3.3.2. МЕДИЦИНСКИЕ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза

Методические указания
МУ 3.3.2.2124—06

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны: Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» (И. А. Дятлов, И. В. Шульгина, Т. Н. Донская, О. П. Плотников, Г. Ю. Куляш, А. К. Никифоров); Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича (Л. В. Саяпина, Т. И. Анисимова); Ростовским научно-исследовательским противочумным институтом (Л. С. Подосинникова, Г. Д. Харабаджахян, Н. Р. Телесманич, А. Б. Мазрухо); Иркутским научно-исследовательским противочумным институтом (Э. С. Каретникова, О. Г. Татарникова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 2 от 11.07.06).

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 17 августа 2006 г.

4. Введены взамен «Инструкции по бактериологическому контролю диагностических питательных сред для холерного вибриона» (утв. ГУКИ МЗ СССР 02.02.83), «Инструкции по бактериологическому контролю диагностических питательных сред для чумного микроба» (утв. ГУКИ МЗ СССР 07.09.83), «Инструкции по бактериологическому контролю диагностических питательных сред для туляремийного микроба» (утв. в Иркутском НИ противочумном институте Сибири и Дальнего Востока 08.10.82).

Содержание

1. Область применения 122
2. Нормативные ссылки 122
3. Общие положения 123
4. Биологические показатели, применяемые для оценки питательных сред 123
5. Организация проведения контроля 123
6. Проведение контроля и оценка качества питательных сред 124
   6.1. Контроль питательных сред для выделения, культивирования и идентификации возбудителя чумы 124
   6.2. Контроль питательных сред для выделения и культивирования возбудителя холеры 129
   6.3. Контроль качества питательных сред для выделения и культивирования возбудителя туляремии 135
   6.4. Контроль питательных сред по биологическим показателям для выделения и культивирования возбудителя бруцеллеза 137
   6.5. Контроль питательных сред для выделения и культивирования сибиреязвенного микроба 140
   6.6. Контроль питательных сред для выделения и культивирования возбудителя легионеллеза по биологическим показателям 142

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
17 августа 2006 г.
Дата введения: с момента утверждения

3.3.2. МЕДИЦИНСКИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза

Методические указания
МУ 3.3.2.2124—06

1. Область применения

Методические указания по контролю диагностических питательных сред по биологическим показателям предназначены для контроля питательных сред лабораторного и промышленного изготовления, используемых при диагностике особо опасных инфекций (ООИ), по биологическим показателям.

Настоящими методическими указаниями необходимо руководствоваться бактериологам лабораторий противочумных учреждений, отделов особо опасных инфекций центров гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, специализированных лабораторий учреждений здравоохранения.

2. Нормативные ссылки

2.1. Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан.

2.2. Медицинские иммунобиологические препараты. Основные термины и положения: РД 42-28-24—88.

2.3. Положение о государственной регистрации сертификации и государственном контроле за качеством медицинских иммунобиологических препаратов в Российской Федерации: Постановление ГК СЭН от 03.07.94 № 5.

2.4. Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности: СП 1.3.1285—03.

2.5. Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами: СП 1.2.731—99.

2.6. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности: СП 1.2.036—95.

2.7. Медицинские иммунобиологические препараты. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов: СП 3.3.2.561—96.

3. Общие положения

3.1. Питательные среды по своему назначению подразделяются на диагностические и среды для выращивания биомассы при производстве различных медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП).

3.2. Диагностические среды включают: среды накопительные и для культивирования; для выделения конкретного возбудителя (элективные и селективные); дифференциальные (содержащие индикаторы, красители и т. д.); для идентификации, позволяющие по отдельным признакам (отношение к углеводам, мочевине, подвижности и т. п.) проводить идентификацию микроорганизмов.

3.3. Исследования по контролю качества питательных сред организуют и проводят в соответствии с санитарными правилами СП 1.3.1285—03 и СП 1.2.731—99.

4. Биологические показатели, применяемые для оценки питательных сред

4.1. Чувствительность определяют по максимальному разведению культуры, при котором на всех засеянных чашках (пробирках) наблюдается рост. По этому показателю оценивают диагностические среды для выделения и дифференциальные.

4.2. Показатель прорастания – по проценту выросших колоний микроорганизмов от числа засеянных клеток. По этому показателю оценивают питательные среды для культивирования.

4.3. Эффективность – по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды. По этому показателю контролируют питательные среды для культивирования и среды, используемые в производстве МИБП.

4.4. Показатель стабильности основных свойств микроорганизмов при выращивании на испытуемой среде – по отношению числа атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным и другим свойствам колоний к числу выросших на агаровых пластинках колоний тест-штаммов. Определяют для всех сред.

4.5. Дифференцирующие свойства – по выраженности отличительных видовых и других признаков микроорганизмов определяют для сред дифференциальных и идентификации.

4.6. Показатель ингибиции – по степени подавляющего воздействия на постороннюю микрофлору; выражается количеством микробов-ассоциантов, которое не растет на среде или числом сформировавшихся колоний микробов-ассоциантов, не препятствующих выделению возбудителя. Контролируют среды для выделения, дифференциальные и для накопления.

4.7. Показатель скорости роста – по минимальному времени вырастания культуры, для диагностических сред.

5. Организация проведения контроля

Для лабораторной диагностики возбудителей особо опасных инфекций используют питательные среды, имеющие сертификат производства и лицензию на

производство, хранение и распространение, или среды, приготовленные по рецептуре, изложенной в методических руководствах и нормативных документах.

5.1. Качество питательных сред проверяют противочумные учреждения, применяя тест-штаммы I—IV групп патогенности, предусмотренные для контроля конкретных питательных сред. Лаборатории отделов особо опасных инфекций проводят контроль питательных сред с использованием тест-штаммов III—IV групп патогенности.

5.2. Для лицензированных питательных сред бактериологическому контролю подлежит первая варка и по одной варке ежегодно от каждой серии, а также все варки серии при изменении условий ее хранения или приготовления.

5.3. Для нелицензированных питательных сред, приготовленных по утвержденной рецептуре, контролируют каждую варку.

5.4. На контроль направляют по 200 мл плотных и по 100 мл жидких питательных сред. На этикетке указывают предприятие-изготовитель, название питательной среды, номер серии, дату приготовления, срок годности. Упаковка должна исключать возможность боя посуды и загрязнение среды при транспортировании.

5.5. Ингибиторы (теллурит калия, генцианвиолет и др.), среды с ингибиторами и стимуляторами роста (гемолизированная кровь и др.) проверяют противочумные учреждения.

5.6. Препаратами сравнения (контроль) должны быть ранее проверенные качественные питательные среды (аналоги по назначению).

5.7. Срок годности готовых питательных сред определен в нормативной документации и инструкциях по применению каждой конкретной среды.

6. Проведение контроля и оценка качества питательных сред

6.1. Контроль питательных сред для выделения, культивирования и идентификации возбудителя чумы

6.1.1. Тест-штаммы

Для бактериологического контроля питательных сред, предназначенных для культивирования и выделения возбудителя чумы, используют штаммы *Yersinia pestis* EV, *Yersinia pestis* Р-1680 – Закавказского горного очага и *Yersinia pestis* И-2377 – Горно-Алтайского очага.

В качестве тест-штамма при контроле ингибиторов посторонней микрофлоры используют *Escherichia coli* 18, *Bacillus cereus* 8 и *Proteus vulgaris* НХ 19 № 222. Тест-штаммы получают из ГИСК им. Л. А. Тарасевича через Государственную коллекцию патогенных бактерий «Микроб».

При бактериологическом контроле сред для идентификации чумного и псевдотуберкулезного микробов по признаку ферментации мочевины и углеводов (ЦДС) используют тест-штаммы *Yersinia pestis* EV и *Yersinia pseudotuberculosis* И-199, который получают из Иркутского НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока.

6.1.2. Порядок хранения тест-штаммов

Тест-штаммы *Y. pestis* EV, *Y. pestis* Р-1680, *Y. pestis* И-2377, *E. coli* 18, *P. vulgaris* НХ19 № 222, *B. cereus* 8 и *Y. pseudotuberculosis* И-199 хранят в лиофилизированном состоянии при температуре (5 ± 1) °С до сохранения их свойств согласно п. 6.1.3. Рабочие субкультуры хранят в 0,4 %-м агаре Хоттингера рН 7,2 ± 0,1 (по МУК 4.1/4.2.588—96, с. 46) под слоем стерильного вазелинового масла или на скошенном агаре Хоттингера рН 7,2 ± 0,1 в запаянных пробирках при температуре (5 ± 1) °С.

Пересевы культур проводят не менее 1 раза в 3 мес., но не более четырех раз. По истечении этого срока для работы вскрывают новую ампулу с культурой.

6.1.3. Требования к тест-штаммам

Тест-штаммы *Y. pestis* EV, Р-1680 и И-2377 должны обладать типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами, лизироваться чумным бактериофагом Л-413С. По морфологии – должны быть грамотрицательными палочками, на агаре образовывать колонии R-формы, в бульоне – рыхлый осадок с прозрачной надосадочной жидкостью. Биохимические свойства – должны ферментировать глюкозу, маннит и мальтозу, штамм *Y. pestis* EV не должен разлагать глицерин и рамнозу; штаммы Р-1680 и И-2377 должны ферментировать рамнозу и глицерин. Штамм *Y. pestis* EV при температуре выращивания (28 ± 1) °С нуждается в аминокислотах – фенилаланине, метионине, треонине и цистеине; *Y. pestis* И-2377 – в фенилаланине, цистеине, аргинине и лейцине; *Y. pestis* Р-1680 – в фенилаланине, метионине и тиамине (витамин B_1). При работе с тиаминзависимыми штаммами Р-1680 Закавказского горного очага в питательные среды следует добавлять витамин B_1 (0,0001 мг на 100 мл среды) или среду 199 (3 мл на 100 мл среды).

