> Yersinia Selective Supplement / Селективная добавка для йерсиний <b>FD208</b> Yersinia Selective Supplement / Селективная добавка для иерсиний
Кампилобакагар	M994*	Campylobacter Agar Base / Основа агара для кампилобактеров
Канамцин азидно-эскулиновый агар	M510A	Kanamycin Esculine Azide Agar Base / Основа эскулинового агара с азидом и канамицином <b>FD146</b> Kanamycin Sulphate Selective Supplement / Селективная добавка с канамицином
Кандида-агар (Питательная среда для выделения грибов рода <i>Candida</i> , сухая)	M217	Bi.G.G.Y. Agar (Nickerson Medium) / Агар Никерсона
	M104	Candida Medium / Среда с висмутом для грибов <i>Candida</i>
Колумбийский агар	M144*	Columbia Blood Agar Base / Основа колумбийского кровяного агара

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Колумбийский агар	M144*	Columbia Blood Agar Base / Основа колумбийского кровяного агара
Коринебакагар (Среда Бучина)	M015	Hoyle Medium Base / Основа среды Хойла (для коринебактерий дифтерии)
Коринетоксагар (ОТДМ)	M882*	Diphtheria Virulence Agar Base / Основа агара для определения токсигенности дифтерийных микроорганизмов <b>FD072</b> KL Virulence Enrichment / Питательная добавка для определения токсигенности дифтерийных бактерий
Кровяной агар	M073*	Blood Agar Base / Основа кровяного агара
Кровяной агар (для идентификации листерий)	M144*	Columbia Blood Agar Base / Основа колумбийского кровяного агара
Ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар	M031 MU031 ME031 M031B	Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar) / Ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар (КЛД-агар) -«-, по прописи Американской Фармакопеи -«-, по прописи Европейской Фармакопеи -«-, по прописи Британской Фармакопеи
Лактобакагар	M641	*MRS Agar / Агар MPC (Ман, Рогоза, Шарп)
Лактозный бульон	M1003 ME1003 M1003B	Lactose Broth / Лактозный бульон -«-, по прописи Европейской Фармакопеи -«-, по прописи Британской Фармакопеи
Лактозо-сахарозная среда	M057	Double Sugar Agar, Russell / Двухсахарный агар по Ресселю
	M270*	Phenol Red Lactose Agar / Агар ФК с лактозой
Лактозо-сульфитная среда	M1287	Lactose Sulphite Broth Base / Основа лактозо- сульфитного бульона
	ME1287	-«-, по прописи Европейской Фармакопеи
	M1287B	-«-, по прописи Британской Фармакопеи
Лецитин-агар	M1325	Lecithin Agar / Агар с лецитином
Лецитиновый агар для выделения <i>Bacillus cereus</i>	M1139*	MPY Agar Base / Основа желточного агара с полимиксином <b>FD003</b> Polymyxin B Selective Supplement / Селективная добавка с полимиксином В <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка
Лецитиновый агар с активированным углем и без угля	M1457*	Listeria Lecithinase Agar Base / Основа лецитиназного агара для листерий <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка
Лизин-железо агар	M377	Lysin Iron Agar / Лизиновый железосодержащий агар
Лизин-железо-агар	M377	Lysine Iron Agar / Лизиновый железосодержащий агар
Ма-агар	M870	TCBS Agar Selective / Селективный агар TCBS
	M189	TCBS Agar / ТЦЖС агар
Магниевая среда (Питательная среда для накопления сальмонелл)	M1137	Modified Rappaport Vassiliadis Medium / Среда Раппапорта-Василиадиса модифицированная
Малонат-агар	M1493	Malonate agar / Малонатный агар
Менингоагар	M413*	Thayer Martin Medium Base / Основа среды Тайера-Мартина (для патогенных нейссерий) <b>FD024</b> V.C.N.T. Supplement / Селективная добавка с антибиотиками <b>FD025</b> Vitamino Growth Supplement / Витаминная ростовая добавка

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Мясная вода	RM002 / RM669	Beef Extract Powder / Говяжий экстракт
	RM003 / RM192	Meat Extract Powder / Мясной экстракт
Мясо-пептонный бульон	M244	Nutrient Broth with 1% Peptone / Питательный бульон с 1% пептона
	M002	Nutrient Broth / Питательный бульон
Мясо-пептонный бульон с глюкозой и дрожжевым экстрактом	M244*	Nutrient Broth with 1% Peptone / Питательный бульон с 1% пептона
	M002*	Nutrient Broth / Питательный бульон
Мясо-пептонный агар	M012	Nutrient Agar with 1% Peptone / Питательный агар с 1% пептона
	M1269	Nutrient Agar No.2/ Питательный агар №2
	M001	Nutrient Agar / Питательный агар
Мясо-пептонный агар с глюкозой и дрожжевым экстрактом	M012*	Nutrient Agar with 1% Peptone / Питательный агар с 1% пептона
	M1269*	Nutrient Agar No.2/ Питательный агар №2
	M001*	Nutrient Agar / Питательный агар
Накопительный бульон для выделения энтерококков	M345	Azide Dextrose Broth / Сахарный бульон с азидом натрия
	M1271	Azide Dextrose Broth w/BCP / Сахарный бульон с азидом натрия и бромкрезоловым пурпурным
Оксфордский агар (Oxford agar)	M1145*	Listeria Oxford Medium Base / Основа оксфордской среды для листерий <b>FD172</b> Oxford Listeria Supplement / Селективная добавка для выделения листерий <b>FD126</b> Listeria Moxalactum Supplement / Моксалактамовая добавка для листерий
Основа среды Левенштейна-Йенсена	M162	Lowenstein Jensen Medium Base / Основа среды Левенштейна-Йенсена
ПАЛКАМ агар (PALCAM agar)	M1064*	Listeria Identification Agar (PALCAM) Агар для листерий (PALCAM) <b>FD061</b> Селективная добавка для листерий (PALCAM)
Пептон основной сухой	M618 / M618I	Alkaline Peptone Water / Щелочная пептонная вода
Пептон ферментативный	RM1892	Fermentative Peptone / Пептон ферментативный
Питательная среда для выделения протей	M792	CLED Agar / Цистин-лактозо-электролит-дефицитный агар с бромтимоловым синим
Питательная среда для идентификации <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (по пиоцианину)	M119*	Pseudomonas Agar (For Pyocyanin) / Агар для определения пиоцианина псевдомонад
	MU119*	-«-, по прописи Американской Фармакопеи
Питательная среда для идентификации <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (по флюоресцеину)	M120*	Pseudomonas Agar (For Fluorescein) / Агар для определения флюоресцеина псевдомонад
	MU120*	-«-, по прописи Американской Фармакопеи
Питательная среда для идентификации листерий	M1552*	L. mono Confirmatory Agar Base / Основа диагностического агара для листерий <b>FD212</b> Селективная добавка L. mono I для листерий <b>FD213</b> Селективная добавка L. mono II для листерий <b>FD227</b> Обогащительная добавка L. mono III для листерий

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ)	M1064*	Listeria Identification Agar (PALCAM) Агар для листерий (PALCAM) <b>FD061</b> Селективная добавка для листерий (PALCAM)
Питательный агар с сахарозой (для подсчета бактерий рода <i>Leuconostoc</i> )	M1225	Acetate Agar / Ацетатный агар
Питательный бульон	M244*	Nutrient Broth with 1% Peptone / Питательный бульон с 1% пептона
	M002	Nutrient Broth / Питательный бульон
Питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБА I)	M1327*	Fraser Broth Base / Основа бульона Фрейзера <b>FD125I</b> Fraser Selective Supplement / Селективная добавка Фрейзера <b>FD141</b> Fraser Supplement / Добавка Фрейзера
Сахарный кровяной агар по Цейсслеру	M649	Dextrose Peptone Agar / Глюкозо-пептонный агар
Сахарный кровяной агар по Цейсслеру с антибиотиками	M649*	Dextrose Peptone Agar / Глюкозо-пептонный агар <b>FD014</b> S.F.P. Supplement (Perfringens S.F.P. Supplement) / Добавка с циклосерином
Селективный агар для выделения и идентификации <i>Bacillus cereus</i>	M833*	Bacillus cereus Agar Base / Основа агара для <i>Bacillus cereus</i> <b>FD003</b> Polymyx in B Selective Supplement / Селективная добавка с полимиксином В <b>FD045</b> Egg Yolk Emulsion / Эмульсия яичного желтка
Селективный агар по Сланецу и Бертли	M612 M612I	Slanetz & Bartley Medium / Среда Сланец-Бартли для энтерококков
Селенитовая среда Лейфсона	M052	Selenite Broth (Twin pack) / Селенитовый бульон (в двух частях)
Селенитовый бульон	M052	Selenite Broth (Twin pack) / Селенитовый бульон (в двух частях)
Солевой бульон	M383	Mannitol Salt Broth / Солевой бульон с маннитом
Солевой бульон (для энтерококков)	M1037	Brain Heart Infusion Broth with 6,5% NaCl / Сердечно-мозговой бульон с 6,5% хлорида натрия
Сорбитол <i>E.coli</i> O157:H7 агар (ЭДКС-агар)	M298I	MacConkey Sorbitol Agar Base / Основа агара МакКонки с сорбитом
	M1298	HiCrome MS.O157 Agar / Хромогенный агар для <i>E. coli</i> O157
	M1340	HiCrome MacConkey Sorbitol Agar Base / Основа хромогенного агара МакКонки с сорбитом
Среда Lee	M602	Lee's Agar / Агар Ли для молочно кислых бактерий
Среда № 1 ГРМ (для выращивания бактерий)	M091	Plate Count Agar / Питательный агар для определения микробного числа на чашках
Среда № 2 ГРМ (Среда Сабуро с глюкозой)	M063	Sabouraud Dextrose Agar / Агар Сабуро с глюкозой
Среда № 3 ГРМ (для накопления энтеробактерий)	M127	Phenol Red Dextrose Malachite Green Broth / Бульон для накопления энтеробактерий
Среда № 4 (Эндо)	M029R	Endo Agar / Агар Эндо
Среда № 5 ГРМ (висмут-сульфит агар)	M027	Bismuth Sulphite Agar / Висмут-сульфит агар фармакопейный
Среда № 6 ГРМ (для определения ферментации глюкозы)	M056	Phenol Red Dextrose Broth / Бульон для определения ферментации глюкозы

