

Питательные среды в санитарной микробиологии и диагностике особо опасных и социально-значимых инфекций.



**Храмов М.В.,
к.м.н., заместитель
директора
ФГУН ГНЦ ПМБ**

**Оболенск-Москва
3 декабря 2008г.**

С чего начинается театр?



С вешалки!!



С чего начинается микробиология?!

С бактериологической лаборатории?



А может быть с «музея»
культур?



Микробиология начинается со «средоварки»



**КАЖДАЯ ТРЕТЬЯ СМЕРТЬ
ВЫЗЫВАЕТСЯ
ИНФЕКЦИОННЫМИ или
ПАРАЗИТАРНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ**

**ОТ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ БОЛЕЗНЕЙ
УМИРАЮТ В ДВА РАЗА МЕНЬШЕ ЛЮДЕЙ**

**WORLD BANK (ВСЕМИРНЫЙ
БАНК)**

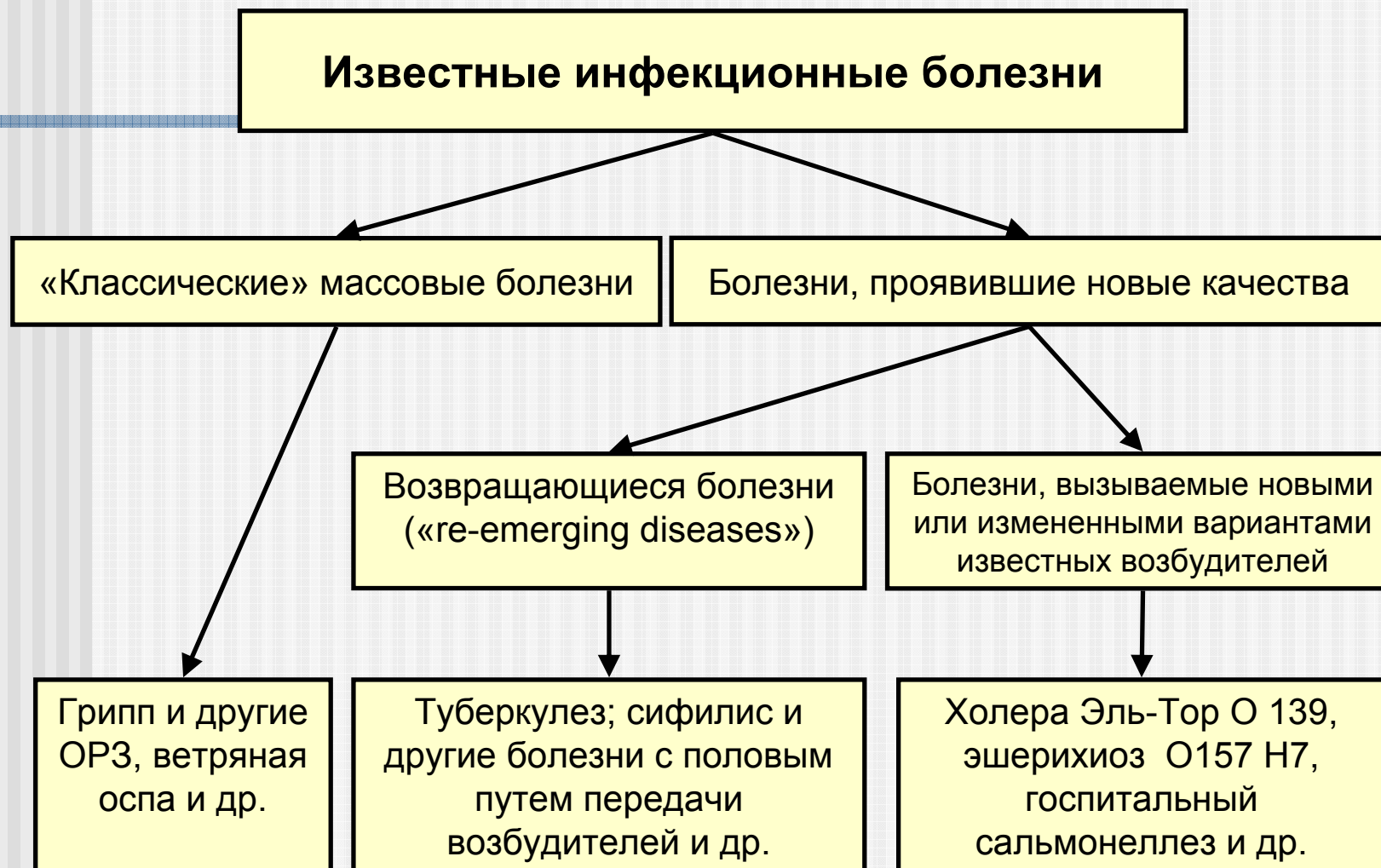
МАССОВЫЕ ИНФЕКЦИИ И ИНВАЗИИ: Число больных, умерших и инвалидов в мире ежегодно

БОЛЕЗНИ	Число больных	Число умерших	Число инвалидов
Диареи	4000 млн.	3,1 млн.	
Гельминтозы	3629 млн.	0,4 млн.	0,5 млн.
Гепатиты В и С	520 млн.	1,2 млн.	5,4 млн.
Малярия	500 млн.	2,7 млн.	
ИППП	474 млн.	0,2 млн.	
ОРВИ + грипп	395 млн.	4,4 млн.	
Протозоозы	333 млн.	0,4 млн.	0,2 млн.
Корь	45 млн.	1,1 млн.	
Коклюш	45 млн.	0,4 млн.	
Туберкулез	22 млн.	3,1 млн.	8,4 млн.

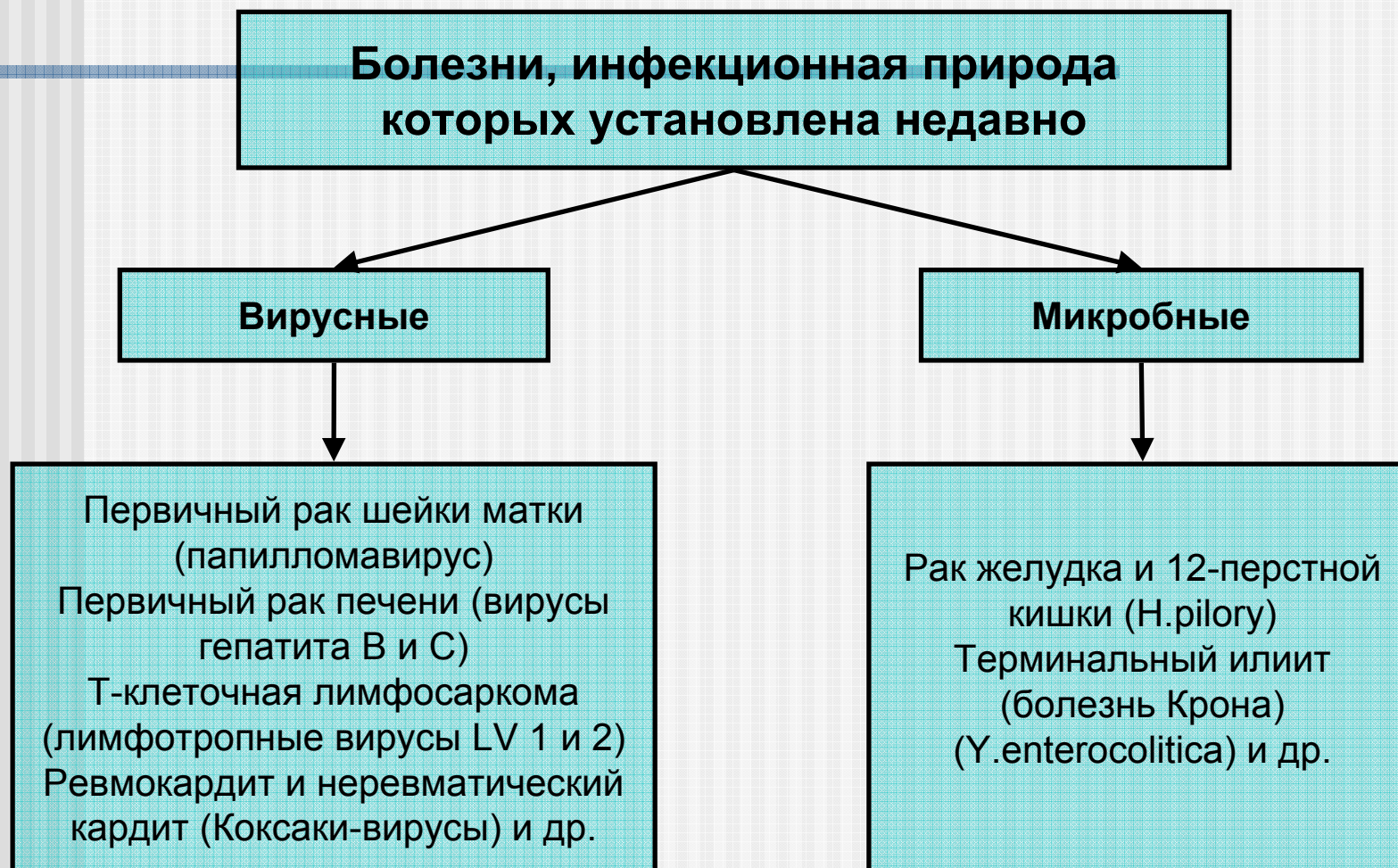
Некоторые инфекционные болезни, впервые выявленные в 60-90-х годах XX века

Год	Нозологическая форма
1962	Лимфома Бэркитга
1963	Боливийская геморрагическая лихорадка
1964	Лихорадка везикулярного стоматита
1965	Геморрагическая лихорадка Марбург
1969	Геморрагическая лихорадка Ласса
1970	Кампилобактериоз
1971	Лихорадка Тамды
1972	Эпидемический геморрагический конъюнктивит (болезнь «Аполло - 11»)
1973	Лихорадка долины Сырдарьи Ротавирусная инфекция Гепатит вирусный А
1974	Эпидемический полиартрит
1975	Энцефалит Росио
1976	Криптоспоридиоз Геморрагическая лихорадка Эбола
1977	Легионеллез Боррелиоз Лайма
1978	Иссык-Кульская лихорадка
1980	Т-клеточная лимфосаркома взрослых
1981	Карельская лихорадка
1982	Волосатоклеточный лейкоз
1983	ВИЧ-инфекция, СПИД, Хеликобактериоз
1984	Японская пятнистая лихорадка

Известные инфекционные болезни



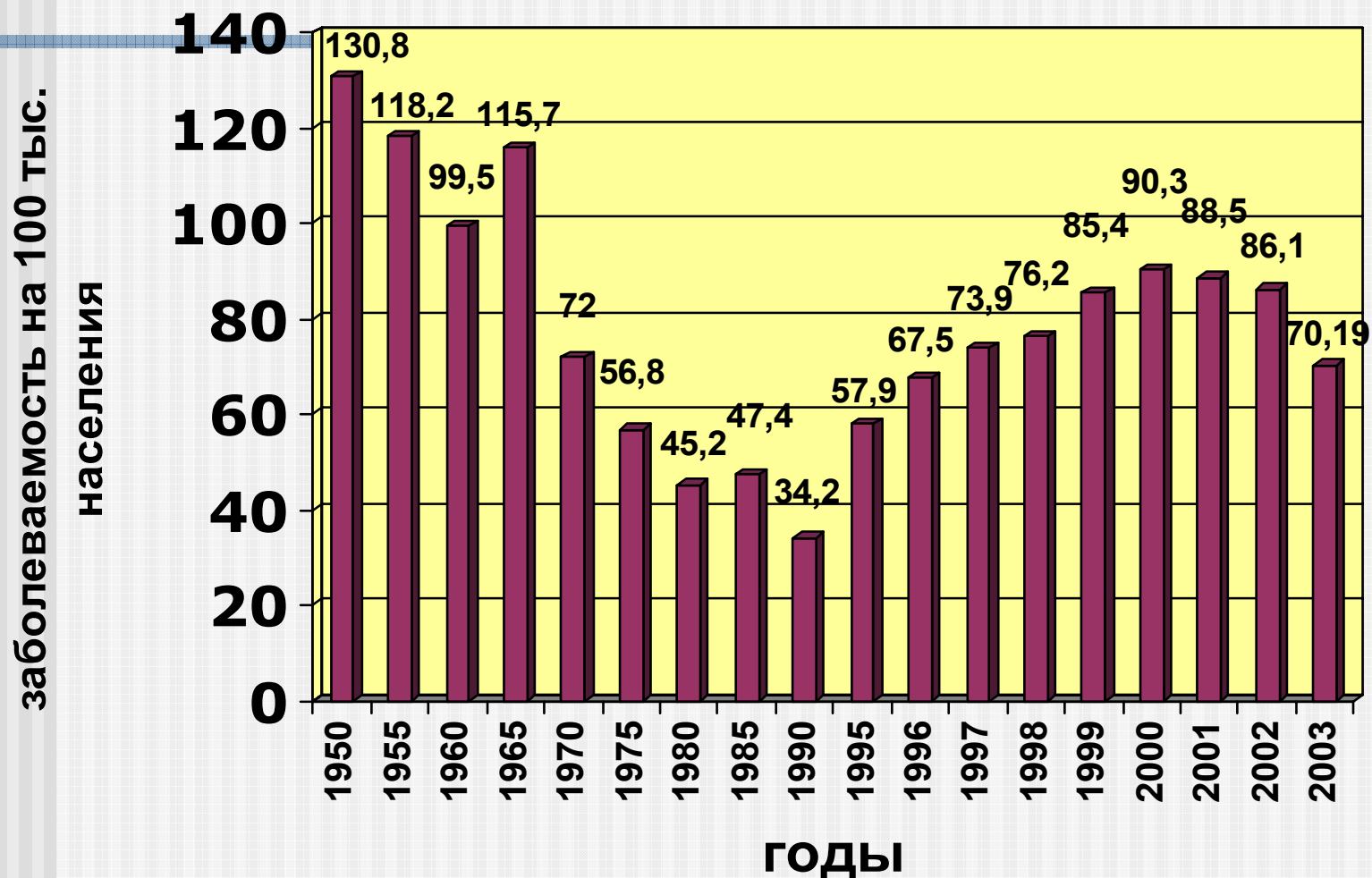
Болезни, инфекционная природа которых установлена недавно



