

Юнусова Р.Ю.¹, Горелова В.Г.², Комбарова С.Ю.¹, Алешкин А.В.¹, Ефимова О.Г.¹, Бичучер А.М.¹,
Мартыненко И.Г.¹, Алиева Э.Р.²

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ЭНДО ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

¹ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ГБОУ ВПО Дагестанская государственная медицинская академия Минздрава РФ, 367016, Махачкала, Россия

Совершенствование традиционной питательной среды Эндо с целью подавления «роения» Proteus vulgaris и Proteus mirabilis. Объектом исследования служила коммерческая сухая среда Эндо. Посев референс-штаммов энтеробактерий и клинического материала (кал, моча, мокрота) проводили в соответствии с нормативными документами. Показано, что внесение в среду Эндо триптофана и натриевых солей желчных кислот в определенном соотношении их концентраций подавляло «роение» P. vulgaris и P. mirabilis. Полученные результаты показали, что использование усовершенствованной среды Эндо значительно повышает её дифференциальные и диагностические свойства.

Ключевые слова: среда Эндо; энтеробактерии; триптофан; натриевые соли желчных кислот; феномен «роения» P. vulgaris и P. mirabilis.

Для цитирования: Юнусова Р.Ю., Горелова В.Г., Комбарова С.Ю., Алешкин А.В., Ефимова О.Г., Бичучер А.М., Мартыненко И.Г., Алиева Э.Р. Совершенствование питательной среды Эндо для выявления и идентификации энтеробактерий. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 110-113

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-110-113>

Yunusova R.Yu.¹, Gorelova V.G.², Kombarova S.Yu.¹, Aleshkin A.V.¹, Efimova O.G.¹, Bichucher A.M.¹, Martynenko I.G.¹, Alieva E.R.²

THE DEVELOPMENT OF ENDO GROWTH MEDIUM FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIA

¹The Federal Budget Institution of Science "G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology" of Rospotrebnadzor of Russia, 125212, Moscow, Russia

²The State Budget Educational Institution of Higher Professional Education "The Dagestan State Medical Academy" of Minzdrav of Russia, 367016 Makhachkala, Russia

The purpose of study is to develop a traditional Endo's growth medium with the view of suppression of swarming of Proteus vulgaris and Proteus mirabilis. The object of study was a commercial dry Endo's growth medium. The inoculation of reference strains of enterobacteria and clinical sample (feces, urine, phlegm) was implemented according the normative documents. It is demonstrated that brining into Endo's growth medium tryptophan and sodium salts of bile acids in a particular ratio of their concentrations suppressed swarming of Proteus vulgaris and Proteus mirabilis. The obtained results demonstrated that application of enhanced Endo's growth medium significantly increases its differential and diagnostic characteristics.

Key words: Endo's growth medium; enterobacteria; tryptophan; sodium salts of bile acids; phenomenon of "swarming" of P. vulgaris and P. mirabilis.

For citation: Yunusova R.Yu., Gorelova V.G., Kombarova S.Yu., Aleshkin A.V., Efimova O.G., Bichucher A.M., Martynenko I.G., Alieva E.R. The development of Endo growth medium for detection and identification of enterobacteria. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(2): 110-113. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-110-113>

For correspondence: Yunusova R.Yu., candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of coccal infections of the Federal Budget Institution of Science "G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology", e-mail: proteika@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 16.10.2017
Accepted 20.10.2017

Введение. Выделение и идентификация микроорганизмов на питательных средах остаётся золотым стандартом и имеет важное значение и широкую область применения в микробиологии. Дифференциально-диагностические питательные среды, используемые при идентификации микроорганизмов, должны обе-

спечивать высокую специфичность, выделение культуры бактерий в максимально возможные короткие сроки, простоту, доступность и воспроизводимость результатов анализов.

Значительную часть регулярных исследований бактериологов, решающих задачи клинической и санитарной микробиологии, составляет лабораторная диагностика заболеваний, вызванных патогенными и условно-патогенными энтеробактериями, и санитарно-эпидемиологический мониторинг энтеро-

Для корреспонденции: Юнусова Раисат Юнусовна, канд. биол. наук, ст.науч.сотр. лаборатории кокковых инфекций; e-mail: proteika@mail.ru

бактерий в объектах внешней среды и в пищевых продуктах [1–3]. Основная питательная среда при этиологической диагностике энтеробактерий – Эндо.

Среда Эндо – это традиционная дифференциально-диагностическая питательная среда, которая позволяет дифференцировать прежде всего, лактозоположительные и лактозоотрицательные энтеробактерии. Разработанная в 1905 г., она остаётся наиболее часто применяемой в клинической микробиологии для первичного посева исследуемого материала с целью выявления патогенных¹ и условно-патогенных энтеробактерий².

