2.1.6.27. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ

Активность антибиотиков определяют путем сравнения ингибирования роста чувствительных микроорганизмов под действием испытуемого образца антибиотика и соответствующего стандартного образца в определенной концентрации.

При определении антимикробной активности антибиотиков используют стандартные образцы, активность которых, установлена по отношению к Международному стандартному образцу (International Standard или International Reference Preparation).

Методика количественного определения должна быть разработана с учетом возможности проведения проверки пригодности математической модели, на которой основан расчет активности. Если выбрана модель параллельных прямых, две линии логарифмической зависимости «доза-ответ» (или преобразованный ответ) испытуемого образца и стандартного образца должны быть параллельны и линейны в диапазоне доз, используемых в расчётах. Выполнение этих условий должно быть подтверждено при установленном уровне значимости, обычно p=0,05. Другие математические модели (модель углового коэффициента) могут быть использованы при условии доказательства их пригодности.

Доверительные интервалы (P=0,95) определения активности составляют не менее 95 % и не более 105 % рассчитанной активности, если иное не указано в частной фармакопейной статье.

Испытание проводят методом 1 или методом 2.

МЕТОД 1. ДИФФУЗИЯ В АГАР

Среду, подходящую для условий испытания, расплавляют, инокулируют при подходящей температуре, например, для вегетативных форм - от 48 °C до 50 °C, для суспензии спор – допустимо до 70 °C, известным количеством тест-микроорганизмов, чувствительных к испытуемому антибиотику. Количество тест-микроорганизмов должно быть таковым, чтобы при всех концентрациях антибиотика, используемых в испытании, образовались чётко определяемые зоны ингибирования подходящего диаметра. Инокулированную среду немедленно разливают в чашки Петри или большие прямоугольные чашки в количестве, подходящем для формирования равномерного слоя толщиной от 2 мм до 5 мм. Допустимо использование среды, состоящей из двух слоев, при этом инокулируют только верхний слой.

Чашки хранят таким образом, чтобы не происходило заметного роста или гибели тест-микроорганизмов до их использования. При использовании поверхность среды должна быть сухой.

Готовят растворы сравнения (стандартного образца) и испытуемого образца с известными концентрациями и предполагаемой одинаковой активностью, используя растворители и буферные растворы, представленные в таблице номер.-1. Растворы наносят на поверхность среды, например, внутри стерильных цилиндров из фарфора, нержавеющей стали или другого подходящего материала, или в лунки, подготовленные в толще агара. В каждый цилиндр или лунку прибавляют одинаковые объёмы раствора.

В качестве альтернативы возможно использование стерильных впитывающих бумажных дисков подходящего качества. Диски пропитывают растворами сравнения или растворами испытуемого образца и помещают на поверхность агара.

Таблица номер- 1. – *Метод диффузии в агар*

Антибиотик	Стандартный образец	Растворитель для приготовления основного раствора	Буферный раствор (pH)	Микроорганизм	Среда и конечное значение pH (±0,1 единицы pH)	Температура инкубации
Амфотерицин B	*СО ФЕАЭС Амфотерицина B для микробиологического анализа*	*Диметилсульфоксид P*	pH 10,5 (0,2 M)	*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 IP 1432-83	F - pH 6,1	От 35 °C до 37 °C
Бацитрацин цинка	*СО ФЕАЭС Бацитрацина цинка*	*0,01 M хлороводородная кислота*	pH 7,0 (0,05 M)	*Micrococcus luteus* NCTC 7743 CIP 53.160 ATCC 10240	A - pH 7,0	От 35 °C до 39 °C
Блеомицина сульфат	*СО ФЕАЭС Блеомицина сульфата*	*Вода P*	pH 6,8 (0,1 M)	*Mycobacterium smegmatis* ATCC 607	G - pH 7,0	От 35 °C до 37 °C
Ванкомицина гидрохлорид	*СО ФЕАЭС Ванкомицина гидрохлорида*	*Вода P*	pH 8,0	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	A - pH 8,0	От 37 °C до 39 °C
Гентамицина сульфат	*СО ФЕАЭС Гентамицина сульфата*	*Вода P*	pH 8,0 (0,05M)	*Bacillus pumilus NCTC 8241 CIP 76.18* *Staphylococcus epidermidis NCIMB 8853 CIP 68.21 ATCC 12228*	A - pH 7,9 A - pH 7,9	От 35 °C до 39 °C От 35 °C до 39 °C
Джозамицин	*СО ФЕАЭС Джозамицина*	*Метанол P**	pH 5,6	*Bacillus subtilis* CIP 52.62 ATCC 6633	A - pH 6,6	От 35 °C до 37 °C