Доля инфекционной и паразитарной этиологии в онкопатологии (ВОЗ)

Локализация онкологических заболеваний		Число новых случаев в год, тыс.	Доля инфекционной или паразитарной этиологии, %
В том числе	Все локализации	10 053	15,0
	Желудок	996	55,0
	Шейка матки	529	83,0
	поружные женские половые органы	39	80,0
	Печень	527	82,0
	РЭТ (лимфомы)	303	16,0
	Кровь (лейкемия)	275	1,0

Динамика заболеваемости туберкулезом в России в 1950-2003 годах



Питательные среды



Классификация

- По способу получения:

-ПРОМЫШЛЕННЫЕ
-ЛАБОРАТОРНЫЕ

- По консистенции :

Сухие
Жидкие
Полужидкие
Плотные

- По способу сушки:

Распылительная
Лиофильная
Грануляция
Вальцовая

Классификация (продолжение)

- По назначению:

-Общего назначения (основы)

-Для выделения

-Для культивирования

-Для идентификации

- Индикаторные по изменению цвета :

Хромогенные 1 поколения(Эндо)

Хромогенные 2 поколения (TCBS)

Хромогенные 3 поколения- флюорохромные среды

- Бактериологические, Вирусологические , для Культур клеток.

Мировые лидеры в производстве питательных сред

1. Becton Dickinson (Difco) (США)
2. Merck (Германия)
3. Oxoid (Англия)
4. Bio-Merieux (Франция)
5. Pronadisa (Испания)
6. Hi-Media (Индия)



Номенклатура – 300-1500 наименований питательных сред;

Формы выпуска – сухие и жидкие (стерильные) препараты;

Источник белка – гидролизаты, перевары, пептоны на основе мяса (более 50% номенклатуры), сои, казеина;

Сертификация – выпуск препаратов в соответствии с международным сертификатом ISO-9001 (9002).

DIFCO-Beckton Dickenson-BD

- ДИФКО ЛАБОРАТОРИЗ», первоначально именовавшаяся компанией «РЭЙ КЕМИКЛС», учреждена в 1895 г
- 1913г. «РЭЙ КЕМИКЛЗ» приобрела предприятие «Дайджестив Ферментс Корпорэйшн»
- В период после 1895 г. для стимуляции роста бактерий и грибов было предложено использовать гидролизаты мяса и других белковых продуктов. Широкомасштабное исследование протеолитических особенностей пепсина, панкреатина и трипсина привело к созданию БАКТО-пептона. Впервые предложенный в 1914 г., БАКТО-пептон – в качестве источника легко усваиваемого микробами азота – использовался для бактериологических исследований воды и молока.
- ДАЙДЖЕСТИВ ФЕРМЕНТС КОМПАНИ» приступила к производству диагностических реагентов (сухих питательных сред) в 1923г.
- В 1934 г. «ДАЙДЖЕСТИВ ФЕРМЕНТС КО» переименовалась, сократив упомянутое название до акронима «ДИФКО».
- В 1997 г. ДИФКО – «лидер в индустриальной микробиологии» - был куплен «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ БЕКТОНА ДИКИНСОНА» («лидером в клинической микробиологии»), и таким образом образовалась крупнейшая микробиологическая компания в мире.

Производство питательных сред в России

1. НПО «Питательные среды» (г. Махачкала)

1. Номенклатура препаратов – более 60 наименований
2. Белковый гидролизат
 - панкреатический гидролизат кильки каспийской (более 50% всей номенклатуры)
 - пептон ферментативный
 - гидролизат казеина
 - экстракт БВК
3. Объемы производства – 60-80 тонн в год.



2. ФГУП ГНЦ ПМ (п. Оболенск)

1. Номенклатура препаратов – более 60 наименований
2. Белковый гидролизат
 - панкреатический гидролизат рыбной муки (более 60%)
 - гидролизат казеина
 - пептон мясной
3. Объемы производства – 70-90 тонн в год.

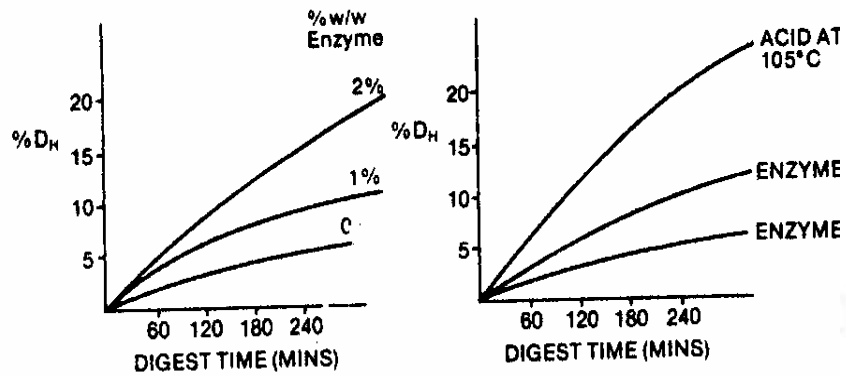
3. АО Биомед (п. Петрово-Дальнее)

1. Номенклатура препаратов – около 20 наименований
2. Объемы производства – до 20 тонн в год.

Характеристика рыбной муки в качестве сырья в производстве питательных сред

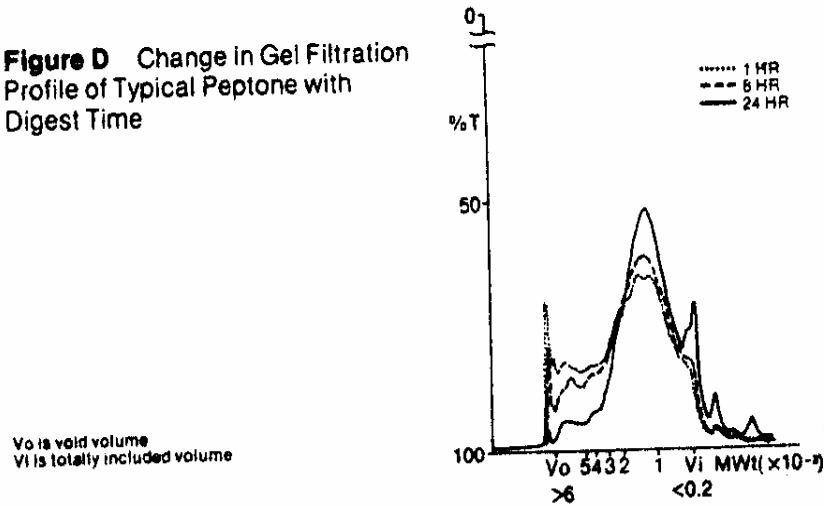
1. Биологически полноценный белок с высоким содержанием сырого протеина.
2. Относительно стандартно.
3. Доступно в неограниченных количествах.
4. Непищевое сырье.
5. Низкая стоимость.
6. Удобно в транспортировке и не требует специальных условий хранения.

Figure C Effect on Enzyme Concentration and Type of Hydrolysis on D_H



During the course of digestion the molecular size profile also changes from higher to lower molecular sizes (fig D) thus a range of peptones can be made with a wide variety of chemical and bacteriological properties.

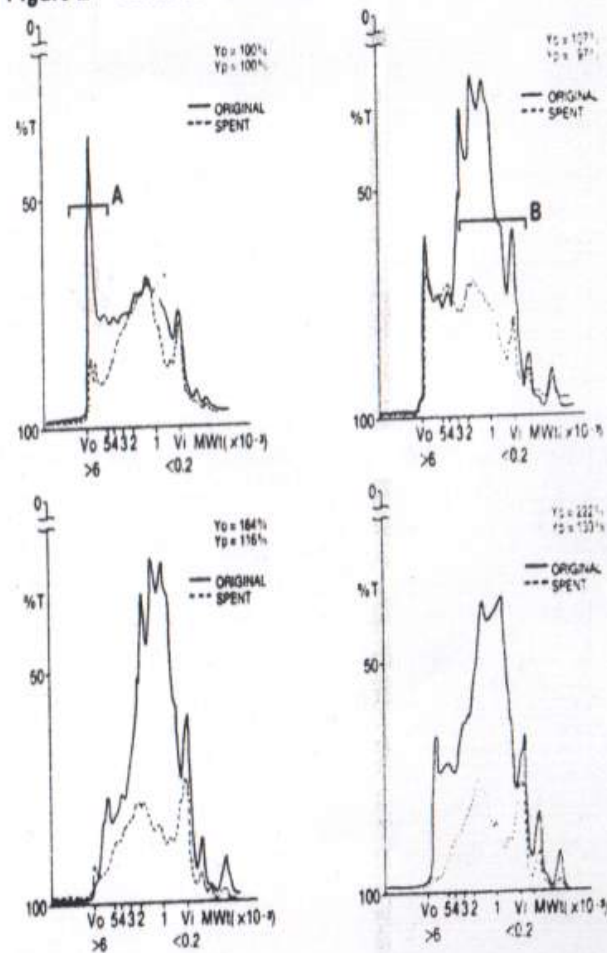
Figure D Change in Gel Filtration Profile of Typical Peptone with Digest Time



Vo is void volume
Vi is totally included volume

profiles however were most useful.