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Среда № 7 ГРМ (для определения нитратредуктазы)	M439	Nitrate Broth / Нитратный бульон
Среда № 8 ГРМ (для определения синегнойной палочки и стафилококка)	M011	Casein Digest Medium / Триптон-казеиновая среда
Среда № 9 ГРМ (для выявления пигмента пиоцианина)	M119*	Pseudomonas Agar (For Pyocyanin) / Агар для определения пиоцианина псевдомонад
Среда № 10 ГРМ (для идентификации стафилококков)	M118	Mannitol Salt Agar / Солевой агар с маннитом
Среда № 11 ГРМ (лактозный бульон)	M275	Phenol Red Lactose Broth / Лактозный бульон для накопления энтеробактерий
Среда № 12 (селенитовая среда)	M025	Fluid Selenite Medium / Жидкая селенитовая среда
Среда № 13 (трехсахарный агар)	M021	Triple Sugar Iron Agar / Трехсахарный железосодержащий агар
Среда № 14 (цитратный агар Симмонса)	M099	Citrate Agar / Цитратный агар
Среда № 15 ГРМ (бульон Хоттингера с триптофаном, для определения индола)	M1425	Hottinger Broth / Бульон Хоттингера
	M463R	Tryptone Broth / Триптонный бульон
Среда АГВ	M173	Mueller Hinton Agar / Агар Мюллера-Хинтона
Среда Вильсон-Блера (для определения количества <i>Clostridium perfringens</i> )	M868	Iron Sulphite Agar / Железосодержащий сульфитный агар
Среда Гисса	M054*	Phenol Red Broth Base / Основа бульона с феноловым красным
	M909*	Andrade Peptone Water / with Meat extract /
	M885*	Пептонная вода с мясным экстрактом (или без него) и индикатором Андреде
Среда Гисса с глюкозой	M056	Phenol Red Dextrose Broth / Бульон с феноловым красным и глюкозой
Среда Гисса с дульцитом	M617	Phenol Red Dulcitol Broth / Бульон с феноловым красным и дульцитом
Среда Гисса с ксилозой	M1015	Phenol Red Xylose Broth / Бульон с феноловым красным и ксилозой
Среда Гисса с лактозой	M275	Phenol Red Lactose Broth / Бульон с феноловым красным и лактозой
Среда Гисса с мальтозой	M276	Phenol Red Maltose Broth / Бульон с феноловым красным и мальтозой
Среда Гисса с маннитом	M570	Phenol Red Mannitol Broth / Бульон с феноловым красным и маннитом
Среда Гисса с рамнозой	M1183	Phenol Red Rhamnose Broth / Бульон с феноловым красным и рамнозой
Среда Гисса с салицином	M1011	Phenol Red Salicin Broth / Бульон с феноловым красным и салицином
Среда Гисса с сахарозой	M274	Phenol Red Sucrose Broth / Бульон с феноловым красным и сахарозой
Среда Гисса с сорбитом	M1012	Phenol Red Sorbitol Broth / Бульон с феноловым красным и сорбитом
Среда дифференциально-диагностическая для выделения галофильных вибрионов	M662	VP Medium / Среда VP
	M820	Vibrio Agar / Агар Вибрио

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Среда для выделения сибиреязвенных бацилл	M1446*	PLET Agar Base / Основа селективного агара для выделения сибиреязвенных бацилл <b>FD185</b> Anthracis Selective Supplement / Селективная добавка для сибиреязвенных бацилл
Среда для выделения стрептококков	M304	Streptococcus Selective Agar / Селективный агар для стрептококков
Среда для изучения редукции нитратов и подвижности бактерий (для <i>Clostridium perfringens</i> )	M630	Motility Nitrate Medium, Buffered / Полужидкий агар с нитратом, забуференный
Среда для контроля стерильности, сухая	M009	Fluid Thioglycollate Medium(U.S.P.) / Жидкая тиогликолевая среда
Среда для листерий	M1083*	Fraser Secondary Enrichment Broth Base / Основа бульона вторичного обогащения для листерий <b>FD064</b> Fraser Listeria Supplement / Добавка Фрейзера для листерий
Среда для определения дезаминирования фенилаланина	M281	Phenylalanine Agar / Фениланиновый Агар
Среда для определения нитратредуктазы и роста при 42°C	M439	Nitrate Broth / Нитратный бульон
	M072	Nitrate Agar / Нитратный Агар
Среда для определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий	M608	Thioglycollate Agar / Тиогликолевый агар
Среда для определения подвижности листерий	M1215	Listeria Motility Medium / Среда для определения подвижности листерий
Среда для определения ферментации мальтозы <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	M395*	OF Basal Medium / Среда Хью-Лейфсона для теста ОФ
Среда Кесслера (Среда Кесслера-ГРМ)	M458	Violet Red Bile Broth / Желчный бульон с кристаллвиолетом и нейтральным красным
Среда Китт-Тароцци	M149	Cooked Meat Medium (R.C. Medium) / Среда с отварным мясом для анаэробов (среда R.C.)
	M928*	Liver Broth / Печеночный бульон
Среда Клигlera	M078	Kligler Iron Agar / Среда Клигlera
Среда Кода	M080	Lauryl Tryptose Broth (Lauryl Sulphate Broth) / Лаурил-триптозный бульон
	M083	MacConkey's Broth / Бульон МакКонки
Среда Козера	M069	Koser Citrate Broth / Цитратная среда Козера
Среда КУА	M344*	Charcoal Agar Base / Основа угольного агара для бордетелл <b>FD004</b> Bordetella Selective Supplement / Селективная добавка для бордетелл
Среда Левина	M022	EMB Agar, Levine / Агар с эозином и метиленовым голубым (Левина)
Среда Левина-ГРМ	M022	EMB Agar, Levine / Агар с эозином и метиленовым голубым (Левина)
Среда Лейфсона (Среда Хью-Лейфсона)	M1380	Leifson Agar / Среда Хью-Лейфсона
Среда МРС агаризованная	M641	*MRS Agar / Агар МРС (Ман, Рогоза, Шарп)



Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Среда МРС жидкая	M639	Lactobacillus MRS Broth/ Бульон MRS для лактобактерий
Среда Олькеницкого	M021	Triple Sugar Iron Agar / Трехсахарный железосодержащий агар
Среда Пизу	M314*	Tinsdale Agar Base / Основа агара Тинсдаля <b>FD073</b> Diphtheria Virulence Supplement / Добавка для выделения дифтерийных бактерий
Среда Редди	M926	Reddy's Differential Agar, Modified (Lactic Streak Agar) / Дифференциальный агар Редди, модифицированный
Среда Ресселя (Среда Ресселя-ГРМ)	M057	Double Sugar Agar, Russell / Двухсахарный агар по Ресселю
Среда Роберта	M628	Lactose Gelatin Medium / Лактозо-желатиновая среда
Среда Рогоза агаризованная	M130	Rogosa SL Agar / Агар SL для лактобактерий
Среда Рогоза жидкая	M407	Rogosa SL Broth / Бульон SL для лактобактерий
Среда с бриллиантовым зеленым	M016	Brilliant Green Agar / Дифференциальный агар с бриллиантовым зеленым модифицированный
Среда с малонатом натрия	M382	Malonate Broth / Бульон с малонатом
Среда Сабуро с глюкозой	M063	Sabouraud Dextrose Agar / Агар Сабуро с глюкозой
Среда Сабуро с антибиотиками	M664	Sabouraud Cycloheximide Chloramphenicol Agar / Агар Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимидом
Среда Симмонса	M099	Simmons Citrate Agar / Цитратный агар Симмонса
Среда Финна	M162R	Lowenstein Jensen Medium Modified / Среда Левенштейна-Йенсена модифицированная (среда Финна II)
Среда Хью-Лейфсона	M1380	Leifson Agar / Среда Хью-Лейфсона
Среда Эйкмана (Питательная среда для определения коли-индекса воды; Глюкозо-пептонная среда)	M086	Eijkman Lactose Broth / Лактозный бульон Эйкмана
Среда Эндо	M029R	Endo Agar / Агар Эндо
Тетратионатная среда Мюллера-Кауфмана	M876*	Mueller Kauffman Tetrathionate Broth Base / Основа Тетратионатного бульона Мюллера-Кауфмана
	M1255	Tetrathionate Brilliant Green Bile Broth / Тетратионатный бульон с желчью и бриллиантовым зеленым
	ME1255 M1255B	-«-, по прописи Европейской Фармакопеи -«-, по прописи Британской Фармакопеи
Тиогликолевая среда (Среда для контроля стерильности)	M009	Fluid Thioglycollate Medium(U.S.P.) / Жидкая тиогликолевая среда
Трехсахарный агар с железом (среда Олькеницкого)	M021	Triple Sugar Iron Agar / Трехсахарный железосодержащий агар
	MU021	-«-, по прописи Американской Фармакопеи
	ME021	-«-, по прописи Европейской Фармакопеи
	M021B	-«-, по прописи Британской Фармакопеи
Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом	M1214	Tryptone Soya Yeast Extract Agar / Дрожжевой триптон-соевый агар
Триптон-триптофановая среда (Ljutov)	M463I	Tryptone Broth / Триптонный бульон
Улучшенная клостридиальная среда	M154/ M443	Reinforced Clostridial Agar / Broth / Обогащенный агар / бульон для клостридий

Отечественная питательная среда	Код (№ Кат.)	Продукт HiMedia
Улучшенная клостридиальная среда дифференциальная	M549* M549I*	Differential Reinforced Clostridial Broth / Дифференциальный бульон для клостридий
Фенилаланин-агар (Агар с фенилаланином)	M281	Phenylalanine Agar / Фениланиновый Агар
Хлормагниевая среда	M080	Lauryl Tryptose Broth (Lauryl Sulphate Broth) / Лаурил-триптозный бульон
	M121	Brilliant Green Bile Broth 2% / Желчный бульон с бриллиантовым зеленым
	M242	G N Broth, Hajna / «Грамотрикативный» бульон
	M287	EE Broth, Mossel / Бульон для накопления энтеробактерий (бульон EE)
	M614	Buffered Peptone Water / Забуференная пептонная вода
	M026	Fluid Lactose Medium / Жидкая лактозная среда
Цетримидный агар	M024	Cetrimide Agar Base / Основа агара с цетримидом
	MU024	-«, по прописи Американской Фармакопеи
	ME024	-«, по прописи Европейской Фармакопеи
	M024B	-«, по прописи Британской Фармакопеи
Цитратный агар Симмонса	M099	Simmons Citrate Agar / Цитратный агар Симмонса
Цитратный агар Кристенсена	M143	Christensen Citrate Agar / Цитратный агар Кристенсена
ЦЛЭН агар	M792	CLED Agar / Цистин-лактозо-электролит-дефицитный агар с бромтимоловым синим
ЭДЕМБ-агар (ЦЛЭН агар)	M792	CLED Agar / Цистин-лактозо-электролит-дефицитный агар с бромтимоловым синим
ЭКД (Экстракт кормовых дрожжей)	RM027	Yeast Extract Powder / Дрожжевой экстракт
Энтерококкагар	M493	Bile Esculin Azide Agar / Желчно-эскулиновый агар с азидом натрия
Эритрит агар	M074*	Brucella Agar Base (w/o Supplement) / Основа агара для бруцелл <b>FD161</b> Brucella Selective Supplement, Modified / Селективная добавка для бруцелл, модифицированная

**Примечание:** пропись сред с кат. № **MU000** соответствует требованиям Фармакопеи США, **ME000** – Европейской Фармакопеи, **M000B** – Британской Фармакопеи.

\* - для основы среды необходимы селективные, дифференцирующие и/или обогащающие добавки. Подробная информация о составе сред, их приготовлении, хранении и использовании представлена в каталогах, компакт-диске и на сайте компании HiMedia ([www.himedialabs.ru](http://www.himedialabs.ru))

## Серия HiCrome Single Streak Rapid Differentiation дифференциация с первых итрихов

Несмотря на широкое внедрение в бактериологическую практику методов генодиагностики и геноиндикации, классический бактериологический метод остается «золотым стандартом» при диагностике большинства современных инфекций. Этот метод предполагает посев материала на плотные питательные среды с последующим выделением и идентификацией чистой культуры микроорганизма. Основной недостаток классического метода - длительность исследования. Так, по быстрорастущим микробам результат может быть получен не ранее, чем через 2-3 суток после посева на плотную среду. Для ускоренной идентификации выделяемых культур в состав сред для первичного посева или накопления чистой культуры обычно вводят дифференцирующие субстраты и соответствующие индикаторы. В классическом варианте это углеводы (лактоза, сорбит, сахароза и т. д.), мочевины или другие субстраты, при расщеплении которых микробными ферментами образуются вещества, изменяющие pH или окислительно-восстановительный потенциал среды. В результате появления продуктов ферментации индикатор окрашивается, например, колонии микробов и среду вокруг, помогая отличить их от бесцветных (неокрашенных) колоний микробов, не ферментирующих данный субстрат. Дифференциация при таком подходе осложняется тем, что сахаролитические и протеолитические ферменты микроорганизмов весьма многообразны и универсальны (часто встречаются у представителей разных видов). Это обуславливает относительно невысокие дифференцирующие свойства традиционных сред. Для более четкой дифференциации культур у них желательно определять родо- и/или видоспецифические ферменты. В конце XX века в бактериологическую практику вошли дифференциальные среды нового поколения хромогенные, принцип действия которых основан на выявлении высокоспецифичных ферментов микроорганизмов. К таким ферментам относятся, например,  $\beta$ -D-глюкуронидаза *Escherichia coli* или  $\beta$ -D-глюкозидаза энтерококков. Для обнаружения уникального фермента и, соответственно, идентификации микроорганизма, в состав среды вводят хромогенный субстрат - вещество, при расщеплении которого этим ферментом образуются окрашенные и/или флуоресцирующие продукты.

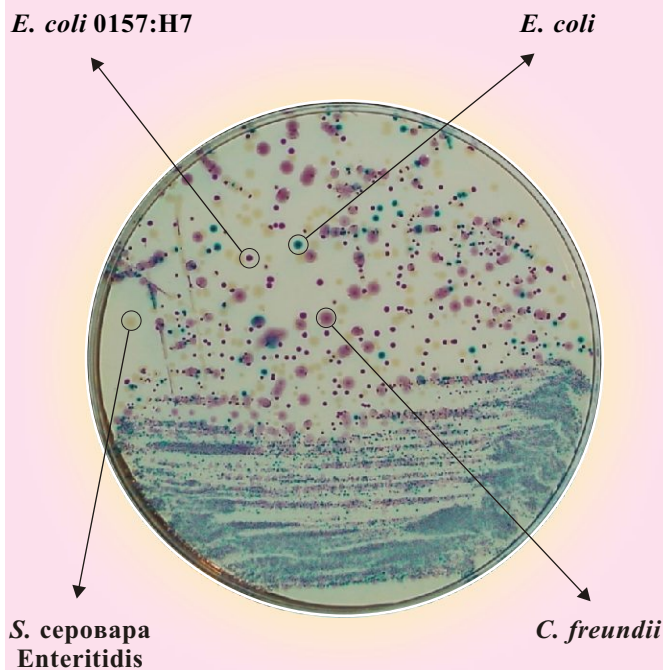
В результате микробный рост окрашивается в определенный цвет или приобретает способность к флуоресценции при ультрафиолетовом облучении.

Поскольку хромогенный субстрат или их смесь вводятся в состав сред (в том числе селективных) для первичного посева, то результат выделения чистой культуры и ее идентификация может быть получен уже в течение первых суток исследования. Иногда при этом требуется проведение быстрых подтверждающих тестов (например, капельный тест на индол с реактивом Ковача для *E. coli*).