Тест-штамм *Y. pseudotuberculosis* И-199 должен быть типичным по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, лизироваться псевдотуберкулезным бактериофагом. На агаровых средах при температуре (28 ± 1) °С тест-штамм псевдотуберкулезного микроба растет в виде бугристых хромогенных колоний, в бульоне – равномерное помутнение; в мазках – грамотрицательные палочки. Тест-штамм должен ферментировать глюкозу, арабинозу, маннит, рамнозу, мочевину; не должен расщеплять лактозу, сахарозу; должен обладать подвижностью.

Тест-штамм *P. vulgaris* НХ 19 № 222 должен быть типичным по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. В бульоне через 18—24 ч роста при температуре (37 ± 1) °С – равномерное помутнение с пленкой на поверхности, на агаровых средах – в виде мутных сероватых роящихся колоний. В мазках – грамотрицательные палочки. Тест-штамм *P. vulgaris* должен ферментировать с образованием кислоты и газа глюкозу, маннозу, сахарозу и не расщеплять маннит и арабинозу.

6.1.4. Подготовка тест-штаммов

Культуры каждого тест-штамма из ампулы или со среды хранения пересевают в пробирку с бульоном Хоттингера рН 7,2 ± 0,1 (МУК 4.1/4.2.588—96, с. 45) и на чашки Петри с агаром Хоттингера рН 7,2 ± 0,1. Посевы с *Y. pestis* EV, *Y. pestis* Р-1680, *Y. pestis* И-2377 и *Y. pseudotuberculosis* И-199 инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение (48 ± 1) ч; посевы с *E. coli* 18, *P. vulgaris* НХ19 № 222 и *B. cereus* 8 – при температуре (36 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч. Выросшие на питательном агаре культуры каждого штамма проверяют визуально на чистоту роста и пересевают на скошенный в пробирках питательный агар. В случае отсутствия роста на питательной среде для последующего пассажа используют культуру, выращенную на питательном бульоне. После инкубации посевов *Y. pestis* EV, *Y. pestis* Р-1680, *Y. pestis* И-2377 и *Y. pseudotuberculosis* И-199 при температуре (28 ± 1) °С и *E. coli* 18, *P. vulgaris* НХ19 № 222 и *B. cereus* 8 – при температуре (36 ± 1) °С в течение (24 ± 1) ч, культуры используют для контроля питательных сред.

Для посева на испытуемые среды используют культуры тест-штаммов не более 3—4 пассажей на питательных средах.

Из суточных агаровых культур тест-штаммов готовят взвесь в 0,9 %-м растворе натрия хлорида рН 7,1 ± 0,1 концентрацией 1 × 10^9 м.к./мл *Y. pestis*, *Y. pseudotuber-*

culosis и *P. vulgaris* по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича ОСО 42-28-85П 10 единиц и делают 10-кратные последовательные разведения, перенося 0,5 мл взвеси в 4,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида до разведения 10^{-7} (1×10^2 м. к./ мл), тщательно перемешивая и меняя стерильную пипетку после переноса квоты каждого разведения.

6.1.5. Определение показателя прорастания и чувствительности плотных и жидких питательных сред и скорости роста на них возбудителя чумы

Контроль жидких сред. Культуру из разведений 10^{-5} (1×10^4 м.к./мл) и 10^{-6} (1×10^3 м.к./мл) вносят по 0,1 мл в 3 пробирки с 10 мл жидкой питательной среды. Контролем служит заранее отконтролированный бульон.

Контроль плотных сред. Культуру из разведения 10^{-6} (1×10^3 м. к./мл) и 10^{-7} (1×10^2 м. к./мл) наносят по 0,1 мл на 3 свежеприготовленные и хорошо подсушенные агаровые пластинки. Взвесь распределяют по поверхности агара покачиванием чашки Петри. Контролем должен служить заранее отконтролированный агар.

Учет результатов. Учет результатов проводят через 24 и 48 ч инкубации при температуре (28 ± 1) °С. Жидкие питательные среды считают пригодными для использования в диагностических целях, если через 24 ч в бульоне появляется видимый рост культуры, а через 48 ч – интенсивный рост чумного микроба во всех пробирках при высеве 1×10^3 м.к. на 10 мл среды (разведение 10^{-5}) и в одной из пробирок при посеве 1×10^2 м.к. на 10 мл среды (разведение 10^{-6}).

Плотные питательные среды должны обеспечивать рост чумного микроба через 48 ч инкубации на всех агаровых пластинках при высеве 10 м.к., показатель прорастания при высеве 100 м.к. должен быть не менее 50 %. Начальный рост чумного микроба («кружевные платочки») должен быть через 24 ч инкубации; типичные колонии диаметром не менее 1 мм – через 48 ч. Морфология микробов – грамотрицательные биполярные полиморфные палочки.

6.1.6. Определение показателя эффективности

Плотные питательные среды. Готовят взвесь *Y. pestis* EV из суточной агаровой культуры с концентрацией 5×10^8 м.к./мл, эквивалентную 5 единицам стандартного образца мутности ОСО 42-28-85П. По 0,1 мл этой взвеси засевают на 2 пробирки с 5 мл скошенного испытуемого агара (в нижней части пробирки не должно быть столбика). Через 48 ч инкубации при температуре (28 ± 1) °С культуру смывают с поверхности агара 2,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. К 0,5 мл полученной взвеси мерно добавляют 0,9 %-й раствор натрия хлорида до концентрации 1×10^9 м.к./мл, эквивалентной 10 единицам ОСО 42-28-85П. Например, на 0,5 мл взвеси, смытой со скошенного агара, пошло 3,2 мл растворителя; всего в пробирке будет 0,5 мл + 3,2 мл = 3,7 мл. Выход с 1 мл среды – $3,7 \times 10^9$ м.к.

Жидкие питательные среды. Из суточной агаровой культуры *Y. pestis* EV готовят взвесь из разведений 10^{-5} (1×10^4 м.к./мл) и 10^{-6} (1×10^3 м.к./мл). По 1 мл взвеси из каждого разведения вносят в 3 пробирки с 10 мл жидкой испытуемой среды. Исходное число засеянных клеток чумного микроба в 1 мл среды будет составлять соответственно 1×10^3 и 1×10^2 м.к. Параллельно делают высев по 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-6} на 3 агаровые пластинки в чашках Петри для определения числа жизнеспособных клеток в посевной дозе (n_0). Через 48 ч инкубации посевов при температуре (28 ± 1) °С из каждой пробирки производят высев по 0,1 мл на чашки с питательным агаром (n_t). В случае обильного роста культуры в жидкой среде ее перед высевом на

чашки разводят. Степень разведения учитывают при обсчете результатов. Прирост (J) числа микроорганизмов после инкубации посевов проводят по формуле (%):

$$J = \frac{n_t - n_0}{n_t} \times 100$$

6.1.7. Определение стабильности биологических свойств культур при выращивании их на проверяемых питательных средах

Стабильность основных свойств чумного микроба определяют по отношению числа атипичных по морфологии колоний тест-штаммов к общему числу колоний на чашках с испытуемыми средами, а также по биохимическим свойствам и лизабельности бактериофагом диагностическим чумным Л-413С. Оценку морфологии проводят на чашках, где выросло не менее 25 и не более 150 отдельных колоний. При этом оценивают:

а) характер роста культур в жидкой среде (хлопьевидный осадок, прозрачная надосадочная жидкость), форму, структуру, характер роста колоний и их величину на плотной среде (шероховатые колонии не менее 1 мм в диаметре с кружевной периферией);

б) морфологию микробов – грамотрицательные биполярные полиморфные палочки. Количество атипичных колоний тест-штаммов не должно составлять более 1 %.

Биохимические свойства и лизабельность фагами должны соответствовать изложенным в п. 1.3, их проверяют только при государственных испытаниях новых питательных сред.

6.1.8. Определение дифференцирующих свойств питательных сред

Дифференцирующие свойства питательной среды ЦДС, применяемой для идентификации чистых культур возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, определяют с использованием тест-штаммов *Y. pestis* EV и *Y. pseudotuberculosis* И-199 по признаку ферментации углеводов и мочевины.

Для проведения контроля среды используют культуры тест-штаммов, выращенные при температуре (28 ± 1) °С в течение (23 ± 1) ч на скошенном в пробирках агаре Хоттингера pH 7,2 ± 0,1. По одной бактериологической петле № 2 по Чаплевскому (d = 2 мм) культуры *Y. pestis* EV и *Y. pseudotuberculosis* И-199 вносят «уколом» в столбик с 5 мл питательной среды, затем той же петлей производят посев «штрихом» на скошенную поверхность среды. Одну пробирку со средой оставляют незасеянной (контроль). Посевы инкубируют в течение 48 ч при температуре (28 ± 1) °С. Определяют наличие роста тест-штаммов и изменение цвета среды визуально. В последнем случае контролем служит пробирка со стерильной средой.