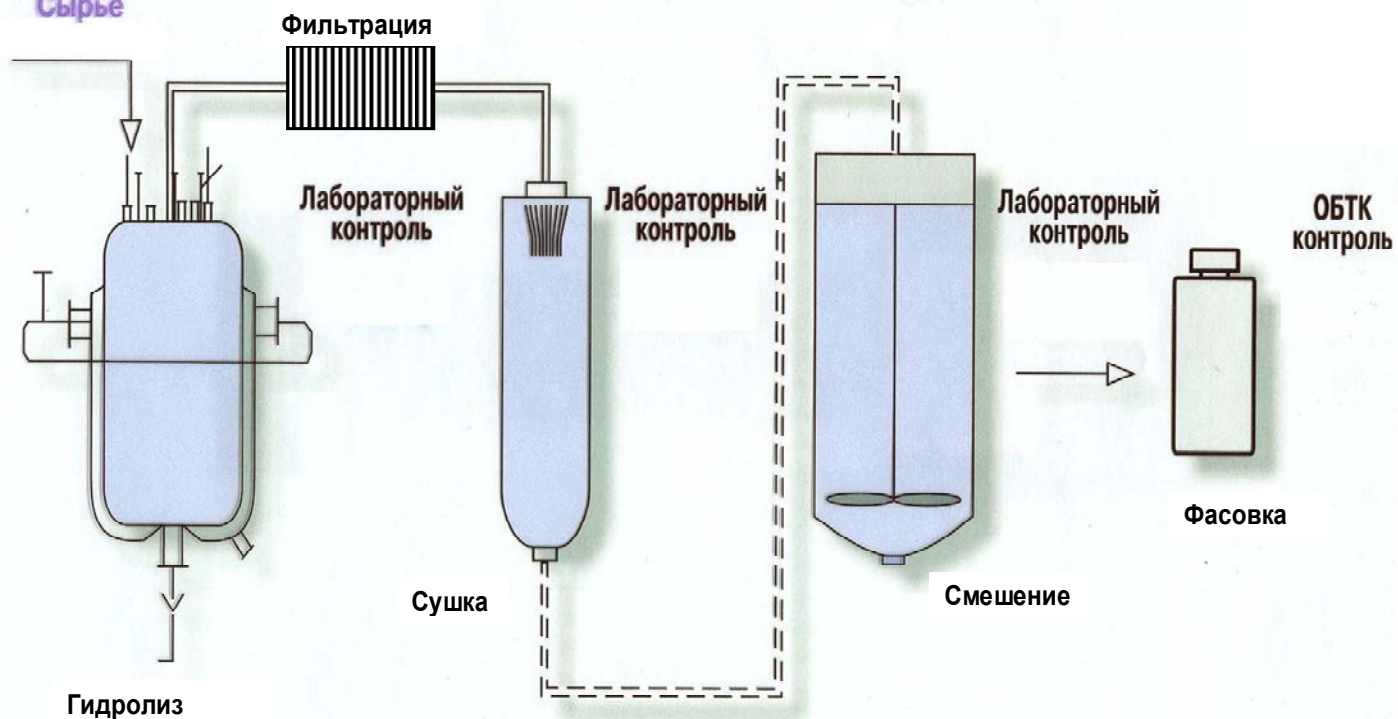
Figure E Profiles of Fermentation Broths

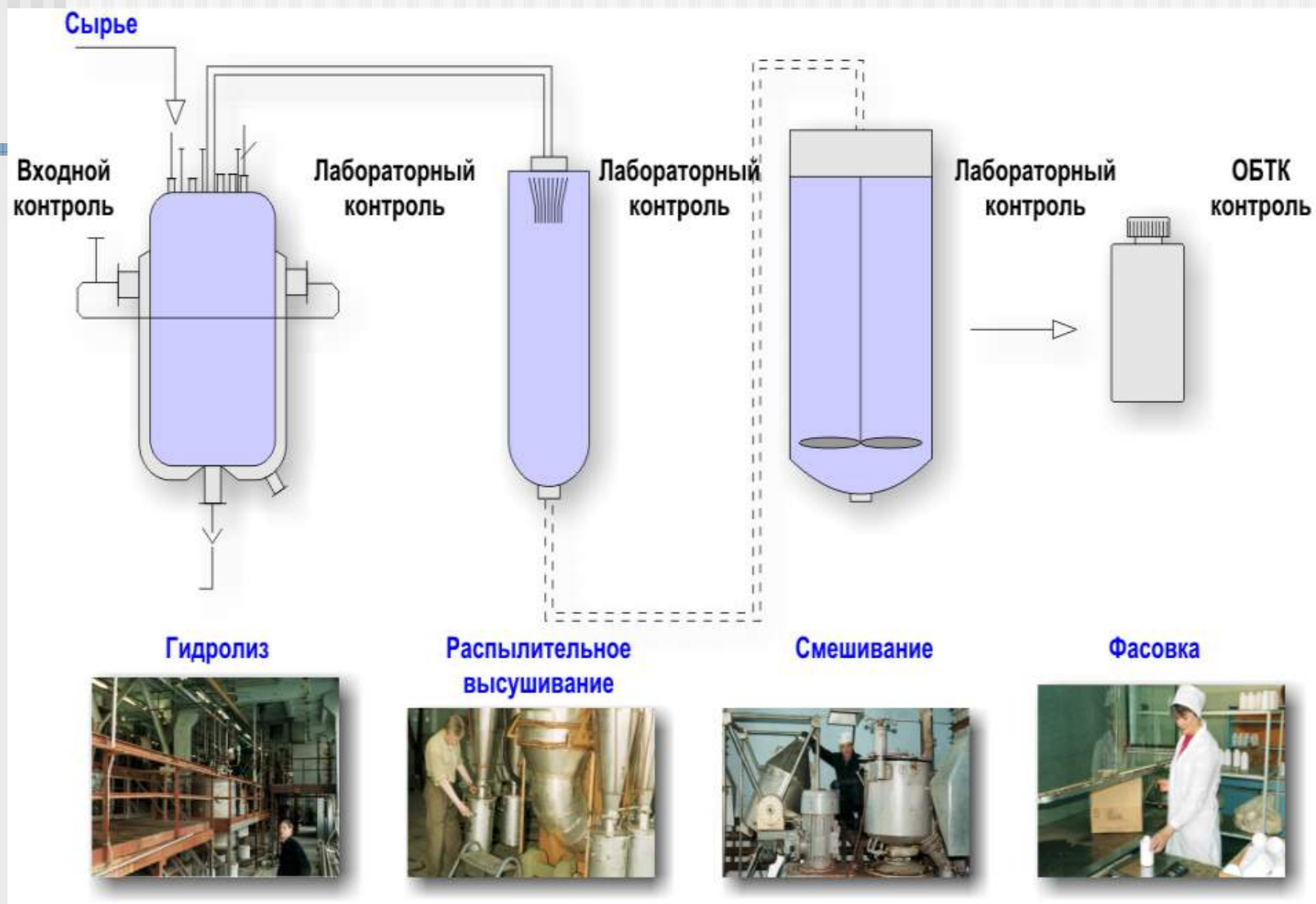


Аппаратурно-технологическая схема производства питательных сред ГНЦ прикладной микробиологии

Входной контроль

Сырье

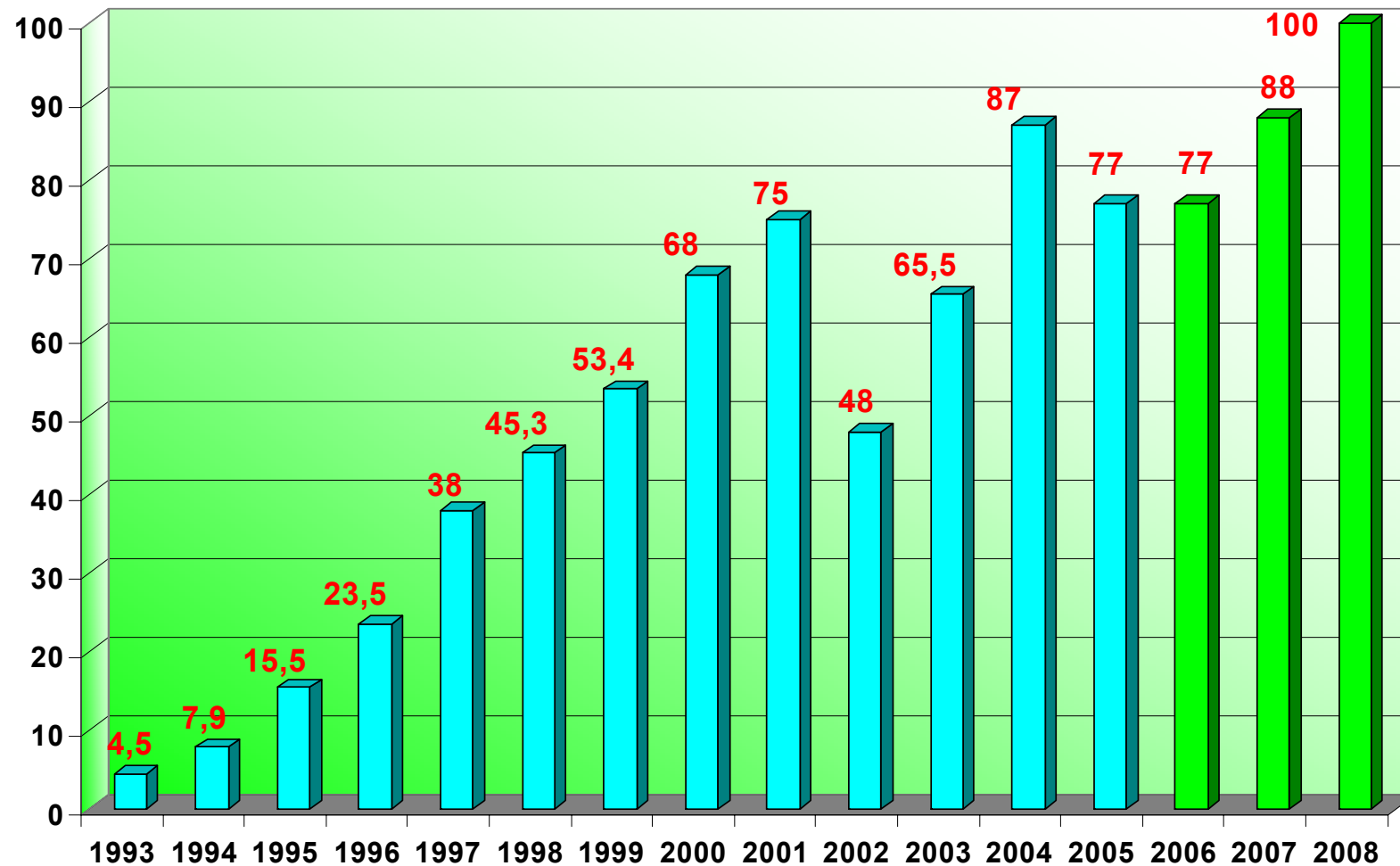




Питательные среды Оболенск



Объемы производства питательных сред (тонн)



Питательные среды и основы для бактериологии производства ФГУН ГНЦ ПМБ

ОСНОВЫ	ГОТОВЫЕ СРЕДЫ	Сухие среды
ПГРМ	<i>МПА</i>	ЭНДО
ПГК	<i>МПБ</i>	Левина
СГК	<i>Агар Хоттингера</i>	ВСА
Пр ГРМ	<i>Бульон Хоттингера</i>	Плоскирев
Автолизаты и	<i>Сахарный бульон</i>	SS-агар
Экстракты дрожжей	<i>Среда Сабуро</i>	Макконки агар
Стимулятор роста ГМО	<i>Среды для микобактерий:</i>	Среда Кесслера
Желчь сухая очищенная	<i>Левенштейна - Йенсена</i>	Среда Эйкмана
	<i>Финна II</i>	СРЕДЫ №1-№15
	<i>ТВ-тест набор</i>	Менингоагар

Перечень питательных сред ГНЦ ПМ (начало)

Питательные основы и стимуляторы роста	
1	Панкреатический гидролизат казеина
2	Панкреатический гидролизат рыбной муки
3	Экстракт пекарных дрожжей
4	Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов
5	Желчь очищенная сухая
Сухие питательные среды	
1	ГРМ-бульон
2	ГРМ-агар
Среды для воздушно-капельных инфекций	
1	Коринебакагар (без теллурита калия)
2	Коринетоксагар
3	Среда Пизу
4	Бордетелагар
Среды для энтеробактерий	
1	Селенитовый бульон
2	SS-агар
3	Бактоагар Плоскирева

4	Среда Левина-ГРМ
5	SDS-бульон
6	Агар Эндо-ГРМ
7	Кампилобакагар
8	Висмут-сульфит ГРМ-агар
9	Среда Кесслера-ГРМ
10	Среда Клиглера-ГРМ
11	Среда Гисса с лактозой
12	Среда Гисса с сахарозой
13	Среда Гисса с маннитом
14	Среда Гисса с глюкозой
15	Среда Гисса с мальтозой
16	Среда Ресселя
17	Среда Олькеницкого
18	Цитрат агар Симмонса
19	Магниевая среда
20	Цитратный агар Кристенсена
21	Сорбитол E.coli 0157:H7 агар

Перечень питательных сред

ГНЦ ПМ (продолжение)

<i>Среды для выделения кокков</i>	
1	Менингоагар
2	Энтерококкагар
3	Стафилококкагар
4	ГНК-агар (гонококковая среда)
<i>Среды для особо опасных инфекций</i>	
1	Легинелбакагар
2	FT агар (туляремийная среда)
3	ЧПС (чумная среда)
4	Пептон основной
5	Агар щелочной
6	Сибиреязвенная среда
<i>Другие питательные среды</i>	
1	Бифидум-среда
2	Лактобакагар
3	Ирсиниозная среда
4	Тиогликолевая среда

<i>Питательные среды для контроля микробной загрязненности</i>	
1	Среда № 1 (КМАФАМ)
2	Среда № 2 (Сабуро) для выращивания грибов
3	Бульон Сабуро сухой
4	Среда № 3 (для нтеробактерий)
5	Среда № 6 (для ферментации глюкозы)
6	Среда № 7 (восстановление нитритов в нитраты)
7	Среда № 8 (определение синегнойной палочки и стафилококков)
8	Среда № 9 (для выявления пигмента пиоцианина)
9	Среда №10 (для стафилококков)
10	Среда №11 (лактозный бульон)
11	Среда № 12 (селенитовый бульон)
12	Среда № 13 (трехсахарный агар)
13	Среда № 14 (цитратный агар Симмонса)
14	Среда № 15 (бульон с триптофаном)

Разрешительная документация



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ

№ ФСР 2007/01366

от 3 декабря 2007 года Срок действия: не ограничен.