				NCTC 10400		
Джозамицина пропионат	*СО ФЕАЭС Джозамицина пропионата*	*Метанол Р**	pH 5,6	*Bacillus subtilis* CIP 52.62 ATCC 6633 NCTC 10400	A - pH 6,6	От 35 °C до 37 °C
Канамицина моносульфат Сульфат канамициновой кислоты	*СО ФЕАЭС Канамицина моносульфата*	*Вода Р*	pH 8,0 (0,05 M)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53,156 ATCC 6538 P	A - pH 7,9 A - pH 7,9	От 30 °C до 37 °C От 35 °C до 39 °C
Колистиметат натрия	*СО ФЕАЭС Колистиметата натрия*	*Вода Р*	pH 6,0 (0,05 M)	*Bordetella bronchiseptica* NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617 *Escherichia coli* NCIMB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	B - pH 7,3 B - pH 7,3	От 35 °C до 39 °C От 35 °C до 39 °C
Колистин сульфат	*СО ФЕАЭС Колистина сульфата для микробиологического анализа*	*Вода Р*	pH 6,0 (0,05 M)	*Bordetella bronchiseptica* NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617 *Escherichia coli* NCIMB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	B - pH 7,3 B - pH 7,3	От 35 °C до 39 °C От 35 °C до 39 °C

Нистатин	*СО ФЕАЭС Нистатина*	*Диметилформамид Р*	pH 6,0 (0,05 М), содержащий *5 % (об/об) диметилформамид Р*	*Candida tropicalis* CIP 1433-83 NCYC 1393 *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 87 CIP 1432-83 ATCC 9763	F - pH 6,0 F - pH 6,0	От 30 °С до 37 °С От 30 °С до 32 °С
Неомицина сульфат	*СО ФЕАЭС Неомицина сульфата для микробиологического анализа*	*Вода Р*	pH 8,0 (0,05 М)	*Bacillus pumilus* NCTC 8241 CIP 76.18 *Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	E - pH 7,9 E - pH 7,9	От 30 °С до 37 °С От 30 °С до 37 °С
Нетилмицина сульфат	*СО ФЕАЭС Нетилмицина сульфата*	*Вода Р*	pH 8,0±0,1	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P CIP 53.156	A - pH 7,9	От 32 °С до 35 °С
Полимиксина В сульфат	*СО ФЕАЭС Полимиксина В сульфата для микробиологического анализа*	*Вода Р*	pH 6,0 (0,05 М)	*Bordetella bronchiseptica* NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617	B - pH 7,3	От 35 °С до 39 °С
Рифамицин натрия	*СО ФЕАЭС Рифамицина натрия*	*Метанол Р*	pH 7,0 (0,05 М)	*Micrococcus luteus* NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341	A - pH 6,6	От 35 °С до39 °С
Спирамицин	*СО ФЕАЭС Спирамицина*	*Метанол Р*	pH 8,0 (0,05 М)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	A - pH 7,9	От 30 °С до 32 °С