При росте *Y. pestis* EV столбик среды окрашивается в красно-оранжевый цвет, скошенная поверхность в сине-зеленый; при росте *Y. pseudotuberculosis* И-199 – столбик и скошенная поверхность среды окрашиваются в синий цвет.

6.1.9. Контроль ингибирующих свойств питательных сред

При выделении возбудителя чумы из биологического материала или объектов внешней среды для подавления сопутствующей микрофлоры применяют среды с генцианвиолетом (С.I. 42555), кристаллвиолетом или питательную среду для выделения чумного микроба. Для приготовления рабочего раствора генцианвиолета готовят насыщенный спиртовой раствор: 1 г сухого препарата заливают 10 мл 96 %-го спирта и оставляют на сутки при температуре (22 ± 1) °С. При необходимости срочного приготовления раствора его выдерживают в термостате при температуре

(37 ± 1) °С в течение 2—3 ч. После соответствующей экспозиции 1 мл спиртового насыщенного раствора генцианвиолета прибавляют к 99 мл дистиллированной воды и получают спиртово-водный рабочий раствор (1 : 1 000).

Ингибирующие свойства среды определяют как по отношению к чумному микробу, так и по отношению к микробам-ассоциантам. Для выбора доз генцианвиолета испытывают следующие конечные концентрации препарата в агаре: 1 : 100 000, 1 : 150 000, 1 : 200 000, 1 : 250 000, 1 : 300 000, 1 : 400 000, для чего к 100 мл расплавленного агара добавляют соответственно 1,0; 0,66; 0,5; 0,4; 0,3; 0,25 мл рабочего раствора генцианвиолета.

Испытание ингибирующих свойств генцианвиолета необходимо проводить на зарегистрированных питательных средах или агаре Хоттингера с проверенными стимуляторами роста (гемолизированная кровь, сульфит натрия), при необходимости – с добавлением витамина B_1.

Для определения показателя ингибиции готовят смесь путем соединения 1 мл взвеси, содержащей 1×10^3 м.к./мл тест-штамма *Y. pestis* EV и 1 мл взвеси, содержащей 1×10^6 м.к./мл *P. vulgaris*. Из указанной смеси производят высев по 0,1 мл на агаровые пластинки с испытуемой средой (по 3 чашки на каждое разведение генцианвиолета и 3 чашки с агаром без ингибитора). Одновременно засевают по 3 чашки с теми же средами культурой чумного микроба без протея (1×10^2 м.к. на чашку). Учет результатов проводят через 48 ч.

Для работы выбирают разведения генцианвиолета, резко тормозящие ползучий рост вульгарного протея и не угнетающие рост чумного микроба. На агаровых пластинках с генцианвиолетом без протея среднее число колоний чумного микроба должно быть не менее 30. На агаре без ингибитора должен быть сплошной рост протея. При посеве чумного микроба без протея среднее число колоний на агаре без генцианвиолета должно быть не менее 50.

В целях ингибиции посторонней микрофлоры можно использовать кристаллвиолет в той же концентрации после соответствующего контроля и определения оптимальных доз.

Для контроля питательной среды для выделения и культивирования чумного микроба по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-7} (1×10^2 м.к./мл) *Y. pestis* EV, *Y. pestis* Р-1680, *Y. pestis* И-2377 наносят на три чашки Петри с контрольной и испытуемой средами. Взвесь распределяют по поверхности среды покачиванием чашки.

Учет результатов проводят визуально через (47 ± 1) ч инкубации при температуре (28 ± 1) °С. Должен наблюдаться рост на всех засеянных чашках *Y. pestis* EV, *Y. pestis* Р-1680, *Y. pestis* И-2377 в виде выпуклых, пигментированных, зернистых колоний с нежной кружевной зоной диаметром 0,5—1,0 мм. Дополнительно на 3 чашки Петри с обеими средами наносят по 0,1 мл смеси тест-штаммов: *Y. pestis* EV из разведения 10^{-5} (1×10^4м.к./мл), *P. vulgaris* НХ 19 № 222 – из 10^{-4} (1×10^5 м.к./мл), *B. cereus* 8 – из 10^{-3} (1×10^6 м.к./мл), *E. coli* 18 – из 10^{-2} (1×10^7 м.к./мл) и 0,9 %-й раствор натрия хлорида в соотношении 0,5 : 0,5 : 0,5 : 0,5 : 3,0. На питательной среде должно вырастать не более 10 колоний тест-штаммов *E. coli* 18, *B. cereus* 8, допускается рост только изолированных колоний *P. vulgaris* НХ 19 № 222 без тенденции к роению.

6.1.10. Контроль стимуляторов роста чумного микроба

Для стимуляции роста чумного микроба на питательных средах используют сульфит натрия по ГОСТ 195—77 и кровь гемолизированную.

Раствор сульфита натрия готовят ex temporae. Навеску препарата (0,25 г) растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды и подогревают на пламени горелки до кипения. Раствор в количестве 1 мл добавляют к 100 мл расплавленного агара, хорошо перемешивают и разливают по чашкам Петри. К 10 мл питательного бульона добавляют 0,1 мл (2 капли) раствора сульфита натрия.

Перед использованием сульфита натрия проводят проверку его качества. К агару, утратившему свою биологическую активность, дающему рост чумного микроба при посеве 1×10^2 м.к. в виде единичных колоний (1—4) или при отсутствии его роста, добавляют испытуемый раствор сульфита натрия в концентрациях 1 : 8 000, 1 : 4 000, 1 : 2 000, 1 : 1 000. Контролем служит тот же агар без добавления стимулятора, а также заранее отконтролированный агар. Сульфит натрия считается годным в той наименьшей концентрации, при которой он обеспечивает рост не менее 50 колоний тест-штамма чумного микроба.

Сульфит натрия проверяют через 2—3 месяца, т. к. при неправильном хранении (в негерметичной посуде, на свету) препарат окисляется до сульфата натрия, который не стимулирует роста чумного микроба.

Кровь гемолизированную выпускают в ампулах по 5 мл, хранят при температуре от 2 до 10 °С в защищенном от света месте, срок годности – 5 лет. Для определения степени стимуляции гемолизированной крови используют агар Хоттингера pH 7,2 ± 0,1 с низким содержанием аминного азота (35 ± 10) мг %, хлоридов не выше 0,5 %, агара микробиологического 2,0–2,3 %, на котором при посеве 1×10^2 м.к. чумного микроба отсутствуют или вырастают единичные колонии (1—4). В агар, разлитый по 100 мл, расплавленный и остуженный до температуры (46 ± 1) °С, добавляют 1 мл крови гемолизированной, которую перемешивают со средой путем легкого покачивания флакона. Агар разливают в чашки Петри, контролем служит эта же агаровая среда без добавления стимулятора. На все агаровые пластинки засевают суточную культуру вакцинного штамма чумного микроба по 1×10^2 м.к. в 0,1 мл взвеси в 0,9 %-м растворе натрия хлорида. Посевы помещают в термостат при температуре (28 ± 1) °С на 2—3 сут., затем подсчитывают число выросших колоний. Стимулятор считают пригодным для работы в том случае, если на среде с гемолизированной кровью вырастает не менее 30 колоний, а на среде без него рост отсутствует или вырастают единичные колонии.

6.2. Контроль питательных сред для выделения и культивирования возбудителя холеры

6.2.1. Тест-штаммы

В зависимости от проверяемой среды и целей контроля, в качестве тест-штаммов используют *Vibrio cholerae* O1 P-1 (145) классического биовара, *Vibrio cholerae* O1 M-878 биовара эльтор, *Vibrio cholerae* не O1 P-9741, *Escherichia coli* 18 и *Proteus vulgaris* HX 19 № 222, которые получают из ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Контроль питательных сред для выделения галофильных вибрионов проводят с тест-штаммом *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, который получают из коллекции музея живых культур Ростовского-на-Дону НИПЧИ. В лабораториях, имеющих разрешение на работу с возбудителем холеры (II группа патогенности), контроль качества питательных сред проводят с *V. cholerae P-1(145)* классического биовара, *V. cholerae* O1 M-878 биовара эльтор и *V. cholerae не O1* P-9741. Для контроля сред в лабораториях, не имеющих разрешения на работу с возбудителем холеры, используют штамм *V.cholerae* не O1 P-9741. Тест-штаммы *E. coli* 18 и *P. vulgaris* HX 19 № 222 используют для контроля сред с ингибиторами посторонней микрофлоры.

6.2.2. Порядок хранения тест-штаммов

Тест-штаммы *V. cholerae* Р-1 (145) классического биовара, *V. cholerae* М-878 биовара эльтор, *V. cholerae* не О1 Р-9741 и *V. parahaemolyticus* АТСС 17802 хранят в лиофилизированном состоянии при температуре 4—6 °С не более 5 лет или в 0,3—0,4 %-м питательном агаре pH 7,7 ± 0,1, *V. parahaemolyticus* АТСС 17802 – в 0,3—0,4 %-м питательном агаре pH 7,7 ± 0,1 с 3 % натрия хлорида под слоем стерильного вазелинового масла в защищенном от света месте при температуре 18—25 °С. Пересевы культур проводят не менее 1 раза в 3 мес., но не более четырех раз. По истечении этого срока для работы вскрывают новую ампулу с культурой.

Условия хранения тест-штаммов *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 должны соответствовать требованиям, изложенным в п. 6.1.2.

6.2.3. Требования к тест-штаммам

Тест-штаммы *V. cholerae* О1 и не О1 должны обладать типичными для S-формы культуральными, морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами.