Настоящее удостоверение выдано
Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии"
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Россия, 142279, Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск
и подтверждает, что изделие медицинского назначения
Набор питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза (ТБ тест-набор) по 9398-060-78095326-2007
производства
Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии"
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Россия, 142279, Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск

класс потенциального риска 1 ОКП 93 9816

соответствующее комплексу регистрационной документации

КРД № 26576 от 16.08.2007

приказом Росздравнадзора от 3 декабря 2007 года № 4382-Пр/07
разрешено к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации

Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития **И.В. Юргель**



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ
1997



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2139343

На основании Патентного закона Российской Федерации, введенного в действие 14 октября 1992 года, Российским агентством по патентам и товарным знакам выдан настоящий патент на изобретение

**ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ
ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО КОЛИТА С ГЕМОЛИТИКО-
УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, ВЫЗЫВАЕМОГО КИШЕЧНОЙ
ПАЛОЧКОЙ 0157:H7 (СОРБИТОЛ E-COLI 0157:H7/AGAR)**

Патентообладатель(и)
Государственный научный центр прикладной микробиологии
от заявки № 97118081, дата поступления: 31.10.97
Приоритет от 31.10.97
Автор(ы) изобретения

см. на обороте

Патент действует на всей территории Российской Федерации в течение 20 лет с 31 октября 1997 г. при условии своевременной уплаты взносов за поддержание патента в силе

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации

г. Москва, 10 октября 1999 г.

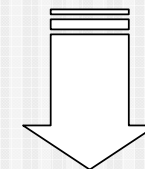
Заместитель руководителя

Л.В. Коркина

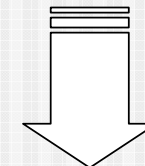




Сертификат менеджмента качества



ISO 9001 –2000



Реализация продукции в Европейские страны

Требования по биологическим показателям предъявляемые к бактериологическим питательным средам и тест системам (в том числе и ПЦР)

Бактериологический

1. Чувствительность- 10^{-7} - 10^{-9} (от 1 клетки на 25-50г продукта или в 225 мл).

2. Показатель стабильности- сохранение основных свойств м\о

3. Показатель ингибиции и дифференциации.

5. Скорость роста: от 10 часов.

6. Цена: относительно низкая

Тест-системы

1. Чувствительность -Пределы детекции: токсины -ниже 10 нг/мл, микробы- **100 кл/мл**

2. Время: меньше 15 минут

3. Специфичность: вид/род

4. Размер: можно держать в руках **(сегодня это несколько кг.)**

5. Цена: относительно низкая **(ОТНОСИТЕЛЬНО НИЗКАЯ от чего?)**

Биологические показатели

1. Чувствительность-
максимальное разведение
контрольной культуры м\о (на
всех засеянных емкостях или 2
из 3) 10^{-7} - 10^{-9} .
2. Эффективность- по выходу
биомассы в КОЕ с 1мл пит.среды.
3. Показатель стабильности-
сохранение основных свойств м\о
в %.
4. Дифференцирующие свойства.
5. Показатель ингибиции.
6. Скорость роста

BCA



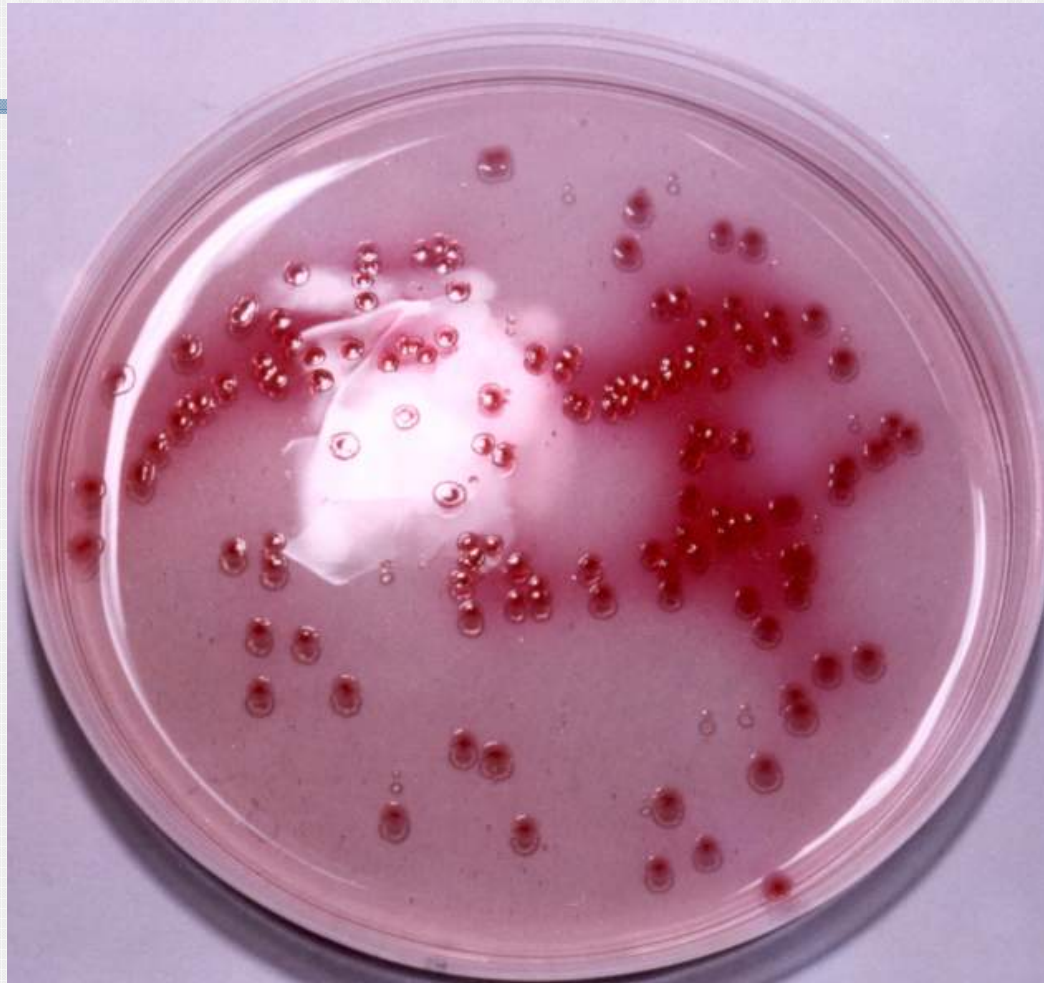
Среда Левина



Агар Эндо



Сорбитол E.coli O157: H7 АГАР



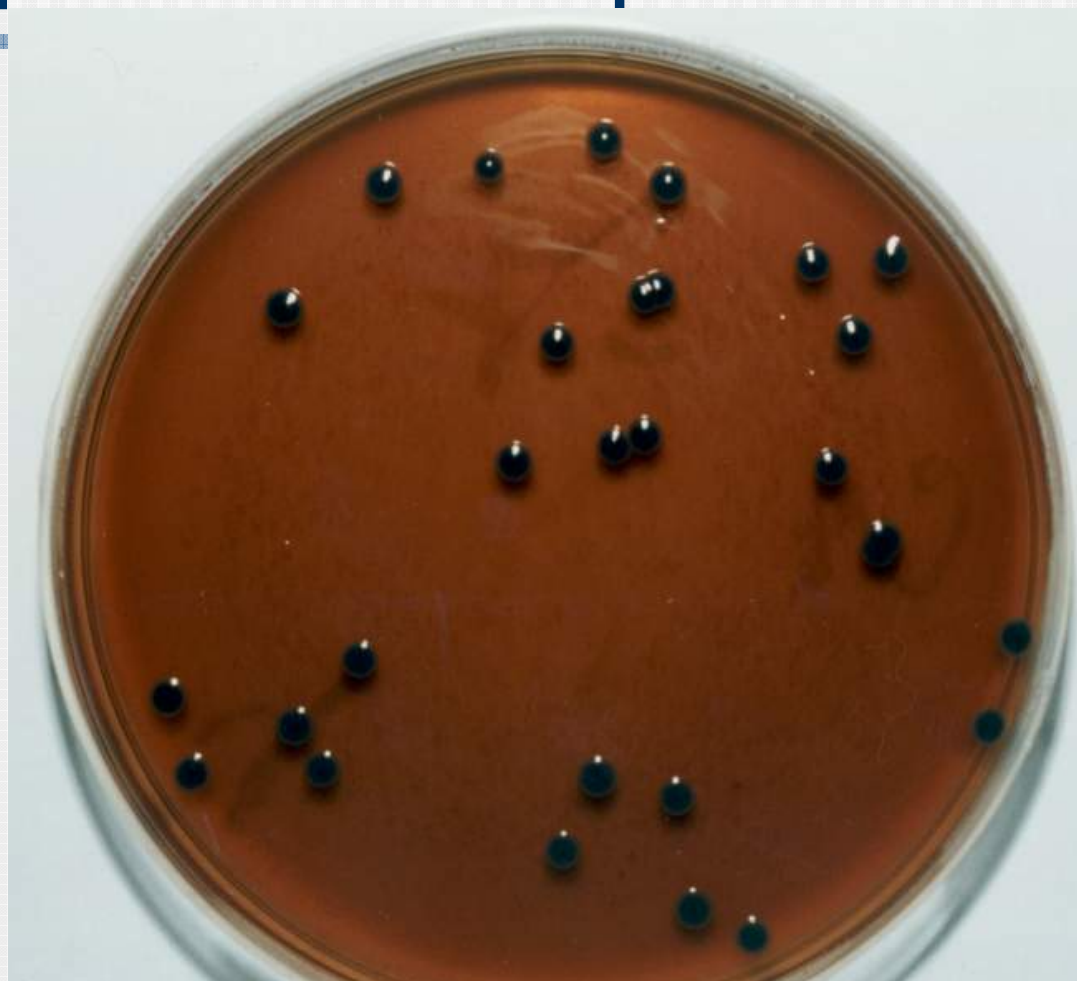
■ SS-агар



Кишечная палочка и патогенные йерсинии



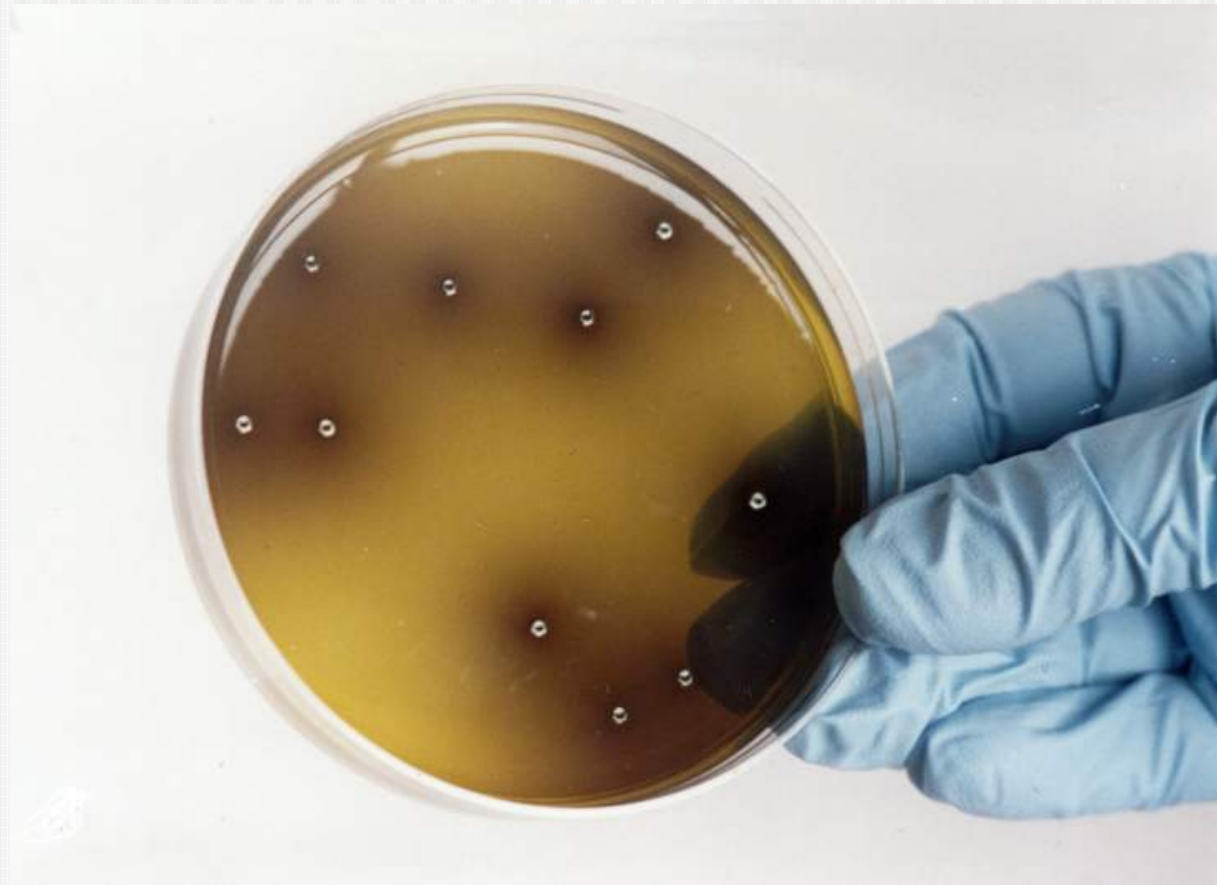
Коринебакагар



Среда типа АГВ.