Компания HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия) в числе немногих производителей высококачественных хромогенных сред для микробиологических исследований и абсолютный лидер по ассортименту поставляемых сред этой серии. Хромогенные среды компании HiMedia предназначены для быстрого (в течение 24 ч) обнаружения в исследуемом материале целого ряда микроорганизмов, имеющих большое значение для клинической, ветеринарной и санитарной микробиологии: *E. coli* и другие колиформные бактерии, сальмонеллы и энтерогеморрагические эшерихии (*E. coli* O157:H7), энтерококки и *Staphylococcus aureus*, клостридии и синегнойная палочка, а также *Candida albicans* и другие актуальные грибы и бактерии.

Представленные ниже описания конкретных сред помогут потребителям нашей продукции сделать оптимальный выбор той или иной хромогенной среды в соответствии с задачами и возможностями своей лаборатории.

### Рост на среде M1294 - Основа хромогенного селективного агара ECC, HiMedia



## Некоторые хромогенные среды, производимые компанией HiMedia

Кат №	Наименование среды	Назначение среды
M1078/ M1082	Salmonella Differential Agar / Modified (RajHans Medium) <b>Дифференциальный агар для сальмонелл / среда Радж-Ханса)</b>	для идентификации и дифференциации сальмонелл от других энтеробактерий, особенно протеев.
M1294	HiCrome ECC Selective Agar Base <b>Основа хромогенного селективного агара ECC</b>	для обнаружения Escherichia coli и других колиформных бактерий в пищевых продуктах и пробах воды.
M1295/ M1295I	HiCrome E. coli Agar <b>Хромогенный агар для обнаружения и подсчета E. Coli</b>	Для обнаружения и подсчета Escherichia coli в пищевых продуктах без дальнейшего подтверждения на мембранных фильтрах или реактивом на индол
M1296/ M1466	HiCrome Salmonella Agar / HiCrome Improved Salmonella Agar <b>Хромогенный агар для сальмонелл / Хромогенный агар для сальмонелл, улучшенный</b>	для выделения и дифференциации сальмонелл от колиформных бактерий
M1298	HiCrome MS.O157 Agar <b>Хромогенный агар для E. coli O157</b>	Для одновременного определения E. coli O157:H7, E. coli и других колиформных бактерий в пищевых продуктах и пробах воды
M1340	HiCrome MacConkey Sorbitol Agar Base <b>Основа хромогенного агара МакКонки с сорбитом</b>	для селективного выделения E. coli O157:H7 из пищевых продуктов и кормов для животных
M1354	M-CP Agar Base <b>Основа агара M-CP для клостридий</b>	для выделения и подсчета Clostridium perfringens в воде методом мембранных фильтров
M1393	HiCrome MM Agar <b>Хромогенный агар MM для сальмонелл</b>	для идентификации сальмонелл и их дифференциации с цитробактерами и др. бактериями при исследовании воды
M1430	HiCrome EC0157:H7 Agar Base <b>Основа хромогенного агара для E. coli O157:H7</b>	для селективного выделения и быстрой идентификации E. coli O157:H7 из пищевых продуктов
M1465/ M1453	Rapid HiColiform Agar / Broth <b>Хромогенный агар / бульон для колиформных бактерий и E.coli</b>	для быстрого и простого обнаружения в воде всех колиформных бактерий и отдельно - E. coli по реакциям хромогенного и флюорогенного субстратов
M1467	HiCrome OGYE Agar Base <b>Основа хромогенного агара для дрожжевых и плесневых грибов</b>	для выделения и подсчета дрожжевых и плесневых грибов в молоке и молочных продуктах
M1468	HiCrome Aureus Agar Base <b>Основа хромогенного агара для стафилококков</b>	для выделения и идентификации стафилококков из объектов внешней среды
M1469	HiFluoro Pseudomonas Agar Base <b>Основа флюорогенного агара для Pseudomonas aeruginosa</b>	для селективного выделения из клинического и другого материала Pseudomonas aeruginosa и их быстрой идентификации флюоресцентным методом
M1488	HiCrome ECD Agar w/ MUG <b>Хромогенный агар ECD для определения E. Coli</b>	для обнаружения E. coli в воде и пищевых продуктах по реакциям хромогенного и флюорогенного субстратов

## HiCromeVeg™

Специалисты компании HiMedia разработали из растительного сырья продукты, заменяющие компоненты животного происхождения. Применение таких компонентов для приготовления обычных и хромогенных сред исключает опасность заражения человека прионными инфекциями.



# ДИАГНОСТИКА ЛИСТЕРИОЗА



Полный спектр продукции HiMedia для выделения, культивирования и идентификации *Listeria* из клинических образцов, сырья для пищевой промышленности и продуктов питания



*Listeria monocytogenes*



*Listeria ivanovii*



*Listeria seeligeri*



*Listeria innocua*  
*Listeria grayi*  
*Listeria welshimeri*



**HIMEDIA**<sup>®</sup>



# Приготовление и хранение питательных сред: общие указания

## Вводные указания

Таблица 1.

Сухие питательные среды высоко гигроскопичны. Их надо хранить в прохладном сухом месте, вдали от яркого света. Эти среды предназначены только для использования в лаборатории.

Внимательно прочитайте инструкции на этикетке. Обратите особое внимание на состав среды, указания по ее приготовлению и использованию. Обратите также внимание на срок годности и номер партии. Перед использованием убедитесь, что среда не изменила своих физических свойств, а срок хранения не истек.

Питательные среды имеют тенденцию к образованию комков (слеживанию) в следующих условиях:

- при повышенной влажности во время хранения;
- если банка длительное время открыта;
- если банку постоянно неплотно закрывают;
- если среда очень старая.

## Восстановление сухих сред

Для приготовления среды используйте чистую, неповрежденную стеклянную посуду и дистиллированную или деионизированную воду, соответствующую требованиям Российской Фармакопеи, Фармакопеи США и Международной Фармакопеи для чистой воды.

Поместите навеску среды в чистую, сухую колбу, объем которой в 2-3 раза превышает окончательный объем готовой среды. Добавьте часть требуемого количества воды и перемешивайте вращательными движениями до растворения. Затем понемногу, по стенке колбы, добавляйте оставшееся количество воды. Большинство бульонов на этой стадии полностью растворяются и выглядят прозрачными. Для полного растворения используйте нагрев открытым пламенем, горячую плиту или кипящую воду, избегая чрезмерного нагрева и подгорания среды.

## Подведение pH

Обычно сухие среды, восстановленные с использованием дистиллированной или деионизированной воды, при 25°C имеют те значения pH, которые указаны на этикетке. Тем не менее рекомендуется, особенно при использовании давно хранящихся сред, проверять и при необходимости корректировать значение pH.

Измерение pH у жидких сред следует проводить при 25°C, а у расплавленных плотных при 40-45°C. Значение pH доводят до необходимого путем добавления 1 N или 0,1 N растворов соляной кислоты или гидроксиданатрия к определенному объему образца (например, к 50 или 100 мл среды). После перерасчета к оставшемуся объему среды добавляют необходимое количество кислоты или щелочи.

## Стерилизация

Полностью приготовленную среду стерилизуйте, как указано на этикетке. Обычно стерилизацию проводят в автоклаве, 15 минут при 121°C. Соотношение температур и давлений приведено в Таблице 1.

## Соотношение температур и давлений

Давление насыщенного пара в автоклаве, кПа	Температура, °C
34,47	108
68,95	116
103,42	121
137,90	127
172,37	131
206,84	134

1 атм. = 101,325 кПа

Время от времени необходимо проверять эффективность автоклавирования. Температурные условия в разных точках рабочей камеры автоклава неодинаковы. В этом можно убедиться с помощью двух флаконов с 2 %-м раствором глюкозы в 2 %-м растворе гидрофосфата натрия, которые помещают в разные места рабочей камеры. Нагревание придает раствору коричневый цвет. Содержимое флакона, расположенного около отверстия для поступления пара, имеет более интенсивную коричневую окраску, чем у содержимого других флаконов.

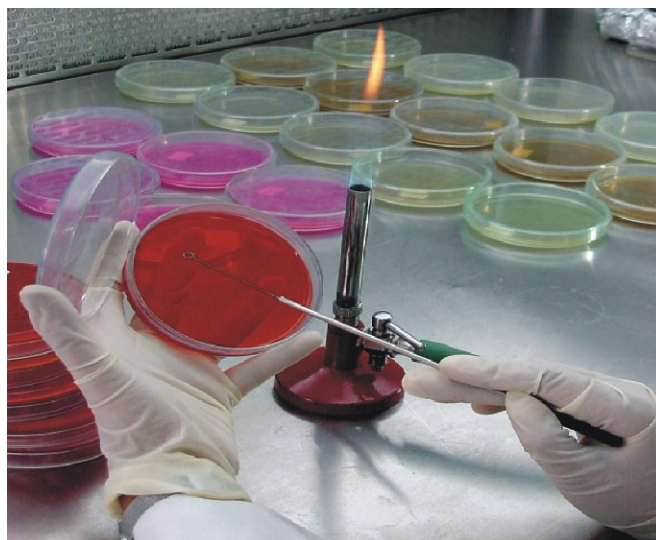
При стерилизации настоятельно рекомендуется точно следовать указаниям на этикетке.