В бульоне Мартена pH 7,7 ± 0,1 через 18—24 ч роста вибрионы должны давать равномерное помутнение среды и нежную пленку на поверхности, на агаровых средах pH 7,7 ± 0,1 через 12—24 ч – гладкие, округлые, прозрачные (для *V. cholerae* не О1 – полупрозрачные), голубоватые в проходящем свете колонии диаметром 1,0—1,5 мм. В мазках при окраске по Грамму выявляются грамотрицательные изогнутые палочки.

Тест-штаммы должны ферментировать с образованием кислоты сахарозу, маннозу и не расщеплять арабинозу. Штаммы *V. cholerae* классического и эльтор биоваров должны агглютинироваться до титра диагностическими холерными сыворотками О1 адсорбированной и гомологичными типовыми (Инаба или Огава), лизироваться только гомологичными (классическим или эльтор) фагами. Тест-штамм *V. cholerae* не О1 не должен агглютинироваться холерными сыворотками О1 группы, обладать чувствительностью к холерным и эльтор диагностическим бактериофагам.

Тест-штаммы холерного вибриона проверяют на отсутствие диссоциации путем определения агглютинабельности культуры в растворе трипофлавина. Для постановки данного теста агаровую культуру каждого из тест-штаммов растирают петлей в капле 0,2 %-го водного раствора трипофлавина. Образование агглютината свидетельствует о наличии SR-диссоциации в культуре.

Для определения стабильности суспензии каждого из тест-штаммов *V. cholerae* используют следующий метод. Готовят суспензию суточной агаровой культуры тест-штамма холерного вибриона в 0,9 %-м растворе натрия хлорида pH 7,1 ± 0,1 концентрацией $2,2 \times 10^9$ м.к./мл., эквивалентную 10 единицам по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича ОСО 42-28-85П и инкубируют её в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 ч. За это время взвесь должна сохранить свою гомогенность. Появление хлопьев свидетельствует о склонности штамма к спонтанной агглютинации.

Тест-штамм *V. parahaemolyticus* АТСС 17802 при культивировании на питательном агаре pH 7,7 ± 0,1 с 3 % натрия хлорида должен формировать колонии правильной круглой формы с ровными краями, полупрозрачные, с блестящей поверхностью, диаметром не менее 1,0 мм. При окраске по Граму в мазках выявляются прямые или слегка изогнутые грамотрицательные палочки. Штамм должен обладать ок-

сидазной активностью, ферментировать с образованием кислоты без газа маннозу и не расщеплять сахарозу, ферментировать глюкозу, декарбоксилировать лизин и орнитин и не ферментировать аргинин.

Тест-штаммы *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 должны соответствовать требованиям, изложеным в п. 6.1.3.

6.2.4. Подготовка тест-штаммов

Тест-штаммы холерных вибрионов, хранящихся в лиофилизированном виде или на полужидком агаре Хоттингера, высевают в пробирки с 5 мл 1 %-й пептонной воды или 5 мл бульона Мартена pH 7,7 ± 0,1 и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 3—5 ч, после чего высевают бактериологической петлей № 2 на чашку с питательной средой для выделения и культивирования холерного вибриона, с агаром Мартена или Хоттингера pH 7,7 ± 0,1 (I-й пассаж). Через 18—20 ч культивирования с поверхности агара отбирают типичные по морфологии колонии холерного вибриона и пересевают их на агаровые пластинки вышеуказанных питательных сред, инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 3—5 ч, после чего используют для контроля (II-й пассаж).

Подготовка тест-штаммов *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 осуществляется согласно п. 6.1.4.

6.2.5. Контроль плотных питательных сред (показатели чувствительности, скорости роста и стабильности основных биологических свойств тест-штаммов)

Для контроля питательных сред используют 3—5-часовую культуру тест-штаммов, выращенную на агаровых пластинках, разлитых за 30—40 мин до посева. Готовят взвесь вибрионов в стерильном 0,9 %-м растворе натрия хлорида pH 7,2 ± 0,1, соответствующую 10 единицам по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича ОСО 42-28-85П, эквивалентную $2,2 \times 10^9$ м.к./мл. Приготовленные взвеси в объеме 1,0 мл стерильными пипетками переносят в пробирку, содержащую 1,2 мл стерильного 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Затем осуществляют десятикратные последовательные разведения, перенося 0,5 мл взвеси каждого тест-штамма в пробирки, содержащие 4,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида до разведения 10^{-7}, тщательно перемешивая и меняя пипетку после каждого разведения.

Тест-штаммы из разведений 10^{-6} и 10^{-7} высевают в объеме 0,1 мл на 3 свежеприготовленные и тщательно просушенные агаровые пластинки в чашки Петри с проверяемой и контрольной средами. В качестве контрольной среды используют заранее отконтролированный и соответствующий требованиям настоящего документа агар pH 7,7 ± 0,1. Посевной материал равномерно распределяют покачиванием чашки. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 12 ч.

Плотные питательные среды считают пригодными, если на них вырастают типичные по морфологии колонии, соответствующие требованиям п. 6.2.3 для каждого тест-штамма, диаметром не менее 1,0 мм, в количестве 30 % от расчетной посевной дозы 100 м.к., при наличии единичных колоний на 3 чашках Петри с посевной дозой 10 м.к. На контрольном агаре при посеве 100 м.к. каждого тест-штамма должно вырастать не менее 30 колоний, при посеве 10 м.к. – единичные колонии на всех чашках. Расчет ведется по среднему числу колоний на всех чашках.

При определении стабильности основных свойств тест-штаммов должно выявляться не более двух атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим и фаголизабельным свойствам колоний на каждой чашке при посевной дозе 100 м.к.

6.2.6. Контроль жидких накопительных питательных сред (показатели чувствительности, скорости роста и стабильности основных биологических свойств тест-штаммов)

Подлежащий проверке основной раствор пептона разводят в 10 раз дистиллированной водой до 1 %-й концентрации в пересчете на пептон, разливают по 100 мл во флаконы, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при 121 °С в течение 30 мин. Контролируемая 1 %-я пептонная вода разливается и стерилизуется аналогично, но без предварительного разведения. В качестве контрольной среды используют заранее отконтролированную и соответствующую требованиям настоящего документа 1 %-ю пептонную воду.

Приготовление взвесей тест-штаммов холерного вибриона, прошедших предварительную подготовку согласно п. 6.2.4. Контроль жидких накопительных питательных сред осуществляют по методу, изложенному в п. 6.2.5.

Взвеси каждого тест-штамма *V. cholerae* из разведений 10^{-6} (100 м.к.) и 10^{-7} (10 м.к.) по 0,1 мл высевают в три флакона со 100 мл контролируемой жидкой накопительной среды и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 6 ч. Параллельно осуществляют контроль посевной дозы, высевая вышеуказанные разведения взвесей тест-штаммов на 3 чашки (для каждого разведения) со щелочным агаром pH 7,7 ± 0,1 заранее отконтролированным и соответствующим требованиям п. 6.2.5 настоящего документа.

Через 6 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С из каждого засеянного флакона бактериологической петлей № 5 производят высев культуры с поверхности среды на 3 чашки Петри с заранее отконтролированным щелочным агаром pH 7,7 ± 0,1. Посевы на агаровых пластинках инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 12—18 ч.

Жидкие накопительные питательные среды считают пригодными, если число колоний, выросших при высеве культур из разведения 10^{-6} после 6 ч инкубации в контролируемой жидкой среде на агаровые пластинки, не менее 10, из разведения 10^{-7} – не менее 1. Расчет ведется по среднему числу колоний на трёх чашках с одной посевной дозой.

Стабильность основных свойств холерных вибрионов определяют по отношению числа атипичных по морфологии, биохимическим и фаголизабельным свойствам колоний тест-штаммов к общему числу колоний, выросших на чашках. На каждой чашке со щелочным агаром должно вырастать не более одной атипичной по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным свойствам колонии при высеве культур из разведения 10^{-6}.

6.2.7. Определение показателя эффективности

Определение показателя эффективности осуществляют по методике, изложенной в п.6.1.6. Контроль проводят с использованием тест-штаммов *V. cholerae* O1 P-1(145) классического биовара, *V. cholerae* O1 M-878 биовара эльтор и *Vibrio cholerae* не O1 P-9741. В учреждениях, где нет разрешения на работу с возбудителями II группы патогенности, этот показатель определяют только со штаммом *Vibrio cholerae* не O1 P-9741. Подготовку тест-штаммов проводят согласно п. 6.2.4.

6.2.8. Контроль ингибирующих свойств питательных сред

Контроль питательных сред проводят по следующим показателям: чувствительности к тест-штаммам холерных вибрионов; ингибиции тест-штаммов холерных вибрионов и микробов-ассоциантов – *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222.

Чувствительность плотных элективных сред проверяют и оценивают по методике, указанной в п. 6.2.5. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18 ч.

Определение показателя ингибиции и дифференцирующих свойств элективных питательных сред для выявления холерного вибриона. Питательная среда при посеве в объеме 0,1 мл смеси, содержащей *V. cholerae* не О1 Р-9741 – 1×10^3 м.к./мл; *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 – 1×10^7 м.к./мл, через 18—19 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С должна обеспечивать рост *V. cholerae* не О1 Р-9741 и полностью подавлять рост *E. coli* 18. Допускается рост изолированных колоний *P. vulgaris* НХ 19 № 222. Должна наблюдаться четкая дифференциация представителей рода *Vibrio* от *P. vulgaris* по морфологии и окраске колоний (круглые, блестящие, выпуклые, с ровными краями, желтого цвета – у вибрионов, беловато-матового цвета – у протея).