Селективная среда для выделения Листерий



Среды для санитарной микробиологии



Агар Клиггера



Среды для санитарной и клинической микробиологии



Коринебактар:
Corinebacterium diphtheriae mitis.

Нерсиниозная среда:
дифференциация *E.coli*,
Y.enterocolitica и
Y.pseudotuberculosis.



Нерсиниозная среда:
вверху слева - *Y.pseudotuberculosis* - зелено-синие сухие колонии с фестончатым краем;
внизу слева - *Y.enterocolitica* - синие сочные гладкие колонии;
вверху справа - *S.flexneri* - желтые мелкие колонии;
внизу справа - *E.coli* - желтые сочные выпуклые колонии.



SS-агар:
дифференциация *E.coli* (красные круглые колонии) и *Salmonella* spp. (бесцветные прозрачные круглые колонии, некоторые, выделяющие сероводород - с темным центром).

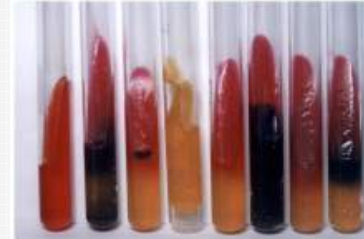


Агар Эндо-ГРМ:
дифференциация *S.sonnei* (бесцветные или бледно-розовые прозрачные колонии) и *E.coli* - малиновые круглые с металлическим блеском.

Среда Левина-ГРМ:
дифференциация *E.coli* (темно-фиолетовые круглые колонии с металлическим блеском) и *S.flexneri* (бесцветные круглые прозрачные колонии)



Висмут-сульфит-ГРМ агар:
1: *E.coli* (круглые зеленовато-коричневые колонии),
S.typhi (колонии круглые черные с металлическим блеском),
2: *P.vulgaris*,
3: *S.typhimurium*.



Агар Клигелера-ГРМ:
слева направо
1-исходная среда;
2-*P.mirabilis* "Cudmore";
3-*S.typhi* "bismuth";
4-*E.coli*;
5-*S.sonnei* "S-form";
6-*S.paratyphi*;
7-*P.inconstans*;
8-*P.vulgaris*.



Агар Кесслера-ГРМ:
слева исходная среда,
в центре - рост *E.coli*,
справа - *S.paratyphi*.



Мюллер-Хинтон агар:
Антибиотикограмма культуры *P.aeruginosa*
(вверху слева - гентамицин,
вверху справа - нетилмицин,
внизу слева - цефтриаксон,
внизу справа - карбенциллин 100 мкг).

Среды общего назначения	Среды для кишечной группы	Среды для кокков	Среды для БакТрак-4100
ГРМ-агар	Эндо-ГРМ	Энтерококкагар	001А
ГРМ-бульон	Левина-ГРМ	Стафилококкагар	160В
Среда № 1	SS-агар	Менингоагар	160С
	ВСА-агар	ГНК-агар	160S
	Сорбитол E.coli O157:H7 агар	Среда № 8	205А
	Агар с бриллиантовым зеленым	Среда № 10	501В
	Левина-ГРМ	Байрд-Паркер	
	Иерсиниозная среда	Среда № 1	
Среды для ООИ	Кампилобакагар		
FT-агар	Бифидум-среда	Среды для ЗПП	Среды для коринебактерий и бордетелл
Легионелбакагар	Лактобакагар	Уреаплазменная среда	
Сибиреязвенная среда	Энтерококкагар	Трих-бульон	КБА
	SDS-бульон	ГНК-агар	КТА
TCBS	Кесслера-ГРМ		Бордетелагар
ЧПС	Трехсахарный агар (Среда № 13)		Среда Пизу
	Ресселя-ГРМ		
Среда типа Мюллер-Хинтон	Среда Олькеницкого		
Среда типа АГВ	Клиглера-ГРМ		
	Среда Козера		
	Среды Гисса		

Питательные среды для контроля микробной загрязненности

1	Среда № 1 (для выращивания бактерий)
2	Среда № 2 (Сабуро) для выращивания грибов
3	Среда № 3 (для обогащения энтеробактерий)
4	Среда ЭНДО
5	ВСА
6	Среда № 6 (для опред. ферментации глюкозы)
7	Среда № 7 (восстановление нитритов в нитраты)
8	Среда № 8 (определение синегнойной палочки и стафилококков)
9	Среда № 9 (для выявления пигмента пиоцианина)
10	Среда №10 (для выявления стафилококков)
11	Среда №11 (лактозный бульон)
12	Среда № 12 (селенитовый бульон)
13	Среда № 13 (трехсахарный агар)
14	Среда № 14 (цитратный агар Симмонса)
15	Среда № 15 (бульон с триптофаном)

Изоляция и типирование возбудителя сибирской язвы



Figure 2. Fluid collected from the Kamelido site cultured on Petri dishes to identify potential *Bacillus anthracis* isolates.