Стрептомицина сульфат	*СО ФЕАЭС Стрептомицина сульфата*	*Вода Р*	pH 8,0 (0,05 М)	*Bacillus subtilis* NCTC 8236 CIP 1.83 *Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	A - pH 7,9 A - pH 7,9	От 30 °С до 37 °С От 30 °С до 37 °С
Тейкопланин	*СО ФЕАЭС Тейкопланина*	Буферный раствор с pH 6,0 (0,05 М)	pH 6,0 (0,05 М)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	H - pH 7,8-8,0	От 35 °С до 37 °С
Тилозин для ветеринарного применения Тилозин фосфат для ветеринарного применения Тилозин тартрат для ветеринарного применения	*СО ФЕАЭС Тилозина*	2,5 % *об/об* раствор *метанола Р* в *0,1 М фосфатном буферном растворе pH 7,0*	смесь 40 объёмов *метанола Р* и 60 объёмов *0,1 М фосфатного буферного раствора pH 8,0*	*Micrococcus luteus* NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341	A - pH 8,0	От 32 °С до 35 °С
Фрамицетина сульфат	*СО ФЕАЭС Фрамицетина сульфата*	*Вода Р*	pH 8,0 (0,05 М)	*Bacillus subtillis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 *Bacillus pumilus* NCTC 8241 CIP 76.18	E - pH 7,9 E - pH 7,9	От 30 °С до 37 °С От 30 °С до 37 °С
Примечание - *подготовку испытуемого образца проводят в соответствии с указаниями в частной фармакопейной статье.						

Для подтверждения достоверности количественного определения используют не менее трёх растворов сравнения и трёх растворов испытуемого образца, имеющих предположительно одинаковую активность. Предпочтительно использовать серию разведений в геометрической прогрессии. Если линейность была подтверждена на достаточном количестве трёхдозовых испытаний, допустимо двухдозовое проведение испытаний по согласованию и разрешению уполномоченного органа. Во всех спорных случаях необходимо проводить трёхдозовые испытания

Расположение растворов на поверхности агара в каждой чашке осуществляют в соответствии с приемлемым статистическим планом. Следует учесть, что в маленьких чашках Петри помещают не более шести растворов. Растворы испытуемого образца и растворы сравнения размещают поочередно, таким образом, что бы избежать взаимного влияния более концентрированных растворов.

Чашки инкубируют при подходящей температуре около 18 ч. Рекомендуется использовать предварительную диффузию при комнатной температуре или, при необходимости, при температуре 4 °С в течение определенного промежутка времени, обычно от 1 ч до 4 ч. Такой подход используют для уменьшения влияния разницы во времени между внесением растворов, используемых в испытании, и получения более точного значения углового коэффициента линейной регрессии.

Измеряют диаметры с точностью до 0,1 мм или площади круглых зон ингибирования с точностью до 0,01 мм^2 и рассчитывают активность антибиотика, используя соответствующие статистические методы.

Используют в каждом испытании количество повторений на дозу, достаточное для обеспечения требуемой точности и прецизионности. При проведении повторных испытаний все результаты объединяют статистически, чтобы получить требуемую точность и прецизионность. Активность испытуемого образца должна быть не менее требуемого минимума (для активной фармацевтической субстанции) или соответствовать установленному диапазону (для лекарственных препаратов).

МЕТОД 2. ТУРБИДИМЕТРИЯ

Среду, подходящую для испытания, инокулируют определенным количеством тест-микроорганизма, чувствительного к испытуемому антибиотику, что бы обеспечить в условиях испытания достаточно сильное подавление роста микроорганизмов. Используют известное количество суспензии, выбранное таким образом, чтобы получить легко измеримое помутнение после инкубационного периода около 4 ч.

Инокулированную среду используют сразу после её приготовления.

Готовят растворы сравнения (стандартного образца) и растворы испытуемого образца с известными концентрациями и предполагаемой равной активностью, используя растворители и буферные растворы, представленные в таблице номер.-2.

Для оценки пригодности используют не менее трёх растворов стандартного образца и трёх растворов испытуемого образца, с предполагаемой равной активностью. Предпочтительно использовать разведения в геометрической прогрессии.

Равные объёмы каждого из растворов помещают в одинаковые пробирки и прибавляют равные объёмы инокулируемой среды (например, 1 мл испытуемого раствора и 9 мл среды). Для определения тиротрицина прибавляют 0,1 мл раствора к 9,9 мл инокулированной среды.

Одновременно готовят две контрольные пробирки с инокулированной средой без добавления антибиотика. В одну из пробирок немедленно прибавляют 0.5 мл *формальдегида Р*. Данные пробирки используют для настройки оптического прибора, применяемого для контроля роста микроорганизмов.