Перед введением термолабильных добавок в простерилизованную среду ее необходимо охладить. Добавки асептически вводят в жидкую среду, охлажденную до комнатной температуры, или в агаровую среду, охлажденную до 45-50°C, как указано на этикетке.

## Контроль стерилизации

Все автоклавы необходимо регулярно проверять на эффективность и действенность.

Физическими параметрами контроля являются температура и давление пара. Надо проверять также насыщенность пара и безопасность работы клапанов. В России и некоторых других странах в программу контроля работы автоклава включают биологические тесты, демонстрирующие эффект стерилизации.



Физико-химические тесты показывают, достигалась ли при стерилизации заданная температура, а некоторые из них показывают и достаточность экспозиции при данной температуре.

### Влияние перегрева

Высокие температуры и длительный нагрев являются обычной причиной сдвига pH, потемнения питательных сред, выпадения преципитата, плохого гелеобразования и потери качества питательной среды в целом.

### Розлив стерильных сред в чашки Петри

1. Во избежание появления обильного конденсата на крышках чашек стерильные агаровые среды перед розливом должны иметь температуру 45-50°C. Среду надо тщательно перемешать, не допуская образования пузырьков воздуха, асептически разлить в чашки Петри. Перед посевом поверхность агаровых сред должна быть подсушена в асептических условиях при 30-40°C в термостате.
2. Добавление крови: для приготовления кровяного агара лучше использовать дефибрированную кровь, а не кровь с антикоагулянтами. Предпочтительнее использовать как можно более свежую кровь, а если она находилась на хранении (при +2...8°C, без замораживания), то ее предварительно подогревают до 35-37°C в термостате, а затем добавляют в расплавленную агаровую основу при температуре 45-50°C.

### Хранение приготовленных сред

Если среда не использована в день приготовления, ее, для предотвращения высыхания, необходимо хранить в плотно закрытом контейнере. Важно отметить, что во избежание потери стабильности готовых жидких сред, их не следует хранить в течение длительного времени. Агаровые среды, также во избежание порчи, не должны подвергаться длительному воздействию высоких температур (40-50°C).

При работе следует отдавать предпочтение свежеприготовленным средам. Питательные среды с такими лабильными веществами, как бета-лактамы антибиотики, во избежание потери активности последних, надо использовать в течение нескольких дней после приготовления.

Чашки с агаровыми средами следует хранить при +2...8°C в плотно закрытых банках для предотвращения влаготери. Жидкие среды в пробирках и флаконах также желательно закрывать герметично. Испарение влаги может привести к кристаллизации некоторых компонентов среды.



Стабильность приготовленных сред ограничена и значительно варьирует. Если нет специальных указаний, то среды можно хранить при 12...15°C в течение нескольких месяцев. Не рекомендуется хранить среды при отрицательных температурах, так как при этом нарушается структура геля.

Перед посевом чашки тщательно проверяют на отсутствие контаминации, неровностей агаровой поверхности, пузырьков, изменений цвета, гемолиза и разрывов, вызванных усыханием среды. Пробирки и чашки с такими дефектами бракуют.

### Утилизация использованных сред

1. Условия лаборатории: микробиологическая лаборатория представляет опасность для непосвященных и необученных лиц, поэтому степень риска уменьшается для тех, кто знает о возможных опасностях и принципах безопасного поведения в лаборатории. Всегда следует учитывать условия, в которых проводятся манипуляции с микробными культурами. В большинстве стран приняты стандарты для таких условий, в зависимости от типа используемых микроорганизмов и категории микробиологической лаборатории. Для работы с наиболее опасными микроорганизмами предписывается выполнение полного комплекса мер безопасности. Пренебрежение этими инструкциями может рассматриваться как правонарушение.
2. Действия персонала: к работе с инфицированным материалом и засеянными питательными средами допускается только квалифицированный персонал, обученный обращению с микробиологическими материалами. Со всеми образцами исследуемого материала и микробными культурами надо обращаться должным образом и не допускать их сбрасывания без уничтожения в автоклаве. Пользователь должен убедиться в отсутствии микробной контаминации оборудования и аппаратуры, а при подозрении на нее - применять дезинфицирующие средства или автоклавирование. Ненужные микробные культуры в стеклянной посуде (флаконах, пробирках, чашках Петри) в первую очередь необходимо инактивировать автоклавированием (примерно 30 мин при 121°C).
3. Биологическая безопасность: культивирование микроорганизмов на питательных средах приводит к резкому возрастанию численности микроорганизмов. В таких высоких концентрациях любой микроорганизм потенциально опасен, поэтому для предотвращения инфицирования людей микробные культуры необходимо утилизировать соответствующими безопасными методами.

### Обращение с сухими питательными средами

Все сухие питательные среды поставляются в виде порошка. Данные продукты предназначены для бактериологической работы в лаборатории, как указано на соответствующих этикетках, и не должны прямо или косвенно использоваться для потребления людьми или животными. Большинство сухих питательных сред представляет собой мелкодисперсные летучие порошки. Следует избегать их вдыхания, чтобы не вызвать раздражения верхних дыхательных путей. Не допускайте длительного контакта порошка с поврежденной кожей или избыточного пыления порошка. Любые остатки порошка следует смывать большим количеством холодной воды.

длительного контакта порошка с поврежденной кожей или избыточного пыления порошка. Любые остатки порошка следует смывать большим количеством холодной воды.

Для предупреждения попадания аэрозолей порошка в дыхательные пути рекомендуется использовать индивидуальные защитные маски.

Каждая питательная среда сопровождается специальной инструкцией по приготовлению и применению.

### Обращение с опасными и токсическими продуктами

Некоторые питательные среды содержат в качестве компонентов токсические вещества, поэтому с ними надо обращаться так, как указано в разделе «Меры безопасности» инструкции. Если в материале имеются какие-либо токсические субстанции, на этикетке имеются соответствующие обозначения и фразы.

**Натрия азид:** Обычно при использовании в составе любой среды его концентрация не превышает 1 %, что соответствует низкой токсичности. Некоторые лица, однако, проявляют повышенную чувствительность к этому веществу, поэтому надо принимать меры к предотвращению вдыхания или попадания порошка азид натрия внутрь. Это вещество имеет свойство реагировать со многими металлами, особенно, медью и свинцом, с образованием взрывчатых соединений азидов металлов. В связи с этим рекомендуется строго следовать положениям местного или национального законодательных актов по утилизации азид натрия. Для предотвращения длительного контакта с металлическими водостоками и канализационными трубами следует смывать остатки этого порошка большим количеством воды. Эти же меры предосторожности необходимы при использовании любой биологической жидкости, содержащей азид натрия в качестве консерванта.

**Лития хлорид:** Эта соль является опасным веществом. Необходимо избегать контакта кожи с ней или вдыхания паров хлорида лития. При попадании хлорида лития на кожу ее надо промыть большим количеством воды.

**Фукусин основной:** Является потенциальным канцерогеном, поэтому требуется осторожность,

чтобы не допустить вдыхания порошка или контакта его с кожей.

**Натрия гидроселенит:** Это высоко токсичное соединение с тератогенными и коррозионными свойствами, поэтому при обращении с ним требуется особая осторожность. При попадании гидроселенита натрия на кожу ее необходимо тщательно промыть большим количеством воды.

### Первая помощь

При несчастных случаях, связанных с неосторожным обращением с опасными или токсическими веществами, рекомендуются следующие мероприятия первой помощи пострадавшим.

**Вдыхание:** Вывести пострадавшего из зоны воздействия вещества, согреть и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

**Контакт с кожей:** Немедленно удалить всю загрязненную веществом одежду и тщательно промыть водой с мылом загрязненный участок кожи. При наличии симптомов отравления по завершении указанных процедур обратиться за медицинской помощью.

**Попадание внутрь:** Тщательно промыть рот большим количеством воды. Немедленно дать выпить пострадавшему 2-3 стакана воды. При наличии симптомов отравления по завершении указанных процедур обратиться за медицинской помощью.

**Попадание в глаза:** Тщательно промыть глаза большим количеством воды. При необходимости обратиться за медицинской помощью.