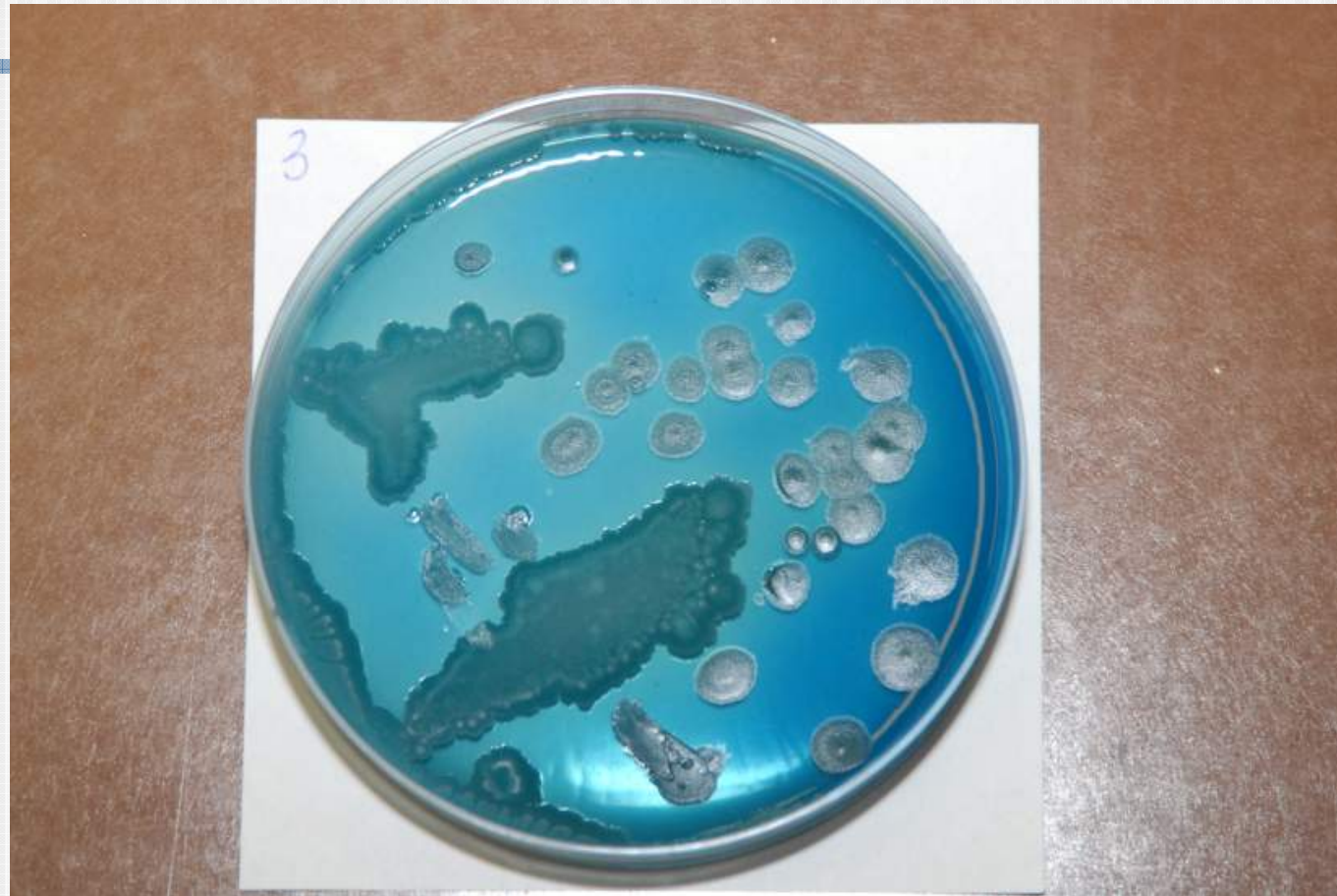


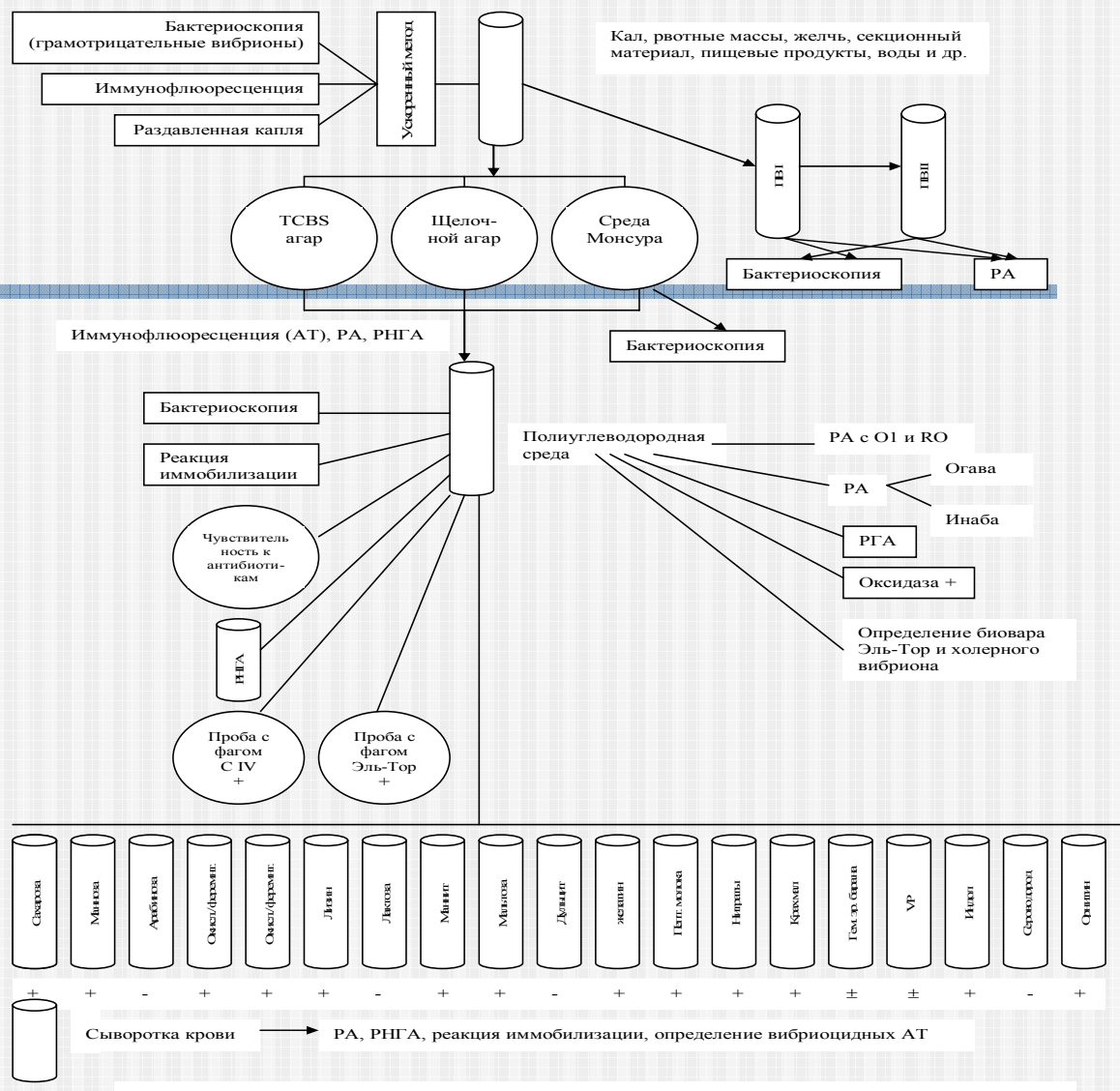






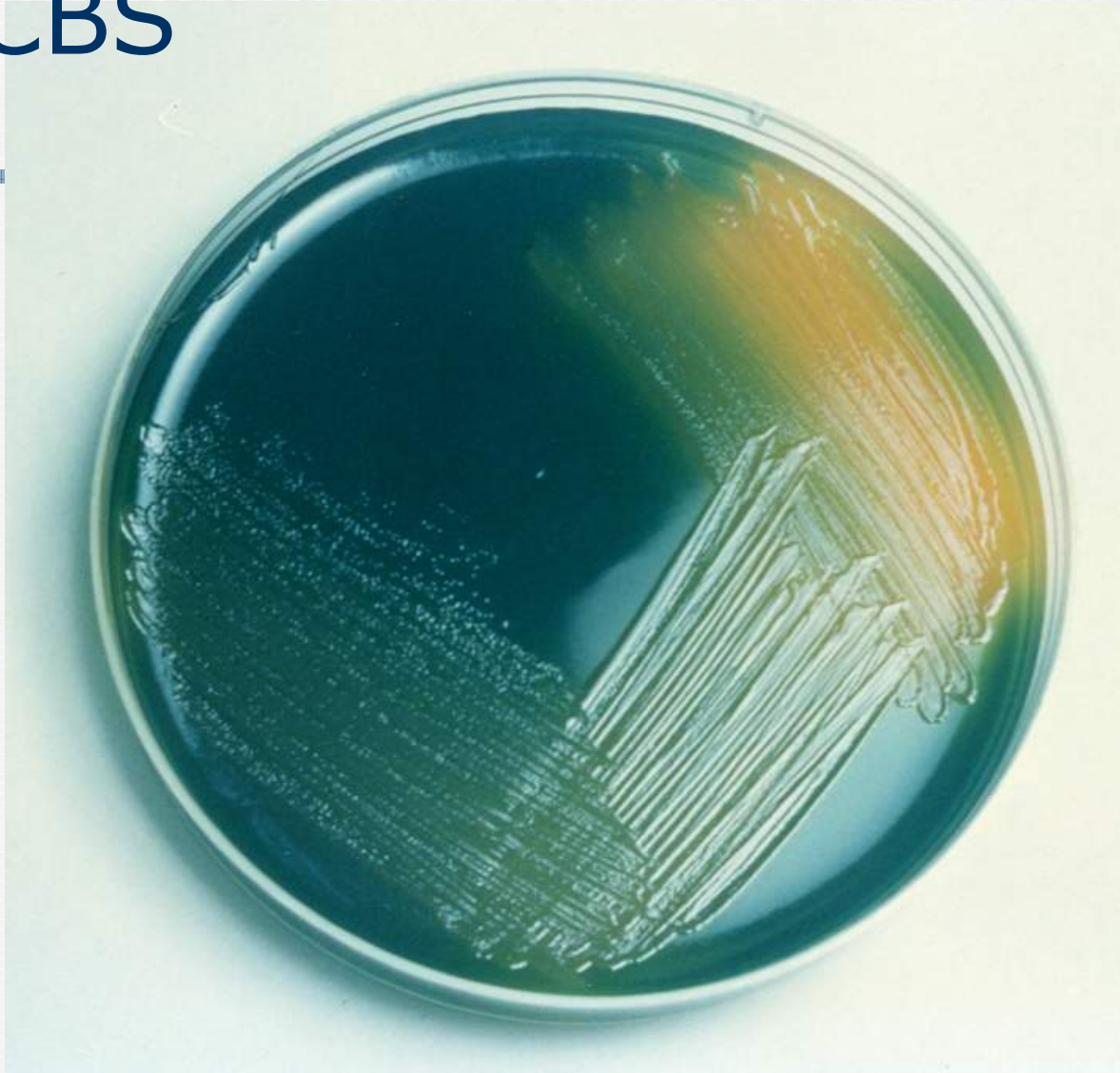
Дифференциация по морфологии





Принципиальная схема бактериологического выделения возбудителей холеры

TCBS



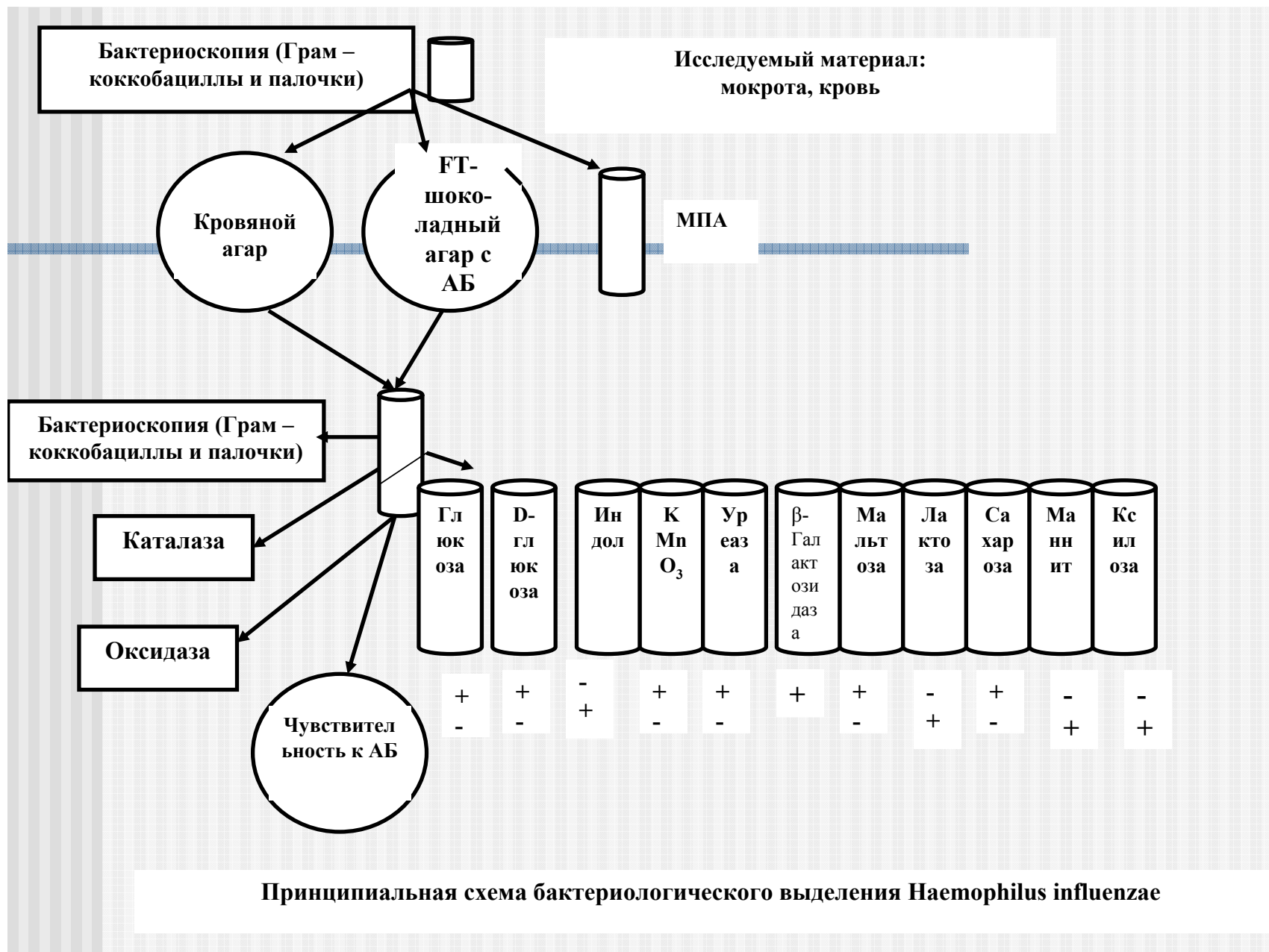
FT-агар для выделения туляремии











Высев на GT-агар материала подозрительного на менингококковую инфекцию

Колонии



Шоколадный агар на основе FT-агара с выделенной культурой гемофильной палочки



Выделение чистой культуры и определение чувствительности к АБ.