Таблица номер -2. –*Турбидиметрический метод*

Антибиотик	Стандартный образец	Растворитель для приготовления основного раствора	Буферный раствор (pH)	Микроорганизм	Среда и конечный pH (±0,1 единицы pH)	Температура инкубации
Ванкомицина гидрохлорид	*СО ФЕАЭС Ванкомицина гидрохлорида*	*Вода Р*	pH 8,0	*Staphylococcus aureus* CIP 53.156 ATCC 6538 P	С – pH 7,0	От 37 °С до 39 °С
Гентамицина сульфат	*СО ФЕАЭС Гентамицина сульфата*	*Вода Р*	pH 7,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С – pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Грамицидин	*СО ФЕАЭС Грамицидина*	*Метанол Р**	pH 7,0	*Enterococcus hirae* CIP 58.55 ATCC 10541 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P	С – pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Джозамицин	*СО ФЕАЭС Джозамицина*	*Метанол Р***	pH 5,6	*Staphylococcus aureus* CIP 53.156 ATCC 6538 P NCTC 7447	С - pH 8,0	От 35 °С до 37 °С
Джозамицина пропионат	*СО ФЕАЭС Джозамицина пропионата*	*Метанол Р***	pH 5,6	*Staphylococcus aureus* CIP 53.156 ATCC 6538 P NCTC 7447	С - pH 8,0	От 35 °С до 37 °С

Канамицина моносульфат Сульфат канамициновой кислоты	*СО ФЕАЭС Канамицина моносульфата*	*Вода Р*	pH 8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С - pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Колистиметат натрия	*СО ФЕАЭС Колистиметата натрия*	*Вода Р*	pH 7,0	*Escherichia coli* NCIMB 8666 CIP 2.83 ATCC 9637	С - pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Колистина сульфат	*СО ФЕАЭС Колистина сульфата для микробиологи-ческого анализа*	*Вода Р*	pH 7,0	*Escherichia coli* NCIMB 8666 CIP 2.83 ATCC 9637	С - pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Неомицина сульфат	*СО ФЕАЭС Неомицина сульфата для микробиологи-ческого анализа*	*Вода Р*	pH 8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С - pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Рифамицин натрия	*СО ФЕАЭС Рифамицина натрия*	*Метанол Р*	pH 7,0	*Escherichia coli* NCIMB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	С - pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Спирамицин	*СО ФЕАЭС Спирамицина*	*Метанол Р*	pH 7,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С - pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Стрептомицина сульфат	*СО ФЕАЭС Стрептомицина сульфата*	*Вода Р*	pH 8,0	*Klebsiella pneumoniae* NCTC 7427 CIP 53.153	С – pH 7,0	От 35 °С до 37 °С

				ATCC 10031		
Тилозин для ветеринарного применения Тилозин тартрат для ветеринартного применения	*СО ФЕАЭС Тилозина*	2,5 % *об/об* раствор *метанола Р* в *0,1 М фосфатном буферном растворе pH 7,0*	pH 7,0	*Micrococcus luteus* NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341	С – pH 7,0	37 °С
Тиротрицин	*СО ФЕАЭС Грамицидина*	*Этанол Р*	*Этанол Р*	*Enterococcus hirae* ATCC 10541	С - pH 7,0	37 °С
Фрамицетина сульфат	*СО ФЕАЭС Фрамицетина сульфата*	*Вода Р*	pH 8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	С - pH 7,0	От 35 °С до 37 °С
Примечание – *- для предотвращения адсорбции материала в ходе разбавления может оказаться необходимым прибавление детергента, например, *полисорбата 80 Р* в концентрации 0,1 мг/мл. ** - подготовку испытуемого образца проводят в соответствии с указаниями в частной фармакопейной статье.						

В соответствии с подходящей схемой пробирки помещают в водяную баню или в другое подходящее устройство, позволяющее быстро довести температуру всех пробирок до соответствующей температуры инкубации; выдерживают при этой температуре в течение от 3 ч до 4 ч, обеспечивая однородность температурного режима и одинаковое время инкубации. В качестве подходящих схем используют «полную рандомизацию», или «латинский квадрат», или «рандомизированные (случайные) блоки».