**Проливание (просыпание) материала:** В случае проливания или просыпания материала надо сделать следующее:

- а) при большом количестве надеть защитную спецодежду, перчатки, очки и маску; собрать материал в соответствующий контейнер и тщательно его закупорить; утилизировать материал в соответствии с действующим законодательством; удалить остатки вещества большим количеством воды;
- б) при небольшом количестве надеть защитные перчатки и удалить остатки вещества большим количеством воды.







### Указания по безопасности

#### Обращение и использование

1. Прочтите надписи на этикетке перед тем, как вскрыть банку.
2. Убедитесь в том, что перед Вами тот продукт, который Вам нужен.
3. Помните о возможной опасности при обращении с реактивами и используйте соответствующую защитную одежду и приспособления.
4. Открывать банку следует осторожно, в хорошо

проветриваемом помещении.

5. Соблюдайте осторожность при извлечении и применении опасных реактивов. Используйте методы, уменьшающие риск отравления при вдыхании, попадании вещества внутрь, на кожу, в глаза или на одежду.
6. Избегайте использования загрязненных инструментов и аппаратуры.
7. После использования тщательно закупоривайте банки.
8. При работе с реактивами не допускается прием пищи, питье или курение.
9. Тщательно промывайте загрязненные руки и одежду.
10. В случае проливания или просыпания реактива поступайте в соответствии с указаниями по мерам безопасности.
11. При воздействии реактива на организм немедленно обратитесь за медицинской помощью, оказав пострадавшему первую помощь, и наблюдайте за ним до прихода врача.

#### Хранение

1. В необходимых случаях температура хранения указана на этикетке. Все остальные продукты хранят при температуре ниже 30°C.
2. Материалы следует хранить в сухом, хорошо проветриваемом месте без резких колебаний температуры, вдали от открытого огня.
3. Не допускайте к реактивам посторонних лиц.
4. Опасные вещества надо хранить отдельно.
5. Периодически необходимо проводить ревизию и удалять со склада испорченные материалы.
6. Не допускайте курения в местах, где хранятся огнеопасные реактивы.
7. Осторожно обращайтесь с контейнерами, где могут быть остатки опасных веществ.

## БУДЬТЕ ВНИМАТЕЛЬНЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СУХИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

В отдельных случаях характеристики приготовленных потребителем питательных сред отличаются от паспортных, что делает невозможным их применение по назначению. Причины подобных отклонений весьма многочисленны. Некоторые из них перечислены в нижеприводимой таблице.

### Некоторые из возможных причин недоброкачества готовых сред

Наблюдаемое отклонение от нормы	Причины
Несоответствие pH паспортной величине	Перегревание, неполное перемешивание, слишком длительная стерилизация, использование щелочного стекла, неочищенной воды, повторное плавление, гидролиз ингредиентов, длительное хранение при высокой температуре
Неполное растворение	Отклонение от инструкции по нагреванию агаровой среды, неполное перемешивание, слишком маленькая емкость для приготовления среды (иногда осадок может являться важным компонентом среды, например в висмут-сульфит агаре)
Потемнение Мягкий гель	Перегревание среды, чрезмерное количество сухой среды, плохое перемешивание Агар не растворился, неполное перемешивание, отклонение от инструкции по восстановлению сухой среды, кислотный гидролиз агара, избыточное разведение агара инокулюмом
Потеря ростовых и дифференцирующих свойств	Повторное плавление, чрезмерное нагревание, неполное перемешивание, избыточное разведение среды инокулюмом, неадекватный растворитель инокулюма и др.
Ненормальный цвет среды	Непригодность сухой среды, плохо вымытая посуда, неочищенная вода
Токсичность среды для микробов	Плохо вымытая посуда, неочищенная вода, подгорание среды
Контаминация среды микробами	Неправильная/недостаточная стерилизация, неправильная техника введения добавок и розлива среды

# Хранение продуктов компании HiMedia

Для получения оптимальных результатов применения продукты компании HiMedia важно хранить при соответствующих условиях. Не следует использовать продукты с истекшим сроком годности. Условия хранения и сроки годности указаны на соответствующих этикетках, контейнерах и в инструкциях-вкладышах. Рекомендуется использовать продукты в порядке возрастания номеров серий и партий.

## Отношение к свету

Желательно хранить все приготовленные питательные среды в темноте и всегда - вдали от прямых солнечных лучей.

## Отношение к температуре и влажности

Ввиду гигроскопичности сухие питательные среды портятся во влажной атмосфере, поэтому важно не оставлять емкости с ними надолго открытыми. Помещение с высокой температурой и помещении для приготовления питательных сред (средоварка) не подходят для хранения банок с питательными средами, особенно для хранения тех банок, которые часто открывают.

## Рекомендуемое время и температура хранения

### Сухие питательные среды (M)

Сухие питательные среды при хранении в оптимальных условиях имеют срок годности 5 лет.

Сухие питательные среды производства компании HiMedia поставляются в непрозрачных водоотталкивающих пластиковых флаконах с навинчивающимся колпачком, который имеет

внутреннюю конусообразную крышку, поэтому не требуется дополнительное укупорование. После отбора навески среды крышку и колпачок необходимо вернуть на место и тщательно закрыть ими банку. Тщательно закрытые банки со средами следует хранить при температуре ниже 30°C или ниже 8°C (как это указано на этикетке), если нет других указаний. При первом вскрытии банки или другого контейнера на этикетке пишут дату вскрытия.

## Селективные добавки (FD)

Рекомендуется хранить при температуре ниже +8°C, если нет других указаний. Срок годности указан на этикетке и составляет от 1 до 3 лет.

## Диски с антибиотиками (SD, OD)

Хранят при минус 20°C, рабочие партии при температуре от +2 до +8°C. Срок хранения - от 1 до 3 лет.

## Компоненты питательных сред (RM)

Невскрытые контейнеры с компонентами сред следует хранить при температуре ниже 30°C, если на этикетке не оговорены другие условия. Лошадиную сыворотку хранят при температуре ниже минус 20°C.

## Материалы для дифференциации микроорганизмов (DD)

Рекомендуется хранить при температуре от +2 до +8°C, за исключением факторов V и X (при минус 10°C) и дисков с углеводами (не выше 30°C); срок хранения - от 9 месяцев до 2 лет.

**HIMEDIA** REF M 843 500 г

**Yersinia Selective Agar Base**  
Основа селективного агара для иерсиний

Способ приготовления: **DI** HIMEDIA HIMEDIA HIMEDIA \*Состав среды: **DI** HIMEDIA HIMEDIA

Размешать 29,0 г порошка в 500 мл дистиллированной воды. Прокипятить для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение **Б** мин. Остудить

Содержимое 1 пузырька с селективной добавкой (FD034), или селективной добавкой для иерсиний (Иргасан) (FD208). Тщательно перемешать и разлить в чашки Петри.

Ингредиенты	Грамм/л
Пептон специальный	20,00
Дрожжевой экстракт	2,00
Мясной	20,00
Натрия пивухат	2,00
Натрия мидел	1,00
Малина сульфат	0,01
Натрия дезоксиоколат	0,50
Нейтральный красный	0,03
Кристаллический фиолетовый	0,001
Агар-агар	12,50

Ключевое значение pH (при 25°C) 7,4 - 0,2

\*Состав выверен и доведен до соответствия необходимым параметрам

В течение срока годности соответствие требуемым параметрам гарантируется при сохранении порошкообразного состояния препарата.

Используется для селективного выделения из клинического материала и пищевых продуктов: *Yersinia enterocolitica* (с добавкой FD034, в соответствии с рекомендациями комитета ISO) или *Yersinia enterocolitica* в *Yersinia pseudotuberculosis* (с добавкой FD208).

Получено \_\_\_\_\_ Вскрыто \_\_\_\_\_

По всем вопросам обращаться по: 123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 13 а, стр. 3  
Тел/Факс: (495) 940 33 12 / 13 / 14, 940 33 96 / 97 / 98.  
E-mail: himedia@orc.ru Наш сайт: www.himedia-labs.ru

Внимание: По окончании работы все использованные и неиспользованные препараты данного продукта и его производных следует

3

К NOV-2007 Л LOT L-V517 Ж 89027294053805 E 1110 И

## Образец этикетки продукта компании HiMedia

### Обозначения:

- A = Название среды
- Б = Номер по каталогу
- В = Вес (нетто)
- Г = Назначение продукта
- Д = Состав продукта
- Е = Величина pH готовой среды

- Ж = Указания по приготовлению среды
- З = Рекомендуемая температура и другие условия хранения продукта
- И = Рекомендуемая процедура утилизации
- К = Срок годности продукта
- Л = Номер партии

## Программа контроля качества

Создание питательных сред для микроорганизмов требует взвешенной оценки как отдельного ингредиента, так и взаимодействия всех компонентов друг с другом. Учитывая данное обстоятельство, специалисты компании HiMedia применяют соответствующие методы контроля на разных этапах производства, что позволяет получать высококачественные питательные среды. Их применение обеспечивает необходимую воспроизводимость результатов исследования.