Рост коринебактерий в S-форме на КБА



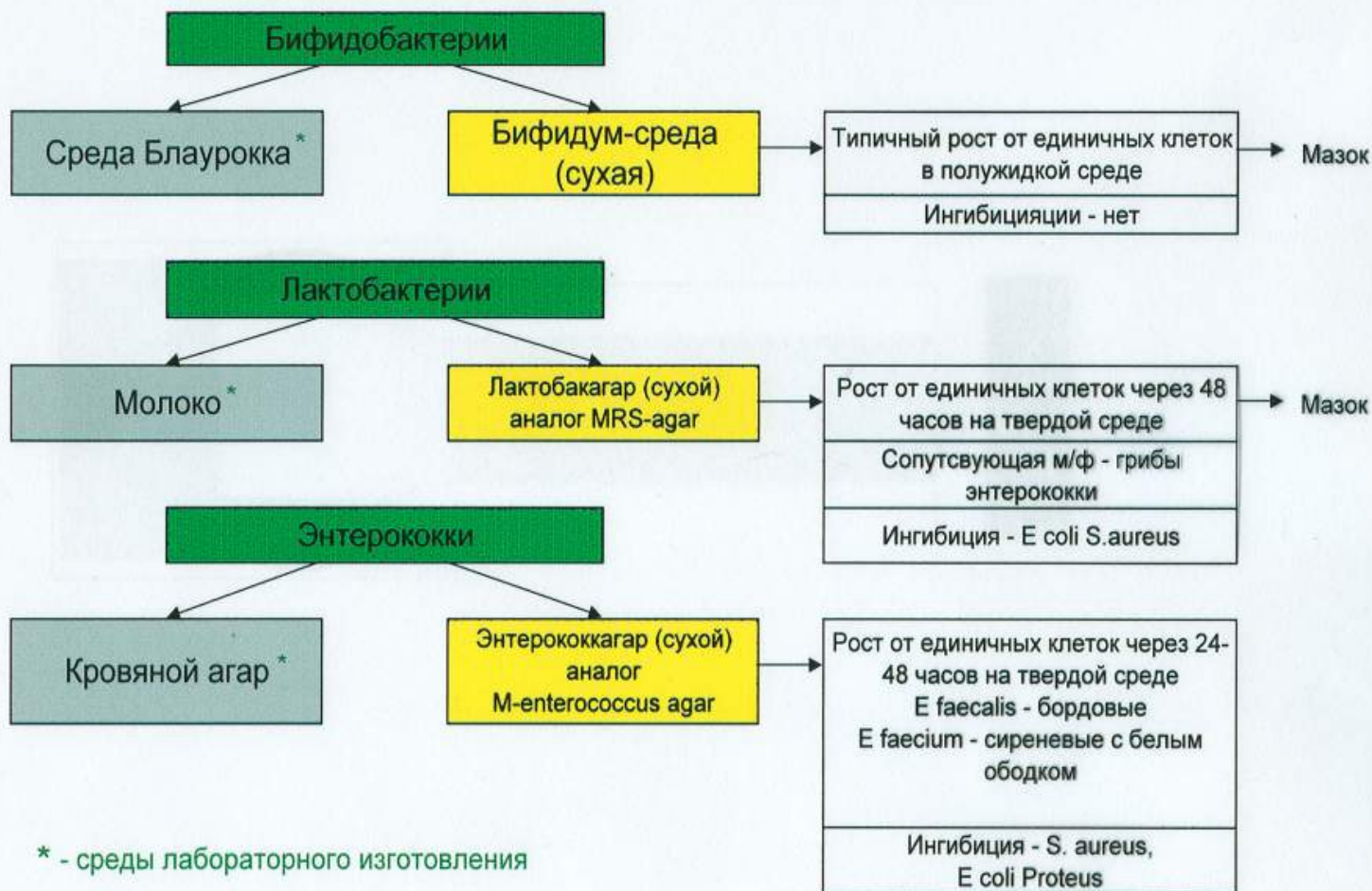
Дифференциация йерсиний и колиформ



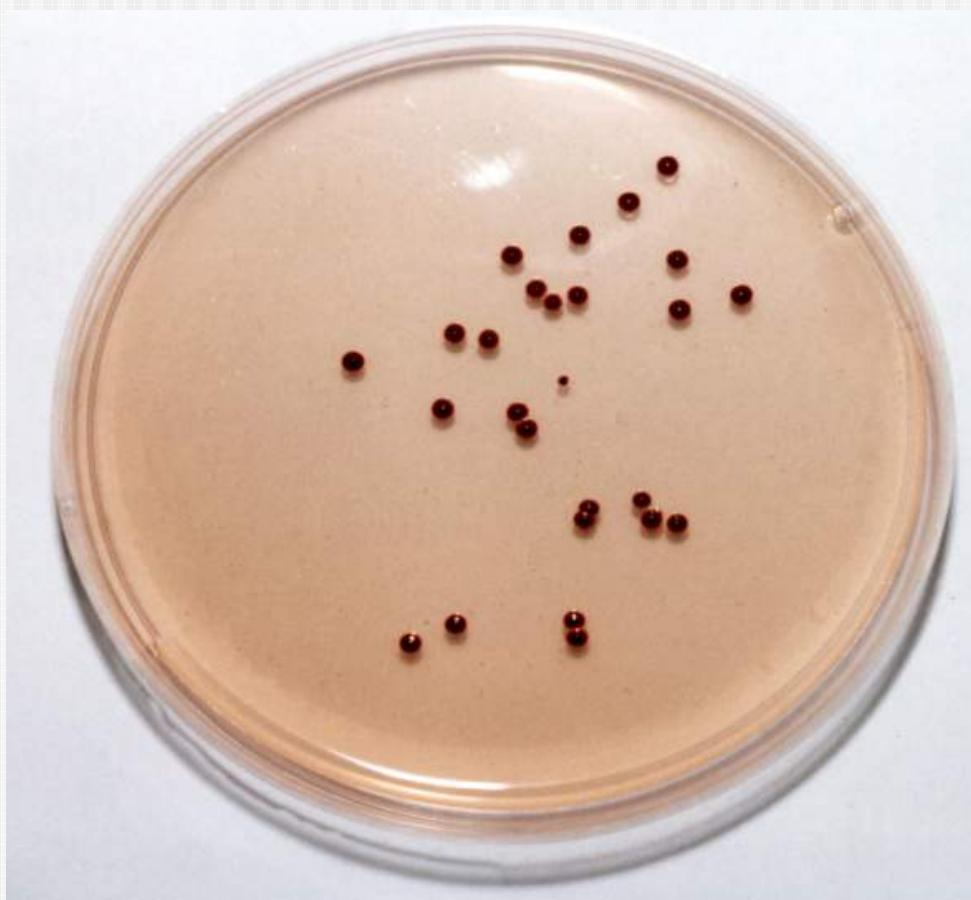
Агар Клиггера



Питательные среды для выявления основных представителей микрофлоры кишечника



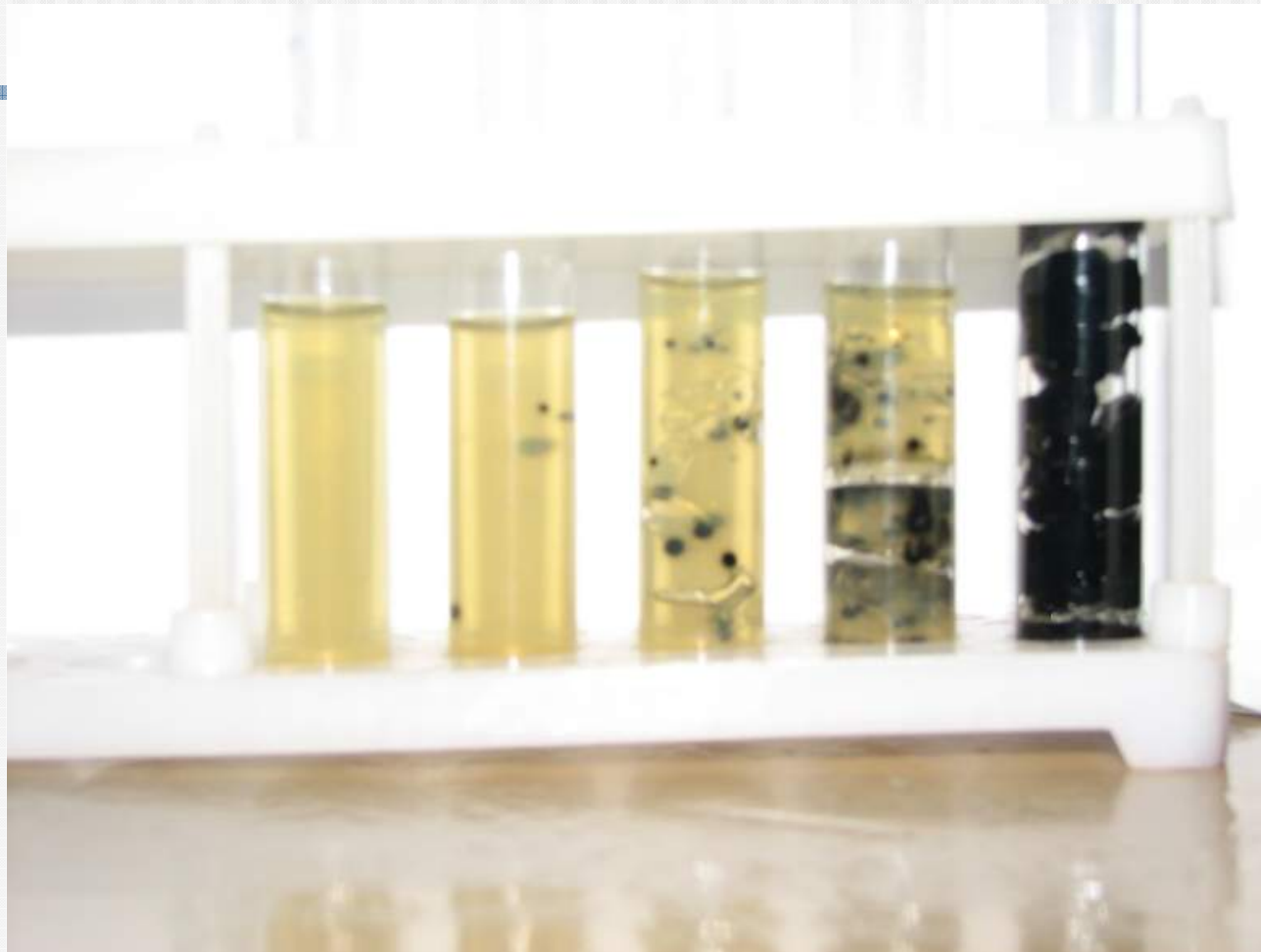
ЭНТЕРОКОККАГАР



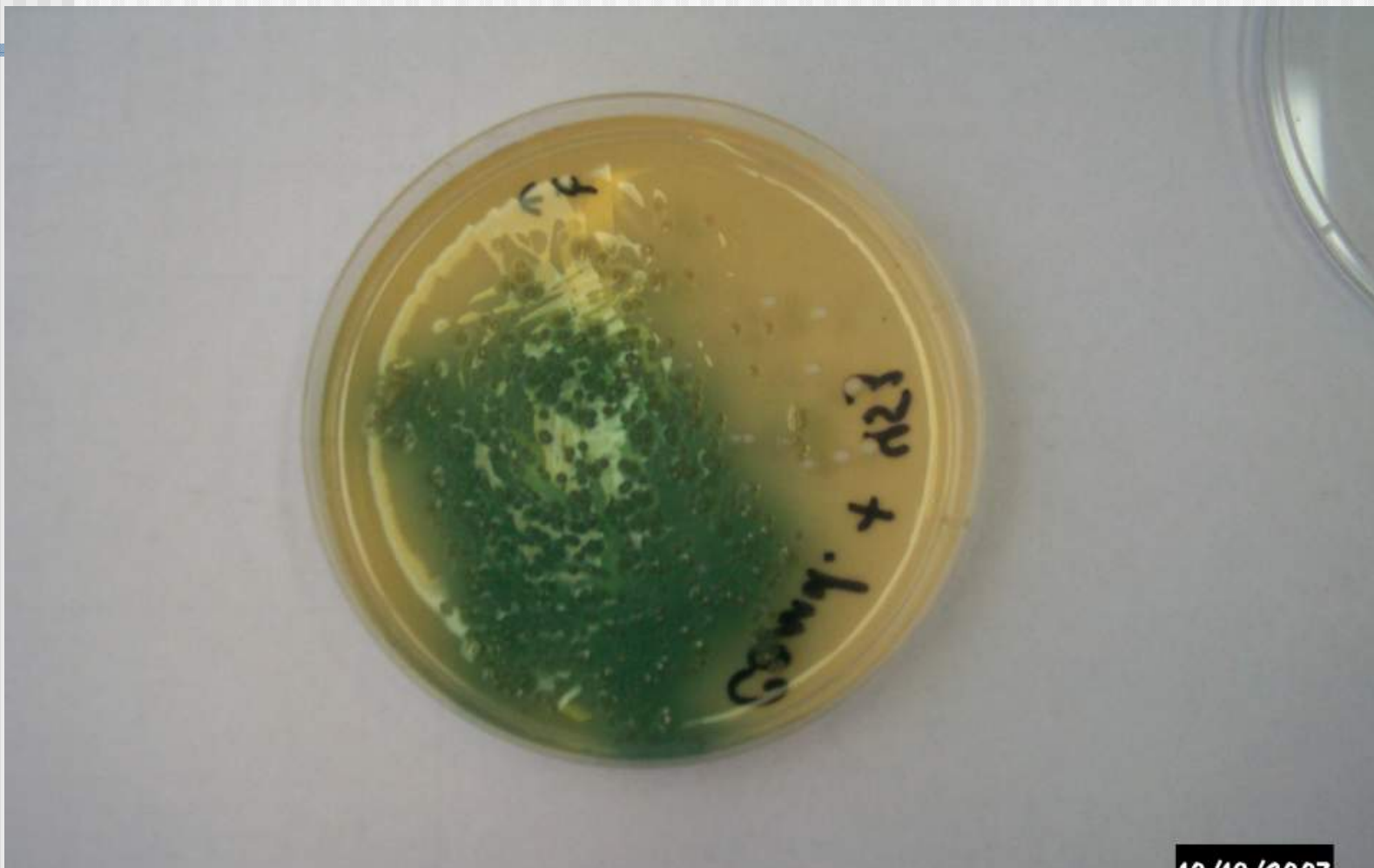
■ Бифидум среда



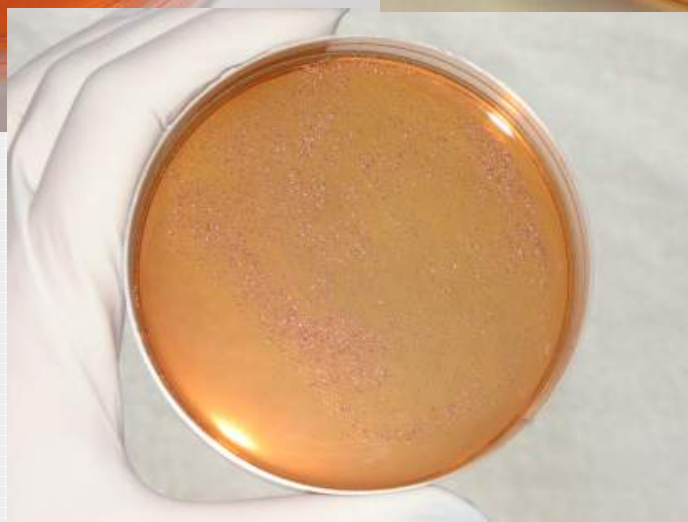
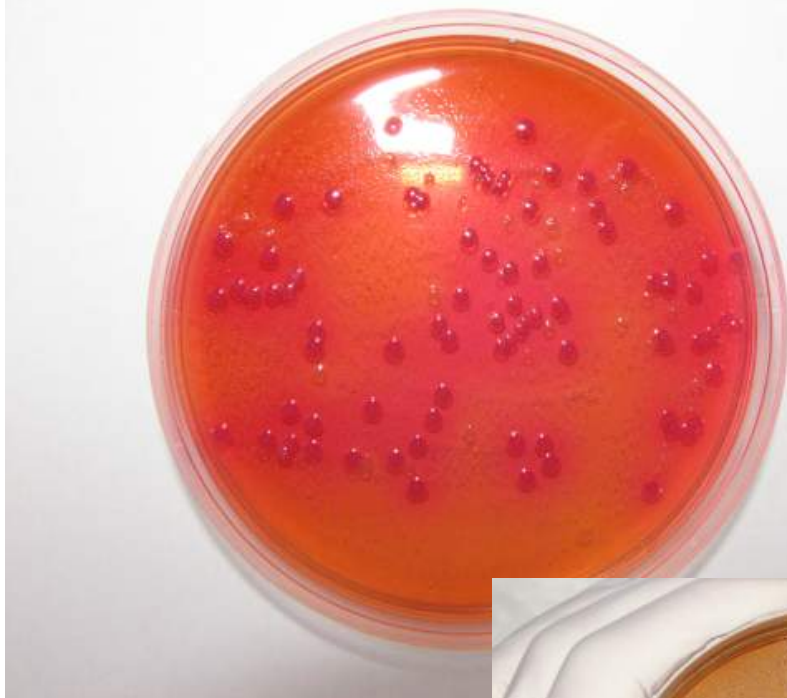
Среда типа Вильсона Блеэра



Сабуро-мальтоза агар



Агар МакКонки



Макконки бульон





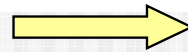
- Цвет среды сине-зеленый-контроль
- Цвет среды не изменился-отрицательный
- Цвет среды желтый и зеленый (с газом или без)- КОЛИФОРМЫ
 β -D-галактозидаза

Флюорохромные среды (Merck)



Цвет среды не изменился

отрицательный



Цвет среды сине-зеленый

КОЛИФОРМЫ
 β -D-галактозидаза



Флюорохромная среда (Merck)



**Цвет
среды
сине-
зеленый**