После инкубации рост тест-микроорганизмов останавливают прибавлением во все пробирки 0,5 мл *формальдегида Р* или подвергнув их термической обработке. Затем измеряют степень мутности суспензии тест-микроорганизмов до третьего знака с помощью подходящего оптического прибора. В качестве альтернативы допускается использование метода, позволяющего измерять степень мутности в каждой пробирке по окончании одинаковых периодов инкубации. Рассчитывают антимикробную активность, используя подходящие статистические методы.

Зависимость «доза-ответ», преобразованная или не преобразованная, является линейной в ограниченном диапазоне доз. Этот диапазон используют при расчёте активности испытуемого образца. Диапазон должен включать не менее трёх последовательных доз для проверки линейности.

Когда линейность продемонстрирована в достаточном количестве трёхдозовых испытаний, допустимо двухдозовое проведение испытаний по согласованию и разрешению уполномоченного органа. Во всех спорных случаях проводят трёхдозовые испытания.

Используют в каждом испытании количество повторений на дозу, достаточное для обеспечения требуемой точности и прецизионности. Испытание повторяют, результаты объединяют статистически, чтобы получить требуемую точность и прецизионность. Активность испытуемого образца не должна быть меньше установленного требования.

Следующий раздел приводится для информации.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

В данном разделе описаны рекомендуемые тест-микроорганизмы и условия инокуляции. Другие тест-микроорганизмы могут быть использованы при условии, что они чувствительны к испытуемому антибиотику и используются в соответствующих средах и при соответствующих условиях температуры и pH.

Концентрации полученных растворов следует выбирать таким образом, чтобы в испытании присутствовала линейная зависимость «доза-ответ».

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИНОКУЛЯТА

Bacillus cereus* var *mycoides; Bacillus subtillis; Bacillus pumilus. Суспензию спор микроорганизмов для использования в качестве инокулята готовят следующим образом. Выращивают тест-микроорганизмы при температуре от 35° С до 37 °С в течение 7 сут. на поверхности подходящей среды, к которой прибавляют 0,001 г/л *марганца(II) сульфата Р*. Для смыва выросшей биомассы, состоящей в основном из спор, используют стерильную *воду Р.* Нагревают суспензию при температуре 70 °С в течение 30 мин и разбавляют до получения соответствующей концентрации спор, обычно от 10×10^6 до 100×10^6 на миллилитр. Споровые суспензии могут хранить длительное время при температуре не выше 4 °С.

В качестве альтернативы споровые суспензии могут быть приготовлены путём культивирования микроорганизмов в среде С (таблица номер- 3.) при температуре 26 °С в течение от 4 сут до 6 сут, затем прибавляют в асептических условиях достаточное количество *марганца(II) сульфата Р* для получения концентрации 0,001 г/л и инкубируют в течение ещё 48 ч. Изучают суспензию под микроскопом, для выявления подходящего

образования спор (около 80 %), центрифугируют. Ресуспендируют осадок в стерильной *воде Р* до получения концентрации от 10×10^6 до 100×10^6 спор на миллилитр, затем нагревают до 70 °С в течение 30 мин. Суспензию хранят при температуре не выше 4 °С.

Bordetella bronchiseptica. Выращивают тест-микроорганизм на питательной среде В (таблица номер – 3.) при температуре от 35° С до 37 °С в течение от 16 ч до 18 ч. Для смыва выросшей биомассы, используют стерильную *воду Р,* затем разбавляют до подходящей мутности.

Staphylococcus aureus; Klebsiella pneumonia, Escherichia coli; Micrococcus luteus; Staphylococcus epidermidis. Выращивают тест-микроорганизм на питательной среде А (таблица номер.- 3.) при температуре от 35° С до 37 °С в течение от 16 ч до 18 ч.

Смывают выросшую биомассу бактерий стерильной *водой Р* и разбавляют до подходящей мутности, которая показывает удовлетворительное соотношение «доза-ответ» в турбодиметрическом методе или даёт чётко определённые зоны ингибирования подходящего диаметра в методе диффузии в агар.