Высокое качество продукции HiMedia подтверждено Международным сертификатом ISO9001:2000, ISO13485:2003, WHO GMP, CE и US FDA что свидетельствует о соответствии производства, управления производством и управления системой контроля качества международным стандартам.

Качество питательных сред и их безопасность зависят от компонентов, входящих в состав

№ пп	Номер по каталогу	Продукт животного происхождения	Номер по каталогу	Продукт растительного происхождения
1	RM001	Пептон бактериологический	RM001V	HiVegПептон
2	RM002	Говяжийэкстракт	RM002V	HiVegЭкстракт
3	RM015	Пептон специальный	RM015V	HiVegПептон специальный
4	RM005	Протеозный пептон	RM005V	HiVegПептон № 3
5	RM635	Мясной пептон	RM635V	HiVegПептон № 1
6	RM014	Триптон	RM014V	HiVegГидролизат
7	Rm013	Кислотный гидролизат казеина	RM013V	HiVegКислотный гидролизат
8	RM030	Триптоза	RM030V	HiVegГидролизат №1
9	RM003	Мясной экстракт	RM003V	HiVegЭкстракт № 1
10	RM191	Вытяжка из сердца теленка	RM191V	HiVegВытяжка
11	RM188	Сердечно-мозговая вытяжка	RM188V	HiVegВытяжка специальная
12	RM020	Желатиновый пептон	RM020V	HiVegПептон № 2
13	RM326	Печеночный экстракт	RM326V	HiVegЭкстракт № 2
14	RM023	Печеночный гидролизат	RM023V	HiVegГидролизат №2

### Контроль качества отдельных компонентов:

В состав сухих питательных сред входят различные компоненты:

1. Пептон (источниказота)
2. Углеводы(источник углерода)
3. Минеральные вещества (неорганические соли, микроэлементы)
4. Селективные вещества
5. Витамины
6. Красители и индикаторы pH
7. Гелеобразующий компонент

### 1. Пептоны (мясной, казеиновый, соевый, желатиновый, дрожжевой и др.):

Продукты гидролиза белка, обычно называемые пептонами, представляют собой смесь полипептидов, олигопептидов, аминокислот, органических источников азота, солей и микроэлементов. Применение разных пептонов отражает различные потребности микроорганизмов в аминокислотах и пептидах. Характеристики пептона зависят от источников белка (казеин, мясо или соя) и типа гидролиза: кислотного или

питательных сред. Многие среды содержат в качестве компонентов продукты животного происхождения, например, пептон, триптон и т.д.

В связи с тем, что во многих странах наблюдались случаи заболевания крупного рогатого скота энцефалопатией, случаи заражения вирусом коровьего бешенства и т.д., существует реальная угроза здоровью человека. Чтобы исключить подобные опасения, специалисты компании HiMedia разработали из растительного сырья продукты, заменяющие в качестве компонентов продукты животного происхождения. Эти продукты можно использовать для приготовления сред для контроля стерильности, сред, используемых при изготовлении вакцин и т.д. Таблица соответствия продуктов животного и растительного происхождения приведена в таблице.

ферментативного (трипсин, пепсинили папаин).

Для контроля производимых пептонов, помимо собственного комплекса исследований, компания HiMedia проводит анализ согласно Фармакопеи США (раздел «Peptic Digest of Animal Tissue») на соответствие критерию «Панкреатический перевар казеина»(14).

### Обычные тесты для анализа пептонов

1. Степень расщепления
2. Влажность (потеря веса при 100°C)
3. Содержание азота
4. Содержание -аминного азота
5. Остаток после сжигания (зольность)
6. Отсутствие нитритов
7. Содержание солей (например, NaCl)
8. Содержание фосфатов
9. Микроэлементы
10. Ферментируемые углеводы
11. Липиды
12. Витамины
13. Совместимость с другими ингредиентами при 121°C в течении 15 минут

14. Оценка микробиологами:
- а) по обнаружению специфических метаболитов (индола, ацетилметилкарбинола, сероводорода);
  - б) по ростовым свойствам (на жидких средах оценивают степень мутности, на плотных - характеристики колоний микроорганизмов по методу Miles и Misra (12)).

#### **Углеводы:**

В состав питательных сред обычно входят следующие углеводы:

- |               |               |               |
|---------------|---------------|---------------|
| 1. Адонит     | 10. Галактоза | 19. Раффиноза |
| 2. Эскулин    | 11. Глицерин  | 20. Рамноза   |
| 3. Арабиноза  | 12. Гликоген  | 21. Салицин   |
| 4. Целлобиоза | 13. Инозит    | 22. Сорбит    |
| 5. Декстрин   | 14. Инулин    | 23. Крахмал   |
| 6. Глюкоза    | 15. Лактоза   | 24. Сахароза  |
| 7. Дульцит    | 16. Мальтоза  | 25. Трегалоза |
| 8. Эритрит    | 17. Маннит    | 26. Ксилоза   |
| 9. Фруктоза   | 18. Манноза   |               |

Некоторые микроорганизмы могут утилизировать широкий спектр углеводов, в то время как другие более прихотливы и утилизируют только отдельные углеводы. Последние можно идентифицировать по ферментации или окислению ими углеводов, добавленных в среду. В диагностической практике используют большое количество питательных сред, в состав которых входят специфические углеводы и индикаторы для обнаружения особых ферментативных реакций (2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13).

Углеводы, используемые в питательных средах, проверяют на подлинность и отсутствие примесей.

Контроль осуществляют следующим образом. Готовят жидкие и плотные питательные среды с одним известным углеводом стандартным и испытуемым. Затем проверяют способность углеводов поддерживать рост микроорганизмов. На плотных средах после посева и инкубирования сравнивают характеристики колоний на среде со стандартным углеводом и с испытуемым (по размеру, цвету, форме и реакции индикаторов).

#### **3. Минеральные вещества и другие компоненты:**

Некоторые минеральные соли необходимы для роста и метаболизма всех живых клеток. Для большинства бактерий требуется наличие питательной среды натрия, калия, магния, марганца, двух- или трехвалентного железа в виде солей (хлоридов, фосфатов, сульфатов).

#### **4. Селективные вещества (соли желчных кислот и бычья желчь):**

Вещества, получаемые из желчи, вводят в состав питательных сред для дифференциации бактерий, адаптированных и неадаптированных к условиям обитания в кишечнике. Для дифференциации бактерий по толерантности к желчи готовят селективные среды с повышенной концентрацией желчи и ее производных.

Химический анализ солей желчи проводится, как описано в National Formulary для дезоксихолата натрия, холата натрия и таурохолата натрия (В.Р. 1949, 14 - U.S.P.). В питательной среде эти вещества не должны оказывать влияния на первоначальный цвет индикаторной краски (ок) и его дальнейшие

изменения в процессе роста микроорганизмов. Среда при этом не должна пениться или давать осадок при хранении. Далее проводят функциональную проверку желчи, с использованием в качестве контроля стандартных солей желчных кислот. Проводят также тест по выделению референс-штамма *E. coli* на средах с испытуемыми и стандартными желчными солями. Плотные питательные среды с различными солями желчи проверяют методом поверхностной капли по Miles и Misra (12). Для каждой среды записывают ростовые характеристики различных энтеробактерий.

#### **5. Красители и индикаторы pH:**

Добавляемые в питательные среды красители используют как селективные вещества, а также в качестве индикаторов pH или окислительно-восстановительного потенциала. Их ингибирующая активность может зависеть от взаимодействия с другими компонентами среды. Так, активность бриллиантового зеленого в отношении *E. coli* существенно варьирует в растворах разных пептонов. С бриллиантовым зеленым взаимодействуют соли желчи, в результате чего снижается токсичность краски и это надо учитывать при введении таких красителей в среду с желчными солями. Анилиновые красители более токсичны в состоянии полной окисленности, а при их стерилизации в присутствии пептона (в составе бульона) возможно их частичное восстановление. Также при использовании агара с высоким содержанием минеральных веществ часто наблюдается несовместимость компонентов среды. В этой связи необходимо, чтобы красители, используемые для приготовления питательных сред, проходили контроль согласно «N.J.Conn's Biological Stains», 9е издание, издательство Williams & Wilkins Company, Baltimore. Кроме контроля химической чистоты краситель должен быть проверен микробиологическим методом, т. е. путем посева референс-штаммов на среды с испытуемым и стандартным красителями, инкубирования и сравнения результатов культивирования.