6.2.9. Проверка качества солевых консервантов

При проверке качества солевых консервантов определяют выживаемость в них тест-штамма *V. cholerae* не О1 Р-9741. Для этого в 3 пробирки с 5 мл консерванта вносят по 0,1 мл взвеси, содержащей 100 м.к. культуры. Одновременно для контроля количества жизнеспособных клеток в посевном материале проводят посев культуры этой дозы на ранее отконтролированный щелочной агар. Пробирки со взвесей культуры в консерванте оставляют при комнатной температуре на 3 сут., после чего содержимое каждой пробирки полностью переносят в отдельный флакон со 100 мл 1 %-й пептонной воды pH 8,2—8,4 с высокой чувствительностью к росту холерного вибриона и инкубируют в течение 6 ч при температуре (37 ± 1) °С. Затем из каждого флакона производят высев петлей № 5 на агаровую пластинку высококачественной среды. Консервант считают годным при наличии роста холерного вибриона.

6.2.10. Проверка качества теллурита калия (ТК)

Порядок приготовления и хранения 1 %-й пептонной воды с теллуритом калия.

Приготовление рабочих растворов. Теллурит калия выпускается промышленностью в виде сухого порошка или 2 %-го раствора. Каждая серия препарата, используемого для приготовления питательных сред при диагностике холеры, должна быть проверена на ингибирующие свойства в отношении холерного вибриона и кишечной палочки. В работе используют 0,025 % (1 : 4 000) раствор теллурита калия. Для его приготовления к 5 мл 2 %-го раствора добавляют 395 мл стерильной дистиллированной воды. Из сухого препарата рабочий раствор готовят разведением 50,0 мг теллурита калия в 200 мл стерильной дистиллированной воды.

Хранение теллурита калия и его рабочих растворов. Сухой порошок хранят в темном месте при комнатной температуре. Срок годности не ограничен.

Концентрированный или 2 %-й раствор теллурита калия хранят в темном месте в герметично закрытой посуде. Срок годности не более 4 лет.

Рабочий раствор теллурита калия хранят в холодильнике и используют в течение 7 дней после приготовления.

Почернение или помутнение растворов свидетельствует об их непригодности.

Приготовление пептонной воды с теллуритом калия. К 1 %-й пептонной воде теллурит калия добавляют перед ее использованием в рабочей концентрации, оттитрованной для каждой серии препарата. Пептонная вода должна иметь щелочную реакцию среды (pH 8,0).

Расчет количества рабочего раствора теллурита калия (1 : 4 000) для получения необходимой концентрации препарата

Концентрация препарата	Количество рабочего раствора ТК, добавляемого к пептонной воде в объеме (мл)						
	1 000	500	100	50	20	10	5
1 : 50 000	80,0	40,0	8,0	4,0	1,60	0,80	0,40
1 : 100 000	40,0	20,0	4,0	2,0	0,80	0,40	0,20
1 : 200 000	20,0	10,0	2,0	1,0	0,40	0,20	0,10
1 : 300 000	12,0	6,0	1,2	0,6	0,24	0,12	0,06

Хранение пептонной воды с теллуритом калия. Срок хранения пептонной воды с теллуритом калия не более 24—48 ч при температуре 4—20 °С в защищенном от света месте.

Проверка качества теллурита калия. Для выбора дозы рабочего раствора теллурита калия испытывают следующие конечные концентрации препарата в пептонной воде: 1 : 50 000, 1 : 100 000, 1 : 200 000, 1 : 300 000. С этой целью готовят 2 ряда пробирок со стерильной, ранее проверенной 1 %-й пептонной водой. В первом ряду определяют ингибирующие свойства теллурита калия по отношению к чистой культуре холерного вибриона, во втором – к смеси этой культуры с культурой кишечной палочки. В качестве тест-штаммов используют *V. cholerae* Р-1(145) классического биовара и *E. coli* 18.

В 1—2 пробирки каждого ряда наливают по 4,6 мл пептонной воды (п. в.)

3—4 « 4,8 мл п. в.

5—6 « 4,9 мл п. в.

7—10 « 5,0 мл п. в.

Затем добавляют 0,025 %-й рабочий раствор теллурита калия.

В 1—2 пробирки каждого ряда по 0,4 мл (1 : 50 000)

3—4 « 0,2 мл (1 : 100 000)

5—6 « 0,1 мл (1 : 200 000)

7—8 « 0,05 мл (1 : 300 000)

В 9—10 пробирки теллурит калия не вносится, они являются контролем чувствительности среды без ингибитора к росту культур тест-штаммов. Цифры в скобках обозначают конечные концентрации теллурита калия в среде.

Для определения показателя ингибирующих свойств теллурита калия используют взвесь тест-штамма *V. cholerae* Р-1 (145) классического биовара концентрацией 1×10^3 м.к./мл, взвесь тест-штамма *E. coli* 18 концентрацией 1×10^7 м.к./мл и смесь этих взвесей, взятых в равных объемах.

В первый ряд пробирок с пептонной водой вносят по 0,1 мл взвеси тест-штамма холерного вибриона концентрацией 1×10^3 м.к./мл. Одновременно по 0,1 мл взвеси холерных вибрионов высевают на 3 чашки с проверенным щелочным агаром (контроль посевной дозы).

Во второй ряд добавляют по 0,2 мл смеси суспензий холерного вибриона и кишечной палочки.

Через 6 ч и 18—24 ч инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С из всех пробирок делают высев петлей № 5 на чашки с щелочным агаром pH 7,8 ± 0,1. Учет результатов проводят через 18—24 ч.

Рабочим разведением теллурита калия считают разведение, при котором в смеси холерного вибриона с кишечной палочкой резко тормозится рост последней и не угнетается рост холерного вибриона.

Посев чистой культуры холерного вибриона из этого разведения не должен заметно отличаться от контроля.

На щелочном агаре из 1×10^2 м.к. (контроль посевной дозы холерных вибрионов) должно вырастать от 30 до 80 колоний *V. cholerae*.

6.2.11. Критерии пригодности диагностических сред

Плотные питательные среды считают пригодными, если они обеспечивают рост 10 м.к. тест-штаммов *V. cholerae* на всех засеянных агаровых пластинках через 12 ч инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С.

6.3. Контроль качества питательных сред для выделения и культивирования возбудителя туляремии

6.3.1. Тест-штаммы

Для бактериологического контроля питательных сред, предназначенных для диагностики туляремии, используют тест-штаммы *Francisella tularensis holarctica* 15 НИИЭГ, 503/840, *F. tularensis neoarctica B 399 A-cole* и *F. tularensis mediaasiatica* 120. Тест-штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ получают из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, 503/840, В 399 А-cole и 120 – в НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи или Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

В качестве тест-штаммов при определении ингибиторов посторонней микрофлоры используют *P. vulgaris* НХ 19 № 222, *E. coli* 18 и *B. cereus* 8.

6.3.2. Порядок хранения тест-штаммов

Тест-штаммы туляремийного микроба хранят в лиофилизированном состоянии при температуре 2—8 °С до сохранения свойств согласно п. 6.3.3. Рабочие субкультуры хранят на среде Мак-Коя или на питательной среде для выделения и культивирования туляремийного микроба (FT-агар) при температуре 4—6 °С. Пересевы культур проводят не менее 1 раза в 3 мес., но не более четырех раз. По истечении этого срока для работы вскрывают новую ампулу с культурой.

Порядок хранения тест-штаммов *P. vulgaris* НХ 19 № 222, *E. coli* 18 и *B. cereus* 8 изложен в п. 6.1.2.

6.3.3. Требования к тест-штаммам

Тест-штаммы туляремийного микроба должны обладать типичными культуральными, морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами.

Стабильность свойств штаммов проверяют не реже одного раза в год и каждый раз при вскрытии новой ампулы. Культуральные свойства возбудителя туляремии изучают при посеве культуры в дозе 5×10^3—1×10^4 м. к. на желточную среду Мак-Коя и питательную среду FT-агар pH 7,2 ± 0,1 (или на цистеиновом агаре с 5 % кроличьей крови). Для туляремийного микроба характерными являются способность давать нежный росинчатый рост на желточной среде. На питательном FT-агаре или на цистеиновом агаре с 5 % крови *F. tularensis* вырастают в виде SR-колоний

молочно-белого цвета (должно быть не менее 90 %) и R колоний серого цвета (не более 10 %) диаметром не менее 1 мм. Тест-штаммы *F. tularensis* на среде Даунса ферментируют до кислоты глюкозу, маннозу и сахарозу, образуют сероводород. *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 503/840 (биовар 1) на этой среде не ферментируют глицерин, *F. tularensis* В 399 *A-cole* и 120 ферментируют глицерин.

В мазках, окрашенных по Граму, туляремийный микроб имеет вид мелких грамотрицательных кокков или коккобактерий. Агглютинабельность культур определяют в развернутой реакции агглютинации с сывороткой диагностической туляремийной. Тест-культуры в SR-форме должны давать положительную реакцию с сывороткой в разведении не ниже ½ ее титра; колонии в R-форме дают замедленную мелкохлопчатую агглютинацию в более низком титре.

