

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФБУН  
Государственный научный центр  
прикладной микробиологии и биотехнологии  
\_\_\_\_\_ И.А. Дятлов  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

**ИНСТРУКЦИЯ**  
**по применению изделия**  
**«ГЛЮКОЗО-ФОСФАТНЫЙ БУЛЬОН (СРЕДА КЛАРКА)»**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

«Глюкозо-фосфатный бульон (среда Кларка)», далее по тексту – среда Кларка, предназначена для родовой идентификация энтеробактерий при постановке тестов с метиловым красным и реакции на ацетилметилкарбинол (реакция Фогеса-Проскауэра) в исследуемых образцах, выделенных в ходе санитарно-бактериологического исследования<sup>1</sup>.

Не является медицинским изделием.

**2. ХАРАКТЕРИСТИКА**

Среда Кларка представляет собой мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-желтого цвета, который получают смешиванием сухих компонентов.

Питательная среда выпускается в полиэтиленовых банках по 100 и 250 г.

**2.1. Принцип действия**

Добавление индикатора метилового красного к культурам энтеробактерий приводит к появлению красного окрашивания ввиду сильного закисления среды в результате ферментации глюкозы (положительная реакция). Появление красного окрашивания в реакции Фогеса-Проскауэра при добавлении альфа-нафтола и гидроксида калия связано с образованием некоторыми культурами нейтрального продукта – ацетина (ацетилметилкарбинола) из глюкозы. Аце-

---

<sup>1</sup> Индикатор метиловый красный и реактивы для постановки реакции Фогеса-Проскауэра с питательной средой не поставляются.

тоин в щелочной среде на воздухе окисляется с образованием диацетила, который реагирует с креатином, что сопровождается появлением красного окрашивания (положительная реакция).

## 2.2. Состав

Состав питательной среды, г/л:

– Панкреатический гидролизат рыбной муки и/или	
– пептон мясной .....	5,0
– D-глюкоза .....	5,0
– Калий фосфорнокислый двузамещенный .....	5,0

pH среды, приготовленной по п.7.1 от 6,9 до 7,1

Величина pH, определенная по МУК 4.2.2316-08, является условной величиной, которая соответствует значению pH среды от 6,9 до 7,1 и может незначительно меняться после стерилизации. Пределы значения pH, указанные выше, учитывают отклонения pH после стерилизации среды.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность. Среда Кларка обеспечивает при посеве бактериологической петлей во всех засеянных пробирках рост тест-штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* "S-form", *Salmonella enteritidis* 11272, *Citrobacter freundii* 101/57, *Enterobacter aerogenes* 10 006, через 24 ч инкубации при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ , а также рост *Yersinia pseudotuberculosis III* и *Yersinia enterocolitica 287-II* при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  и  $(28\pm 2)^\circ\text{C}$  в виде диффузного помутнения.

Идентификацию культур проводят после постановки реакций с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра.

После внесения в пробирки метилового красного тест-штаммы *E. coli* ATCC 25922, *S. sonnei* "S-form", *S. enteritidis* 11272, *C. freundii* 101/57 окрашиваются в розовый цвет - положительная реакция, тест-штамм *E. aerogenes* 10 006 окрашивается в желтый цвет - отрицательная реакция.

После постановки реакции Фогеса-Проскауэра тест-штамм *E. aerogenes* 10 006, окрашивается в розовый цвет - положительная реакция, остальные культуры – в желтый (отрицательная реакция).

Тест-штаммы *Y. pseudotuberculosis III* и *Y. enterocolitica 287-II* после инкубации при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  окрашиваются в желтый цвет (отрицательная реакция).

После инкубации при температуре  $(28\pm 2)^{\circ}\text{C}$  *Y. pseudotuberculosis* III окрашивается в желтый цвет (отрицательная реакция), *Y. enterocolitica* 287- II окрашивается в розовый цвет - положительная реакция.

#### **4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

При анализе исследуемого материала – соблюдение СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

#### **5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

- Термостат обеспечивающий температуру  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$
- Весы лабораторные 2 класса точности
- Автоклав
- Пробирки стеклянные вместимостью – 10 мл
- Пипетки стеклянные позволяющие отбирать объемы жидкости 1 и 2 мл
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл
- Вода дистиллированная
- Колбы
- Воронки стеклянные

#### **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

6.1 Объекты исследований – микробные изоляты энтеробактерий, выделенные при проведении санитарно-бактериологических исследований.

6.2 Взятие, посев исследуемого материала проводят в соответствии, ГОСТ 30726-2001 Продукты пищевые «Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*», МУК 4.2.577-96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов», ГОСТ ISO 10273-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения условно-патогенной бактерии *Yersinia enterocolitica*», МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» и другими нормативными документами.