Saccharomyces cerevisiae; Candida tropicalis. Тест – микроорганизм выращивают на питательной среде F (таблица номер.- 3.) при температуре 30° С до 37 °С в течение 24 ч. Смывают выросшую биомассу бактерий стерильным раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*. Разбавляют до подходящей мутности тем же раствором.

БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

Для приготовления буферных растворов со значением pH от 5,8 до 8,0 смешивают 50,0 мл *калия дигидрофосфата 0,2 М раствор Р* с количеством *0,2 М раствора натрия гидроксида,* указанным в таблице номер.-4. и доводят свежеприготовленной *водой дистиллированной Р* до объёма 200,0 мл.

Таблица номер. -4. – *Буферные растворы*

pH	*0,2 М раствор натрия гидроксида* **(мл)**
5,8	3,72
6,0	5,70
6,2	8,60
6,4	12,60
6,6	17,80
6,8	23,65
7,0	29,63
7,2	35,00
7,4	39,50
7,6	42,80
7,8	45,20
8,0	46,80

Данные буферные растворы используют для всех микробиологических испытаний, представленных в таблице. номер-1., кроме амфотерицина В и блеомицина сульфата.

Для блеомицина сульфата готовят буферный раствор pH 6,8. Растворяют 6,4 г *калия дигидрофосфата Р* и 18,9 г *динатрия гидрофосфата додекагидрата Р* в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

Для амфотерицина В готовят 0,2 М фосфатный буферный раствор pH 10,5 . Растворяют 35 г *дикалия гидрофосфата Р* в 900 мл *воды Р,* прибавляют 20 мл *1 М*

раствор натрия гидроксида и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Можно использовать следующие питательные среды или эквивалентные среды.

Среда А

Пептон	6 г
Панкреатический перевар (гидролизат) казеина	4 г
Экстракт говядины	1,5 г
Дрожжевой экстракт	3 г
Глюкозы моногидрат	1 г
Агар	15 г
Вода	До 1000 мл

Среда В

Панкреатический перевар (гидролизат) казеина	17 г
Папаиновый перевар (гидролизат) соевых бобов	3 г
Натрия хлорид	5 г
Дикалия гидрофосфат	2,5 г
Глюкозы моногидрат	2,5 г
Агар	15 г
Полисорбат 80	10 г
Вода	До 1000 мл

Полисорбат 80 добавляют к горячему раствору других ингредиентов после кипячения и непосредственно перед доведением до объёма.

Среда С

Пептон	6 г
Экстракт говядины	1,5 г
Дрожжевой экстракт	3 г
Натрия хлорид	3,5 г
Глюкозы моногидрат	1 г
Дикалия гидрофосфат	3,68 г
Калия дигидрофосфат	1,32 г
Вода	До 1000 мл

Среда D

Экстракт сердца	1,5 г
Дрожжевой экстракт	1,5 г
Пептон-казеин	5 г
Глюкозы моногидрат	1 г
Натрия хлорид	3,5 г
Дикалия гидрофосфат	3,68 г
Калия дигидрофосфат	1,32 г
Калия нитрат	2 г
Вода	До 1000 мл

Среда Е

Пептон	5 г
Мясной экстракт	3 г
Динатрия гидрофосфат додекагидрат	26,9 г
Агар	10 г
Вода	До 1000 мл

Динатрия гидрофосфат додекагидрат добавляют в виде стерильного раствора после стерилизации среды.

Среда F

Пептон	9,4 г
Дрожжевой экстракт	4,7 г
Экстракт говядины	2,4 г
Натрия хлорид	10,0 г
Глюкозы моногидрат	10,0 г
Агар	23,5 г
Вода	До 1000 мл

Среда G

Глицерин	10 г
Пептон	10 г
Мясной экстракт	10 г
Натрия хлорид	3 г
Агар	15 г
Вода	До 1000 мл

pH 7,0±0,1 после стерилизации

Среда H

Пептон	5,0 г
Агар	15,0 г
Порошок экстракта говядины	3,0 г
Вода	До 1000 мл

pH 7,8-8,0 доводят 0*,1 М раствором натрия гидроксида*