Тест-штаммы *E. coli* 18, *P. vulgaris* НХ 19 № 222 и *B. cereus* 8 должны соответствовать требованиям, изложенным в п. 6.1.3.

6.3.4. Подготовка культуры

Тест-штаммы. *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранящиеся в лиофилизированном состоянии, перед проведением контроля питательных сред пересевают на желточную среду Мак-Коя или питательную среду FT-агар и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 48 ч. Затем культуры пересевают повторно на среду Мак-Коя или FT-агар (II пассаж) и после двухсуточной инкубации используют для работы. Культуры, хранившиеся на желточной среде, используют для работы после однократного пересева.

Подготовка культур тест-штаммов *E. coli* 18, *P. vulgaris* 19 и *B. cereus* 8 осуществляется согласно п. 6.1.4.

6.3.5. Контроль плотных питательных сред (показатели чувствительности, прорастания и скорости роста)

Для проверки качества питательных сред используют 48-часовые культуры каждого тест-штамма туляремийного микроба, выращенные при температуре (37 ± 1) °С. Готовят взвеси микроорганизмов в 0,9 %-м растворе натрия хлорида, доводят концентрацию микробной взвеси до 10 единиц по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича ОСО 42-28-85П, эквивалентные 5×10^9 м.к./мл, и разводят в 5 раз (к 1 мл взвеси добавляют 4,0 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида). Полученное разведение культуры эквивалентно 1×10^9 м.к./мл. Из исходных стандартных взвесей делают десятикратные разведения путем последовательного переноса 0,5 мл культуры в 4,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, тщательно перемешивая и меняя стерильную пипетку после каждого разведения. Для контроля качества сред применяют разведения 10^{-6} (1×10^3 м.к./мл) и 10^{-7} (1×10^2 м.к./мл).

Контроль плотных питательных сред. По 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-6} и 10^{-7} (соответственно по 100 и по 10 м.к. на чашку) каждого из четырех штаммов наносят на 3 чашки Петри с испытуемой средой. Взвесь распределяют покачиванием по поверхности среды. Контролем должен служить заранее проверенный агар высокого качества.

Учет результатов контроля. Учет результатов контроля производят через 5—7 сут. инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С. Питательные среды для выделения и культивирования туляремийного микроба должны обеспечить рост на всех агаровых пластинках при высеве 10 м.к. Показатель прорастания при высеве из 1×10^2 м.к. должен быть не менее 40 % от числа засеянных клеток через 72 ч инкубации при (37 ± 1) °С.

6.3.6. Определение стабильности биологических свойств туляремийного микроба при выращивании на питательных средах

Оценку морфологии проводят на чашках, где выросло не менее 40 % от числа засеянных клеток. Типичными считают беловато-серые блестящие колонии не менее 1,0—1,5 мм в диаметре (диаметр колоний в популяции не должен отличаться более, чем в два раза). В мазках – грамотрицательные коккобактерии. Появление на среде более 10 % колоний серого цвета по сравнению с исходными данными свидетельствует о непригодности среды – способности усиливать процессы диссоциации туляремийного микроба.

Тест-культуры должны агглютинироваться сывороткой диагностической туляремийной в разведении не ниже S ее титра. Агглютинабельность тест-штаммов, выращенных на плотных питательных средах, проверяют в случае несоответствия их по морфологии, а также если на предприятии изменена технология приготовления среды или при использовании новой серии гидролизата.

6.3.7. Определение показателя эффективности

Определение показателя эффективности осуществляют по методике, изложенной в п. 6.1.6. Контроль проводят с использованием тест-штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 503/840, *F. tularensis B 399 A-cole* и *F. tularensis* 120. Подготовку тест-штаммов проводят согласно п. 6.3.4.

6.3.8. Контроль ингибирующих свойств питательных сред

При выделении возбудителя туляремии из различных объектов исследования применяют элективные питательные среды для выделения возбудителя туляремии, в состав которых входят ингибиторы сопутствующей микрофлоры.

На 3 чашки Петри с контрольной питательной средой и испытуемой элективной средой наносят по 0,1 мл смеси тест-штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ из разведения 10^{-5} (1×10^4 м.к./мл), *P. vulgaris* НХ 19 № 222 из 10^{-4} (1×10^5 м.к./мл), *B. cereus* 8 из 10^{-3} (1×10^6 м.к./мл) и *E. coli* 18 из 10^{-2} (1×10^7 м.к./мл) и 0,9 %-й раствор натрия хлорида в соотношении 0,5 : 0,5 : 0,5 : 0,5 : 3,0.

6.3.9. Критерии пригодности питательной среды

Плотные питательные среды считаются пригодными, если они на 3—7-е сутки обеспечивают рост типичных по морфологии колоний тест-штаммов туляремийного микроба на всех агаровых пластинках при посеве 10 м.к., не усиливают диссоциацию микроорганизмов. Элективные питательные среды должны ингибировать рост микробов-ассоциантов. На питательной среде должно вырастать не более 10 колоний тест-штаммов *E. coli* 18, *B. cereus* 8 и допускается рост только изолированных колоний *P. vulgaris* НХ 19 № 222 без тенденции к роению.

6.4. Контроль питательных сред по биологическим показателям для выделения и культивирования возбудителя бруцеллеза

6.4.1. Тест-штаммы

Для бактериологического контроля питательных сред, предназначенных для диагностики бруцеллеза, используют тест-штаммы *Brucella abortus* 19 ВА, *Brucella melitensis* 16 М и *Brucella suis* 1330. Тест-штаммы *B. abortus* 19 ВА получают в лиофилизированном

состоянии из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, *B. melitensis* 16 М и *B. suis* 1330 – из НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи или Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

6.4.2. Порядок хранения тест-штаммов

Тест-штаммы *Brucella* хранят в лиофилизированном состоянии при температуре (5 ± 1) °С до сохранения свойств согласно п. 6.4.3. Рабочую субкультуру бруцелл хранят в пробирке на скошенном агаре Альбими* или эритрит-агаре при температуре (5 ± 1) °С. Пересевы культур проводят не менее 1 раза в 3 мес., но не более четырех раз. По истечении этого срока для работы вскрывают новую ампулу с культурой.

6.4.3. Требования к тест-штаммам

Тест-штаммы должны обладать типичными для S-формы бруцелл культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами. В мазках – грамотрицательные палочки или коккобациллы. На агаре тест-штаммы бруцелл образуют выпуклые, гладкие, бесцветные, мутноватые, круглые колонии диаметром 1,0—1,5 мм; в бульоне – рост гомогенный без просветления. Тест-штаммы не должны обнаруживать признаков диссоциации в пробе с трипафлавином, реакции термопреципитации и при окраске колоний кристаллическим фиолетовым по методу White-Wilson; должны агглютинироваться сывороткой диагностической бруцеллезной до ее титра с образованием крупнохлопчатого агглютината. Биохимические свойства: тест-штаммы бруцелл должны ферментировать глюкозу; *B. abortus* 19 ВА и *B. suis* 1330 должны разлагать арабинозу, галактозу, рибозу; *B. melitensis* 16 М не должен ферментировать указанные углеводы; *B. melitensis* 16 М должен расти на питательных средах с анилиновыми красками фуксин и тионин; *B. abortus* 19 ВА – только на среде с фуксином, а *B. suis* – на среде с тионином.

Для проверки агглютинабельности культуры в растворе трипафлавина на предметное стекло наносят каплю трипафлавина 1 : 500, приготовленного в 0,9 %-м растворе натрия хлорида, в котором эмульгируется капля испытуемой культуры. У диссоциированных культур быстро (1—2 мин) наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев. Взвесь из S-форм культур остается гомогенной.

При постановке реакции термоагглютинации 2—3 мл взвеси двухсуточной культуры бруцелл концентрацией 1×10^9 м.к./мл в 0,9 %-м растворе натрия хлорида подогревают в пробирке на водяной бане при 90 °С в течение 30 мин. Результаты учитывают через 30, 60 мин и окончательно – через 24 ч пребывания при температуре (22 ± 2) °С. При наличии диссоциации наблюдается ясно выраженная агглютинация бруцелл, тогда как суспензия клеток недиссоциирующих штаммов в S-форме остается гомогенной.

6.4.4. Подготовка культуры

Лиофилизированную культуру тест-штаммов пересевают в 2 пробирки с бульоном Альбими** и чашку Петри с печеночным агаром, агаром Альбими или на эрит-

---

* Агар Альбими: к 1 л дистиллированной воды добавляют 20 г сухого пептона, 20 мл дрожжевой воды, 5 г натрия хлорида. Все перемешивают и растворяют при нагревании до полного растворения. Устанавливают pH 7,2—7,4, для подщелачивания используют 20 %-й NaOH, для подкисления – HCl в разведении 1 : 1. Затем добавляют 20 г корсаковского пластинчатого агара, предварительно промытого и отжатого, нагревают до расплавления агара. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, добавляют 1 г глюкозы, 0,1 г метабисульфита натрия и 13,25 мл глицерина на 1 л среды. Устанавливают, как описано выше, pH 7,2—7,3. Разливают в стерильные флаконы и стерилизуют при 110 °С 20 мин.

** Бульон Альбими: готовят так же, как агар Альбими (см. выше), только без добавления корсаковского агара.

рит-агар. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч. Выросшую культуру каждого тест-штамма проверяют на чистоту роста, отсутствие диссоциации, затем пересевают в пробирку со скошенным агаром Альбими, печеночным или эритрит-агаром. После инкубациии посевов *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16 М и *B. suis* 1330 при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч культуры используют для контроля питательных сред. Пересевы культур со среды хранения проводят через каждые 3 мес., но не более четырех раз.