#### **7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

Исследование проводят в условиях санитарно-бактериологической лаборатории специалистами, изучившими настоящую Инструкцию.

### 7.1 Приготовление питательной среды.

15,0 г питательной среды размешивают в 1 л дистиллированной воды, 10 % раствором соляной кислоты устанавливают рН среды 6,9-7,1. Затем кипятят 2-3 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают по пробиркам по 5 мл и стерилизуют автоклавированием при температуре 112 °С в течение 15 мин. Готовая питательная среда прозрачная, светло-желтого цвета.

Готовую среду можно использовать в течение 7 сут. после её приготовления при условии хранения при температуре 2-8 °С.

7.2 Исследуемый материал, подготовленный согласно действующим документам по п. 6.2, бактериологической петлей вносят в каждую из двух пробирок, содержащих по 5,0 мл среды Кларка и инкубируют при соответствующих температурах ( $28\pm 1$ ) °С и ( $37\pm 1$ ) °С в течение 24 ч в зависимости от лабораторного испытания.

Для постановки реакции с метиловым красным из пробирки с выращенной культурой отбирают 2,5 мл жидкости и добавляют 8-10 капель индикатора метилрота, пробирку встряхивают, после чего учитывают реакцию. Изменение цвета зависит от величины рН. Розовое окрашивание (при рН ниже 5,0) означает положительную реакцию, желтое окрашивание (при рН выше 6,0) – отрицательную реакцию, светло-оранжевое окрашивание – сомнительную реакцию.

Состав индикатора метилрота:

Метиловый красный .....	0,01г
Спирт этиловый 96%	30,0мл
Вода дистиллированная	20,0мл

Приготовление: Приготовление индикатора метилрота: навеску метилового красного растворяют в спирте, затем добавляют воду и перемешивают. Хранят индикатор в темном месте под притертой пробкой.

Для постановки реакции Фогеса-Проскауэра к оставшимся 2,5 мл культуры добавляют 1,0 мл 6,0% спиртового раствора альфа-нафтола (раствор а) затем 0,4 мл 40,0% водного раствора калия гидроокиси (раствор б), пробирку тщательно встряхивают и спустя 3-5 мин учитывают результаты. При наличии в пробирке ацетилметилкарбинола суспензия окрашивается в розовый цвет-положительная реакция, окраска в желтый цвет свидетельствует об отрицательной реакции, при сомнительной реакции суспензия окрашивается в светло-оранжевый цвет.

Состав реактивов для реакции Фогеса-Проскауэра:

а)

альфа-нафтол .....	30,0 г
Спирт этиловый 96% .....	500,0 мл

б)

Калий гидроокись .....	120,0 г
Вода дистиллированная.....	300,0 мл

Приготовление: навеску альфа-нафтола растворяют в спирте. Навеску калия гидроокиси растворяют в дистиллированной воде.

## **8. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Дальнейшую идентификацию выделенных культур микроорганизмов проводят в соответствии с нормативной документацией.

Для получения достоверных результатов посеvy образцов производить не менее чем в двух повторностях.

## **9. ТРЕБОВАНИЯ К УТИЛИЗАЦИИ И УНИЧТОЖЕНИЮ**

Серии питательной среды, пришедшие в негодность (нарушение целостности упаковки), а также в связи с истекшим сроком годности, утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 как отходы, принадлежащие к классу «А», любым способом, предотвращающим повторное использование, например, сжиганием.

Уничтожение среды Кларка после проведения биологического контроля осуществляется по СП 3.3686-21 как отходы, принадлежащие к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 90 мин при температуре  $(126\pm 1)$  °С.

Обращение с отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной организации. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации.

## **10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ИЗДЕЛИЯ**

Среду Кларка необходимо хранить на складе в герметично закрытой банке, в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °С. После вскрытия банку со средой хранят до истечения срока годности плотно закрытой, в сухом месте при температуре от 2 до 30 °С, избегая попадания влаги.

Среду Кларка транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения, допускается транспортирование при температуре от минус 18 до плюс 40 °С не более 7 суток.

Срок годности: 2 года. Среда с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке использованию не подлежит.

Изготовитель гарантирует соответствие изделия для санитарно-бактериологических исследований «Глюкозо-фосфатный бульон (среда Кларка)», заявленным в ТУ 20.59.52-357-78095326-2021 требованиям и функциональным характеристикам с начала использования в течение всего срока годности и при соблюдении условий хранения и транспортирования.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

По всем вопросам, касающимся качества изделия «Глюкозо-фосфатный бульон (среда Кларка)», получения консультации и поддержки обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-10, факс 36-01-20.