**КОЛИФОРМЫ
 β -D**



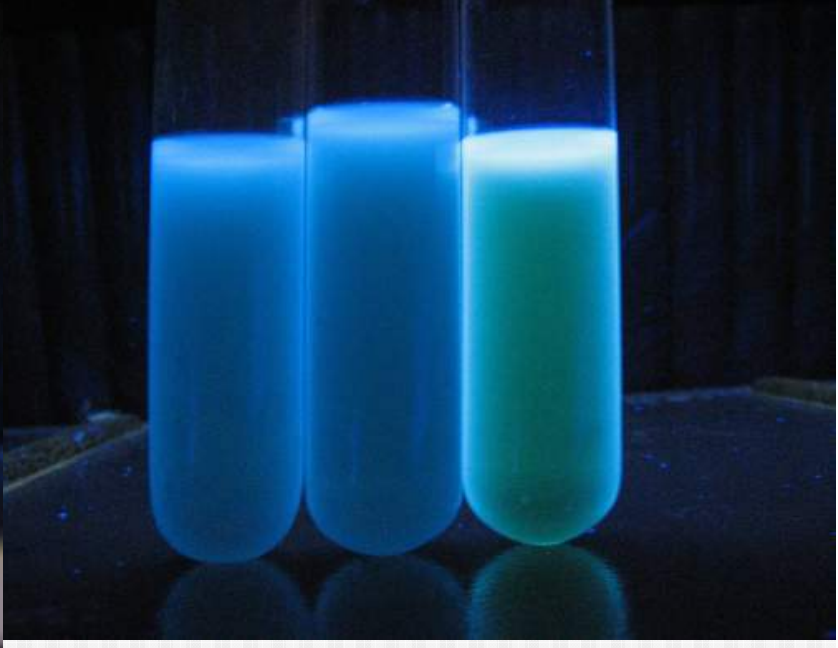
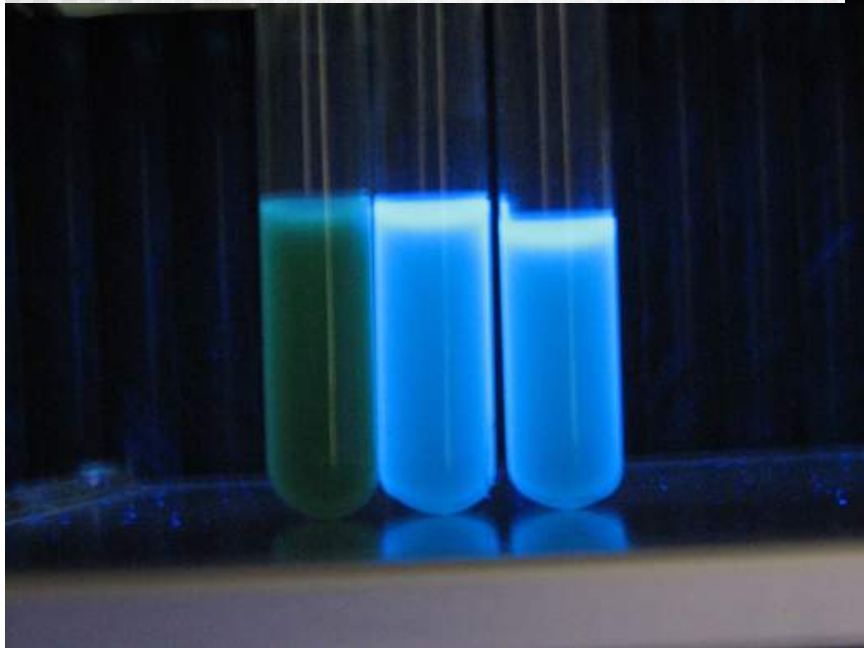
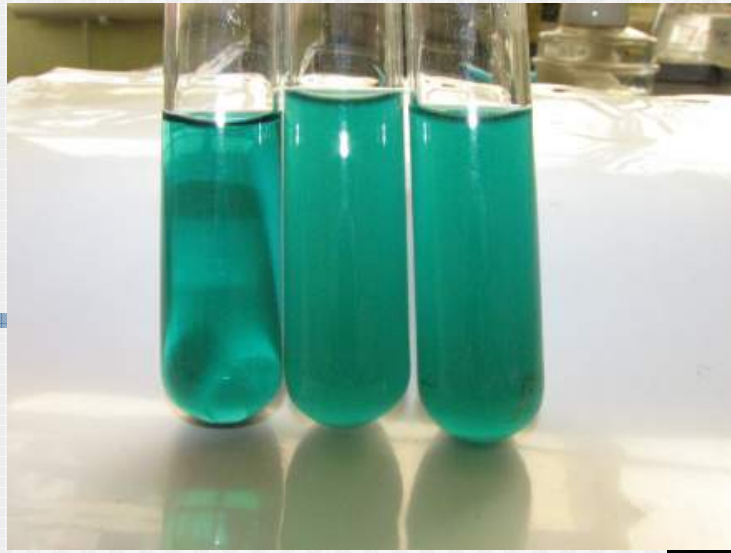
**Флюоресценция
среды**

***E. coli*
 β -D-глюкуронидаза**

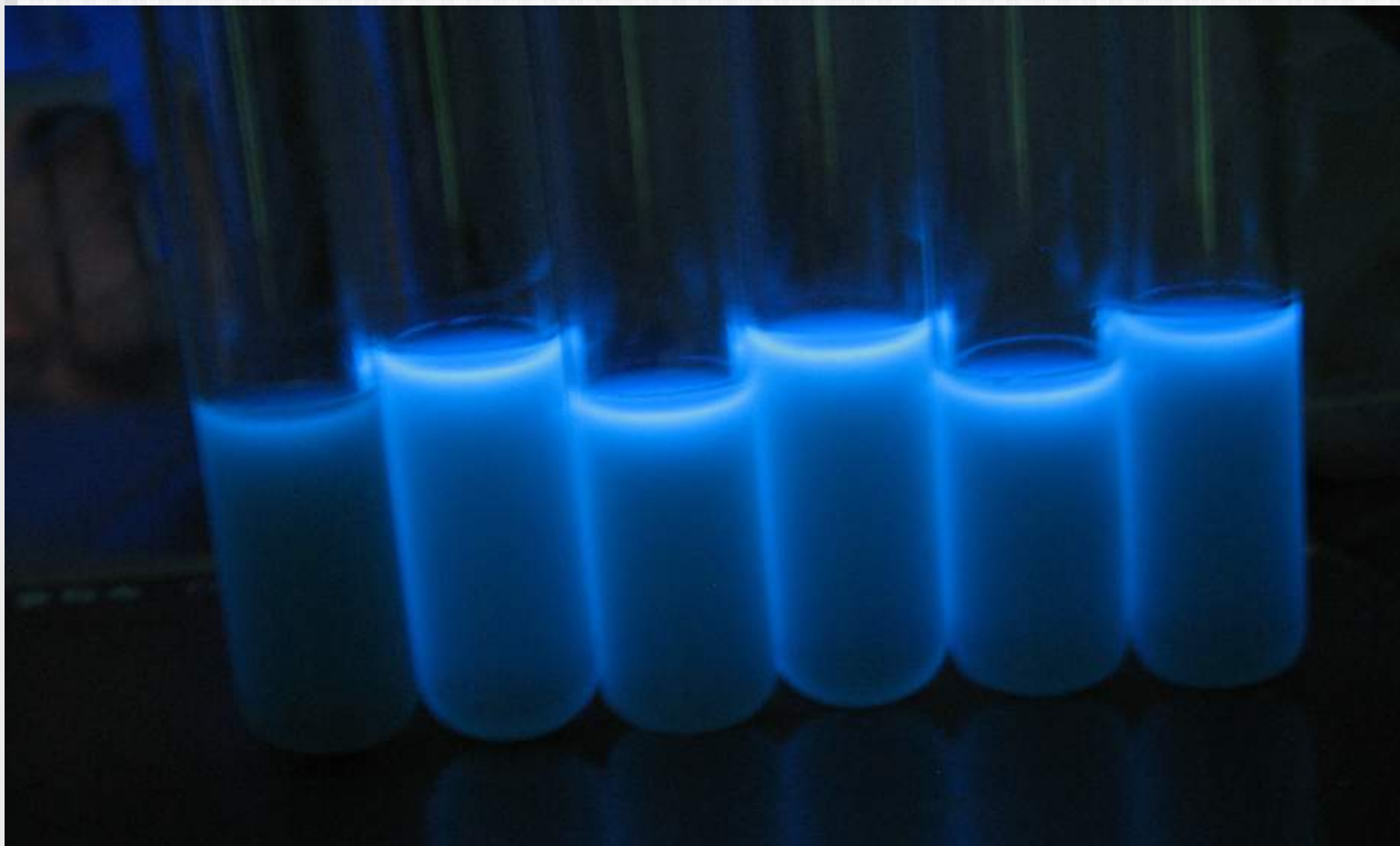


**Тест на индол
99%**

***E. coli*
Триптофаназа**



Высев фекалий больных и носителей гемофильной инфекции



Микробиологический анализатор БакТрак 4300



SV-LAB

BacTrac 4000
Series

ТБ тест-набор для ускоренного определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*



- Чувствительность к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу.
- По способности *M.tuberculosis* восстанавливать нитраты в нитриты.
- В 2006 году проведены успешные госиспытания.
- Государственная регистрация декабрь 2007г.
- Сформировано ТЗ в ГНЦ ПМБ для организации производства

ТВ тест набор



- Тест на обнаружение роста *M.tuberculosis* по нитратредуктазному тесту

**■ *Спасибо за
внимание!***