6.4.5. Контроль плотных и жидких питательных сред (показатели чувствительности, прорастания и скорости роста)

Двухсуточную культуру тест-штаммов бруцелл смывают с поверхности скошенного агара 0,9 %-м раствором натрия хлорида, доводят концентрацию микробной взвеси до 10 единиц по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П ГИСК им. Л. А. Тарасевича, эквивалентную $1,7 \times 10^9$ бруцелл в 1 мл. Полученную микробную взвесь культуры разводят сначала до концентрации 1×10^9 м.к./мл и затем десятикратными разведениями – до 1×10^7 м.к./мл. В процессе разведения перенос взвеси в следующую пробирку производят стерильной пипеткой объемом 1 мл, меняя пипетку для каждого разведения.

Контроль плотных сред. По 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16М и *B. suis* 1330 из разведений 10^{-6} (100 м.к.) и 10^{-7} (10 м.к.) высевают на 3 чашки Петри с испытуемой средой и равномерно распределяют покачиванием по всей поверхности. Контролем служит заранее проверенный агар высокого качества.

Учет результатов. Через (72 ± 2) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С должен наблюдаться рост бруцелл трех тест-штаммов на всех агаровых пластинках при высеве на них 10 м.к. и не менее 60 % из числа засеянных 100 м.к.

Контроль жидких сред. По 1,0 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-7} вносят в 3 пробирки с 9 мл жидкой питательной среды, перемешивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 22—26 ч. Одновременно по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-7} высевают на 3 чашки Петри с эритрит-агаром и равномерно распределяют покачиванием по всей поверхности среды.

Через 22—26 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С по 0,1 мл микробной взвеси из каждой пробирки высевают на 3 чашки Петри с эритрит-агаром.

Засеянные чашки с эритрит-агаром без подращивания и с подращиванием инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 70—74 ч.

Учет результатов. Показатель эффективности среды определяют отношением среднего числа колоний, выросших на чашках с эритрит-агаром после обогащения в эритрит-бульоне, к среднему числу колоний, выросших на эритрит-агаре до обогащения; он должен быть не менее 3.

6.4.6. Определение стабильности биологических свойств культур при выращивании их на испытуемых средах

Стабильность основных свойств бруцелл определяют отношением числа атипичных по свойствам колоний тест-штаммов, изложенным в п. 6.4.3, к общему числу колоний на чашках с испытуемыми средами. Питательная среда не должна изменять свойства тест-штаммов.

6.4.7. Определение показателя эффективности плотных питательных сред

Определение показателя эффективности осуществляют по методике, изложенной в п. 6.1.6. Контроль проводят с использованием тест-штаммов *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* 16 М и *B. suis* 1330. Подготовку тест-штаммов проводят согласно п. 6.4.4.

6.5. Контроль питательных сред для выделения и культивирования сибиреязвенного микроба

6.5.1. Тест-штаммы

Для контроля питательных сред, предназначенных для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба используют штаммы *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 228/8. В качестве тест-штаммов при определении ингибиторов посторонней микрофлоры используют штаммы *P. vulgaris* НХ 19 № 222 и *E. coli* 18. Для определения дифференцирующих свойств питательных сред используют тест-штамм *B. cereus* 8. Тест-штаммы получают из ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

6.5.2. Порядок хранения тест-штаммов

Тест-штаммы *B. anthracis* и *B. cereus* хранят в лиофилизированном состоянии при температуре (5 ± 1) °С до сохранения свойств согласно п. 6.5.3 или на агаре Хоттингера pH 7,1 ± 0,1. Пересевы культур со среды хранения проводят через каждые 3 мес., но не более четырех раз. Тест-штаммы *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 хранят согласно п. 6.1.2.

6.5.3. Требования к тест-штаммам

Тест-штаммы *B. anthracis* должны обладать типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами. По морфологии – это крупные толстые с закругленными концами грамположительные палочки, на агаре – крупные, диаметром 2—3 мм, шероховатые серовато-белые колонии с ворсистыми краями («львиная грива»); в бульоне – рост в виде ватных хлопьев, взвешенных комком, без помутнения. Тест-штаммы сибиреязвенного микроба должны ферментировать с образованием кислоты (без газа) глюкозу и мальтозу; не должны разлагать арабинозу, рамнозу, маннозу, лактозу, маннит; не должны обладать гемолитической, фосфатазной, лецитиназной активностями.

Тест-штамм *B. cereus* 8 должен обладать типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами. В бульоне Хоттингера pH 7,2 ± 0,1 через 24 ч роста при температуре (37 ± 1) °С – помутнение среды с трудноразбиваемым крошковатым осадком, прочной пленкой и пристеночным кольцом; на агаровых средах *B. cereus* растет в виде твердых, круглых, белых (иногда окрашенных в желтый цвет) колоний с извитыми нитями по краям. В мазках – грамположительные палочки. Тест-штамм должен расщеплять глюкозу, маннозу и сахарозу до кислоты и не расщеплять маннит, лактозу и арабинозу.

Тест-штаммы *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 должны соответствовать свойствам, изложенным в п. 6.1.3.

6.5.4. Подготовка культуры

В ампулы с лиофилизированными культурами *B. anthracis* и *B. cereus* вносят по 2 мл дистиллированной воды. По 0,2 мл из каждой ампулы высевают стерильной пипеткой объемом 1 мл во флаконы с 50 мл бульона Хоттингера pH 7,2 ± 0,1. Через (21 ± 3) ч инкубирования при температуре (35 ± 1) °С бульонные культуры *B. anthracis* и *B. cereus* по 5 мл высевают с помощью мерных пипеток в матрацы со скошенным агаром Хоттингера pH 7,2 ± 0,1. Посевы для получения споровой культуры инкубируют при темпера-

туре (35 ± 1) °С от 5 до 7 сут. Процесс спорообразования контролируют микроскопией мазков. При наличии в мазках (95 ± 5) % спор, культуры с матрацев смывают 10 мл дистиллированной воды. Полученные суспензии отбирают в стерильные пробирки и выдерживают при температуре (5 ± 1) °С от 2 до 3 сут. для лизиса оставшихся вегетативных клеток и оседания спор. После этого пипеткой удаляют надосадочную жидкость, а споры суспендируют в 10 мл 30 % стерильного раствора глицерина в дистиллированной воде. Полученную взвесь спор разливают по 2 мл в ампулы вместимостью 6 мл, запаивают, хранят при температуре (5 ± 1) °С и используют для контроля питательных сред в течение 3-х лет. Для контроля питательной среды глицериновую культуру из ампулы разводят дистиллированной водой до концентрации 10 единиц по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П, эквивалентной 1×10^8 спор/мл. Из этой взвеси готовят десятикратные разведения (4,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида и 0,5 мл споровой культуры) до разведения 10^{-6}(1×10^2 м.к./мл).

В ампулы с лиофилизированными культурами *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 вносят по 1 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида и по 0,2 мл из каждой ампулы вносят стерильной пипеткой в пробирки с бульоном Хоттингера pH 7,2 ± 0,1. Через (21 ± 3) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С бактериологической петлей делают пересевы из бульона на скошенный агар Хоттингера, посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (21 ± 3) ч.

6.5.5. Определение чувствительности плотных и жидких питательных сред и скорости роста на них возбудителя сибирской язвы

Взвесь спор тест-штаммов *B. anthracis* в количестве 0,1 мл из разведения 10^{-6} (1×10^2 спор/мл) наносят на 3 чашки Петри с контрольной и испытуемой средами, взвесь распределяют по поверхности сред покачиванием. Контролем служит заранее отконтролированная питательная среда. Учет результатов проводят визуально через (21 ± 3) ч инкубации при температуре (35 ± 1) °С. На всех засеянных чашках должен наблюдаться рост тест-штаммов *B. anthracis* в виде шероховатых колоний диаметром не менее 2,0 мм, края колоний с волокнистыми отростками, напоминающими локоны волос (R-форма).

Культуру тест-штамма сибиреязвенного микроба в количестве 0,1 мл из разведения 10^{-6}(1×10^2 спор/мл) вносят в 3 пробирки с 10 мл жидкой питательной среды. Контролем должен служить заранее отконтролированный бульон. Учет результатов проводят визуально через (21 ± 3) ч инкубации при температуре (35 ± 1) °С. Во всех засеянных пробирках с жидкой питательной средой должен наблюдаться рост тест-штаммов в виде комка ваты на дне и прозрачной надосадочной жидкости.

6.5.6. Определение стабильности биологических свойств тест-штаммов сибиреязвенного микроба при выращивании их на испытуемых питательных средах

Стабильность основных свойств сибиреязвенного микроба определяют по отношению числа атипичных по морфологии колоний тест-штаммов к общему числу колоний на чашках с испытуемыми средами. Количество атипичных (RS, S и SM) колоний не должно превышать 10 %.

6.5.7. Определение показателя эффективности

Определение показателя эффективности осуществляют по методике, изложенной в п. 6.1.6. Контроль проводят с использованием тест-штаммов *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 228/8. Подготовку тест-штаммов проводят согласно п. 6.5.4.