#### **6. Гелеобразователь:**

Основное предназначение агара-агара в питательной среде - сформировать гель определенной плотности. Важной характеристикой является также прозрачность агаровой питательной среды. В идеале, расплавленный агар должен быть кристально чистым, без признаков помутнения или осадка. Причиной помутнения является несовместимость минеральных веществ или попадание в среду мельчайших частиц (в результате неэффективной фильтрации). Другой характеристикой агара являются параметры диффузии различных химических соединений в агаровом геле. Это свойство агаровых сред используется для микробиологической оценки витаминов и антибиотиков. Диффузия происходит из резервуара, расположенного в определенной точке агара. При этом вокруг резервуара образуется зона задержки роста микробов, диаметр которой прямо пропорционален активности антибиотика, или зона роста, пропорциональная активности витамина. Агар-агар для бактериологических целей должен отвечать следующим физико-химическим параметрам:

1.Содержание золы	Не более 1,9 %
2.Кислотонерастворимая зола	Не более 0,25 %
3.Сульфаты	Не более 1 %
4.Хлориды	Не более 0,1 %
5.Кальций	Не более 0,4 %
6.Магний	Не более 0,2 %
7.Общий азот	Не более 0,25 %
8.Железо	Не более 0,0025 %
9.Плотность геля	Не менее 530 г/см <sup>2</sup>
10.Температуразастывания	Не более 36°С
11.Влажность	Не более 15 %
12.рН 1,2%-гогеля	До автоклавирувания не более 6,1; после - не менее 5,7
13.Диффузия агаровогогеля	Не менее 1,2 мм/час
14.Температураплавления 1,2%-гогеля	Не более 85°С

Кроме того, проводят тест на присутствие в агаре токсичных веществ и ингибиторов роста микроорганизмов. Для этого на испытуемую питательную среду и среду со стандартным агар-агаром засевают быстро растущие микробы с последующим сравнением скорости роста, размера, формы, пигментированности колонийи т.д.

#### 7. Витамины:

Анализ витаминов и их предшественников на химическую чистоту и по другим тестам проводится согласно Фармакопее США (14) и Пищевому Химическому Кодексу США (7). Помимо химического анализа активность подтверждается микробиологическими методами в соответствии с рекомендациями Ассоциации химиков-аналитиков (3).

#### **Контроль качества в ходе производства:**

Пробный образец готовят из прошедших входной контроль компонентов и анализируют, сравнивая с эталонной партией готовой среды. После оценки всех характеристик, включая цвет, прозрачность, рН, растворимость, гелеобразование, совместимость ингредиентов и культуральные характеристики образца, в случае соответствия всех характеристик нормативным требованиям, принимают решение о запуске в производство крупномасштабной партии среды. В процессе производства в соответствии с принципами GMP (хорошей практики производства) каждой стадии уделяется самое пристальное внимание (14). На промежуточных стадиях производства отбирают образцы и доставляют в контрольную лабораторию для микробиологической оценки по собственным критериям, разработанным компанией HiMedia. При большинстве производственных процессов постоянно контролируют такие условия, как температура, влажность и др. Производство осуществляют на оборудовании из нержавеющей стали или стекла, что позволяет предотвращать загрязнение продукции токсичными металлами.

#### **Контроль качества готовых сред:**

Готовую продукцию проверяют в сухом виде по ряду физико-химических параметров, чтобы убедиться в соответствии их нормативным требованиям: внешний вид, цвет, запах, влажность, растворимость, прозрачность, рН, температура гелеобразования

(для агаровых сред). Для контроля стабильности характеристик от партии к партии у полученной среды изучают культуральные свойства, сравнивая их характеристики с характеристиками эталонной среды. Среда должна пройти все тесты, утвержденные протоколом лаборатории контроля качества HiMedia: ростовые свойства, дифференциация, биохимические параметры, обнаружение роста при посеве минимального инокулюма, селективность и др. После прохождения всех тестов продукцию направляют в торговую сеть.

#### **Исследование стабильности при складском хранении конечной продукции:**

Образцы прошедшей контроль продукции и протоколы, составленные в ходе их производства, хранят для будущих сравнительных исследований. Через 6 месяцев со дня изготовления для подтверждения стабильности проводят исследование образцов партии, сравнивая их характеристики с характеристиками эталонной среды.

#### **Литература:**

1. American Public Health Association - Standard Methods for Examination of Dairy Products, 14th edition, 1978
2. American Public Health Association - Compendium of Methods for Microbiological Examination of Food, 1976
3. Association of Official Analytical Chemists, 14th edition, 1984
4. Clinical Bacteriology by E. Joan Stokes & G.L. Ridgway, 5th edition, 1980
5. Cruickshank R., Duguid, J.P., Marmion, B.P. & Swain, R.H.A., 1975, Medical Microbiology, 12th Edition, - Churchill Livingstone, Edinburg, London, New York.
6. FDA Bacteriological Analytical Manual, U.S.A., 5th edition, 1979.
7. Food Chemical Codex, 3rd edition, 1981.
8. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology, 2nd edition, 1985 by John A. Washington Published by Springer-Verlag, New York.
9. Manual of Clinical Microbiology, 4th edition by American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985.
10. Media for isolation-cultivation-identification & Maintenance of Medical Bacteria. Vol. I, by Jean F. MacFaddin, Williams & Wilkins. Baltimore, 1985.
11. Methods in Carbohydrate Chemistry Vol I, Academic Press, U.S.A.
12. Miles A.A. & Misra S.S. (1938) "The Examination of Bactericidal Power of Blood" J. Hyg. Camb 38, 732-748
13. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 1985, 16th edition, APHA, AWWA, WPCF.
14. U.S. Pharmacopeia XXI National Formulary XVI, 1985.

# ХайМедиа Лабораториз Пвт. Лтд.

Для драгоценной жизни

**HIMEDIA**<sup>®</sup>

## Микробиология на службе человечеству

Компания HiMedia Laboratories Pvt Ltd (Индия) мировой лидер по производству высококачественной продукции для бактериологии и вирусологии, предназначенной для организаций системы здравоохранения, санитарно-эпидемиологической службы, сертификационных центров, биотехнологических предприятий, научно-исследовательских институтов и для предприятий фармацевтической промышленности.

### Профиль продукции

- Сухие и готовые к употреблению питательные среды
- Компоненты: бактериологический агар, пептоны, желчь и соли желчных кислот, дрожжевой, мясной и др. Экстракты
- Питательные среды для культур клеток
- Диски с антибиотиками и диспенсер для картриджей, индикаторные диски и полоски
- ХайКомб МИК тест, минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков
- Система для выращивания анаэробов
- Полный спектр продукции для диагностики туберкулеза
- Пластиковая посуда и разные типы тампонов для биологических образцов
- Системы для транспортировки клинических образцов
- Флаконы для гемокультур
- Металлические и пластиковые бактериологические петли
- Лабораторные реактивы и биохимикаты высокой очистки
- Индикаторы и красители
- Полный спектр продукции для диагностики листериоза (ГОСТ Р 51921-2002)



Представительство в РФ, странах СНГ и Балтии.

*Почтовый адрес: 124498, Москва, а/я 130*

*Офис: 123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 13 а, стр. 3*

*Тел/Факс: (495) 940-33-96/ 940-33-97/ 940-33-98,*

*940-33-12/ 940-33-13/ 940-33-14*

*E-mail: [himedia@orc.ru](mailto:himedia@orc.ru)*



Продукция зарегистрирована в Минздраве России, Беларуси, Украины, Казахстана, Узбекистана, Латвии и разрешена к применению.

**HiMedia Laboratories Pvt. Limited**

A-406, Bhaveshwar Plaza, LBS Marg, Mumbai - 400 086, India.

Fax : 00-91-22-2500 5764, 2500 2468, 2500 2286 Phone : 2500 0970, 2500 3747, 2500 1607, 2500 0653

Email : [info@himedialabs.com](mailto:info@himedialabs.com) / [sarojw@giasbm01.vsnl.net.in](mailto:sarojw@giasbm01.vsnl.net.in) Website : [www.himedialabs.com](http://www.himedialabs.com)

www.himedialabs.com

www.himedialabs.ru



**HIMEDIA**<sup>®</sup>

**HiMedia Laboratories Pvt. Limited**

A-406, Bhaveshwar Plaza, LBS Marg, Mumbai - 400 086, India. Fax : 00-91-22-2500 5764, 2500 2468, 2500 2286  
Phone : 2500 0970, 2500 3747, 2500 1607, 2500 0653 Email : [info@himedialabs.com](mailto:info@himedialabs.com) / [sarojw@giasbm01.vsnl.net.in](mailto:sarojw@giasbm01.vsnl.net.in)  
Website : [www.himedialabs.com](http://www.himedialabs.com)

Отпечатано в Индии с готовых диапозитивов