6.5.8. Определение дифференцирующих свойств питательных сред

Для определения дифференцирующих свойств питательной среды используют микробные взвеси *B. anthracis* СТИ и *B. cereus* 8, приготовленные в соотношении 1 : 1 из разведения 10^{-5} (1×10^3 спор/ мл). По 0,1 мл смеси засевают на три чашки Петри с испытуемой и контрольной средами, содержащими 0,01 % фенолфталеинфосфата натрия. Через (21 ± 3) ч инкубации при температуре (35 ± 1) °С для дифференциации *B. anthracis* СТИ и *B. cereus* 8 на внутреннюю поверхность крышки чашки Петри помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную 5—10 каплями 23 %-го водного раствора аммиака. Выдерживают 3—5 мин и визуально проводят учет результатов. Колонии *B. anthracis* СТИ не должны изменять своего цвета, колонии *B. cereus* 8 должны окрашиваться в розовый или красный цвет.

6.5.9. Контроль ингибирующих свойств питательных сред

При выделении возбудителя сибирской язвы из биологического материала и объектов внешней среды, для подавления сопутствующей микрофлоры применяют питательные среды, содержащие ингибиторы роста.

Для определения показателя ингибиции на три чашки Петри с контрольной и испытуемой средами наносят по 0,1 мл смеси тест-штаммов, содержащей *B. anthracis* СТИ-1 из разведения 10^{-4} (1×10^5 спор/мл), *E. coli* 18 из 10^{-3} (1×10^6 м.к./мл), *P. vulgaris* НХ 19 № 222 из 10^{-3} (1×10^6 м.к./мл) и 0,9 %-го раствора натрия хлорида в соотношении 0,5 : 0,5 : 0,5 : 3,5. Смесь распределяют по поверхности среды. Через (21 ± 3) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С проводят учет результатов. На питательной среде должен отсутствовать рост микробов-ассоциантов *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222.

6.5.10. Критерии пригодности диагностических сред

Плотные питательные среды считаются пригодными, если они обеспечивают рост 50 % тест-штаммов сибиреязвенного микроба при посевной дозе 100 спор и хотя бы по одной колонии на каждой чашке при посеве 10 спор *B. anthracis* СТИ-1 и 228/8.

Жидкие среды считают пригодными, если наблюдается рост сибиреязвенного микроба во всех пробирках при посеве 100 спор на 10 мл среды. По скорости роста среда считается пригодной, если через (21 ± 3) ч в бульоне отмечается интенсивный рост культуры, соответствующий п. 6.5.3.

6.6. Контроль питательных сред для выделения и культивирования возбудителя легионеллеза по биологическим показателям

6.6.1. Тест-штаммы

Для бактериологического контроля питательных сред, предназначенных для диагностики легионеллеза, используют тест-штаммы *Legionella pneumophila Philadelphia* 1 АТСС 33152 и *Legionella pneumophila Bloomington-2* АТСС 33155. Указанные тест-штаммы получают из ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

В качестве тест-штаммов при определении пригодности ингибиторов посторонней микрофлоры используют штаммы *P. vulgaris* НХ 19 № 222, *E. coli* 18, *B. cereus* 8 и *Candida albicans*, которые получают из ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

6.6.2. Порядок хранения культур

Тест-штаммы *L. pneumophila Philadelphia* и *L. pneumophila Bloomington* хранят в лиофилизированном состоянии при температуре 2—8 °С до сохранения свойств согласно п. 6.6.3 или на жидкой среде хранения (1 г серно-кислотного гидролизата рыбной муки марки ФК (ГРМ ФК), 5 мл глицерина по ГОСТ 6259—75 и 95 мл дистиллированной воды) в пробирках при температуре 2—8 °С. Пересевы культур проводят не менее 1 раза в 3 мес., но не более четырех раз. По истечении этого срока для работы вскрывают новую ампулу с культурой.

Штаммы *P. vulgaris* НХ 19 № 222, *B. cereus* 8 и *E. coli* 18 хранят согласно п. 6.1.2; *C. albicans* – при температуре 2—8 °С до сохранения свойств.

6.6.3. Требования к тест-штаммам

Тест-штаммы *L. pneumophila Philadelphia-1 и L. pneumophila Bloomington* должны быть типичными по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим и иммунобиологическим свойствам. (В качестве тест-штаммов используют вирулентную культуру легионелл; LD_{50} для морских свинок при внутрибрюшинном заражении не более 1×10^6 м.к./мл.) По морфологии – это грамотрицательные палочки, на агаре – через 3—5 сут. инкубации при температуре (35 ± 0,5) °С образуются серые стекловидные колонии, флюоресцирующие при УФ-облучении (желтое свечение). Биохимические свойства: тест-штаммы легионелл утилизируют крахмал, образуют оксидазу, каталазу, разжижают желатину.

Тест-штаммы *E. coli* 18, *P. vulgaris* НХ 19 № 222 и *B. cereus* 8 должны соответствовать требованиям, изложенным в п. 6.1.3.

6.6.4. Подготовка культуры

В ампулы с лиофилизированной культурой тест-штаммов легионелл вносят 1 мл стерильного 0,01 М калий-фосфатного буфера, pH 7,1 ± 0,1 (0,9 г калия фосфорно-кислого однозамещенного, 2,2 г калия фосфорно-кислого двузамещенного 3-водного, 1 л дистиллированной воды), высевают по 0,1 мл на чашки Петри с питательной средой для культивирования и выявления возбудителя легионеллеза – буферным угольно-дрожжевым агаром с α-кетоглютаровой кислотой (среда BCYEα), элективной средой (СЭЛ) или легионелбакагаром и инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч, или культуры тест-штаммов со среды хранения пересевают на чашки Петри с этими средами и инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч. Выросшую культуру пересевают бактериологической петлей на питательные среды для легионелл и инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

Культуру тест-штамма бактериологической петлей переносят в пробирку со стерильным 0,01 М калий-фосфатным буфером (pH 7,1) и доводят концентрацию микробной взвеси до 10 единиц по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П, что соответствует 1×10^9 м.к./мл. Полученную взвесь десятикратными разведениями (0,5 мл взвеси культуры с 4,5 мл стерильного 0,01М калий фосфатного буфера) доводят до разведения 10^{-7} (около 1×10^2 м.к./мл). При каждом новом разведении содержимое пробирки тщательно перемешивают, меняя стерильную пипетку после каждого разведения.

6.6.5. Определение чувствительности плотных питательных сред и скорости роста на них легионеллезного микроба

Взвесь каждого тест-штамма легионелл засевают по 0,1 мл из разведения 10^{-7} (1×10^2 м.к./мл) на три чашки Петри с питательной средой, распределяя посевной материал по поверхности среды методом покачивания чашек. Учет результатов проводят визуально через 72—120 ч инкубации посевов при температуре (36 ± 1) °С. Должен наблюдаться рост на всех засеянных чашках в виде синевато-сероватых, плоско-выпуклых колоний диаметром не менее 1,0 мм.

6.6.6. Показатель эффективности питательных сред

Эффективность среды должна составлять не менее 3×10^9 м.к. в 1 мл среды. Готовят взвеси *L. pneumophila Philadelphia-1* и *L. pneumophila Bloomington-2* в 0,01 М калий-фосфатном буферном растворе, соответствующие 5×10^8 м.к./мл. По 0,1 мл этого разведения каждого штамма засевают в две пробирки с 5 мл скошенной испытуемой среды. Через (72 ± 2) ч инкубации при температуре (36 ± 1) °С культуры смывают с поверхности агара 2,5 мл 0,01 М калий-фосфатного буферного раствора.

6.6.7. Контроль ингибирующих свойств питательных сред

Питательная среда при посеве 0,1 мл смеси, содержащей в 1 мл 1×10^3 м.к. *L. pneumophila,* 1×10^6 м.к. *E. coli* 18 и по 1×10^3 м.к./мл *B. cereus* 8, *C. albicans*, *P. vulgaris* НХ 19 № 222, через (72 ± 2) ч инкубации при температуре (35 ± 0,5) °С должна обеспечивать рост *Legionella pneumophila.* Не должны вырастать *E. coli*, *C. albicans* и *B. cereus*, допускается рост изолированных колоний *P. vulgaris* без тенденции к роению.

Готовят взвеси тест-штаммов, соответствующие 10 единицам по ОСО 42-28-85П, последовательно десятикратно разводят 0,9 %-м раствором натрия хлорида до разведения 10^{-5} (1×10^4 м.к./мл) для *L. pneumophila; E. coli,* – до разведения 1×10^{-2} (1×10^7 м.к./мл); *C. albicans, P. vulgaris* и *B. cereus* до разведения 10^{-5} (1×10^4 м.к./мл). Затем в пробирку с 2,5 мл 0,07N калий-фосфатного буферного раствора вносят по 0,5 мл взвеси *L. pneumophila* и каждого из четырех микробов-ассоциантов. Смесь тщательно перемешивают и по 0,1 мл высевают на 3 чашки Петри с испытуемой средой. Смесь равномерно распределяют по поверхности питательной среды покачиванием чашки. Через (72 ± 2) ч инкубации при температуре (36 ± 1) °С учитывают результаты. На всех засеянных чашках должен наблюдаться рост легионелл в виде синевато-сероватых плоско-выпуклых колоний диаметром не менее 1 мм. Стереоскопически при косом освещении наблюдаются колонии легионелл зеленоватые или красновато-серые с волнисто-волокнистой структурой. Рост *P. vulgaris* в виде изолированных колоний беловато-матового цвета должен четко дифференцироваться от колоний легионелл.

gost.e-ecolog.ru