В связи с широким применением среды Эндо описывают во всех руководствах и учебных пособиях по практической микробиологии, каталогах питательных сред [4, 5]. Однако на протяжении более 100 лет учёным-микробиологам не удалось устранить главный недостаток этой среды – «роение» протеев. В случае наличия в исследуемой микробной ассоциации «роящихся» форм протеев (*P. vulgaris* и *P. mirabilis*) на среде Эндо невозможно выделить изолированные колонии микроорганизмов, а также произвести подсчёт числа выросших колоний, вследствие образования сплошной плёнки протеев на поверхности [6]. Эта ситуация значительно усложняет трудоёмкость исследований из-за невозможности выделить изолированные колонии в случае присутствия в микробной ассоциации протеев.

Для подавления «роения» протеев обычно используют различные химические вещества. Однако они, препятствуя «роению» протеев, могут ингибировать и рост выделяемых микроорганизмов. Известна модификация, содержащая электролит-дефицитную питательную основу с минимальным составом минеральных веществ, которая снимает этот недостаток [7]. В Российской Федерации питательные среды на электролит-дефицитной основе были разработаны, но не выпускались из-за очень большой трудоёмкости в приготовлении и высокой стоимости [8].

В связи с этим усовершенствование традиционной питательной среды Эндо с целью устранения её основного недостатка – «роения» *P. vulgaris* и *P. mirabilis* – актуальная задача для лабораторной службы.

Цель исследования – совершенствование среды Эндо для ускорения идентификации энтеробактерий.

Материал и методы. В работе использовали коммерческую питательную среду, сухую – среду Эндо, 10 референс-штаммов энтеробактерий и один штамм *Staphylococcus aureus*, полученных в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (перечислены в таблице), а также 210 образцов клинического материала (кал, моча, мокрота). Посев референс-штаммов проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08³. Посев кли-

нического материала – в соответствии с Приказом МЗ СССР №535⁴.

Результаты и обсуждение. Приступая к исследованиям, мы основывались на обнаруженном ранее свойстве L-триптофана связываться с родоспецифическим ферментом протеев – триптофандезаминазой [9]. Было показано, что при посеве референс-штаммов *P. mirabilis* 3177 и *P. vulgaris* Hx19 222 на среду Эндо, которая дополнительно содержала L-триптофан в количестве 7 г/л, колонии протеев окрашивались в вишнёво-коричневый цвет с таким же преципитатом вокруг колоний и вырастали в О-Н форме.

Первым этапом настоящих экспериментальных исследований были клинические испытания среды Эндо, описанной в указанной ранее статье, с использованием референс-штаммов и с использованием клинического материала, полученного от пациентов (моча, мокрота, кал). Было установлено, что данная среда, ингибируя «роение» референс-штаммов протеев, не подавляет «роение» клинических штаммов *P. vulgaris* и *P. mirabilis*.

С целью исключения «роения» клинических штаммов *P. vulgaris* и *P. mirabilis* было изучено влияние L-триптофана и натриевых солей желчных кислот, комплексно введённых в состав среды Эндо, при использовании их различных концентраций и в различных сочетаниях.

В результате серии экспериментов определены оптимальные концентрации L-триптофана и натриевых солей желчных кислот, при которых исключается «роение» клинических штаммов *P. vulgaris* и *P. mirabilis* (растут в О-Н-форме). Благодаря продукции высокоспецифичного фермента протеев – триптофандезаминазы, они вырастают на среде в виде колоний вишнёво-коричневого цвета с вишнёво-коричневым преципитатом. Идентификация протеев на предлагаемой среде осуществляется одновременно с их выделением, т. е. одноэтапно.

Так, учет результатов показал, что через 18 ± 2 ч инкубации посевов при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ как на традиционной, так и на усовершенствованной среде Эндо при посеве микробной смеси референс-штаммов из разведения 10^{-6} , патогенные энтеробактерии (*S. typhimurium*, *S. flexneri*, *S. sonnei*) формируют бесцветные колонии диаметром от 1,5 до 2 мм в S-форме. Колонии условно-патогенных энтеробактерий (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. cloacae*) вырастают размером 2–2,5 мм, в S-форме, красного цвета, с металлическим блеском или без него на фоне бледно-розового цвета питательной среды.

На усовершенствованной среде Эндо колонии референс-штаммов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* из раз-

¹ Приказ МЗ СССР № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». М.: Медицина; 1985.

² СанПиН 2.3.2.1280-02. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Дополнения и изменения N 2 к СанПиН 2.3.2.1078-01- М.: Минздрав России; 2003.

³ Методы контроля бактериологических питательных сред. МУК 4.2.2316-08. М.: Минздрав России; 2008. 67с.

⁴ Приказ МЗ СССР № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». М.: Медицина; 1985.

Сравнительная характеристика дифференцирующих свойств среды Эндо и усовершенствованной среды Эндо

Референс-штаммы	Разведение	Среда Эндо		Усовершенствованная среда Эндо		
		лактоза	Цвет и форма колоний	лактоза	Триптофан (триптофандезаминаза)	Цвет и форма колоний
<i>Escherichia coli</i> Su 3912/41 O55 K:59	10 ⁻⁶	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3534/51	-/-	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Enterobacter cloacae</i> 10005	-/-	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	-/-	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Serratia marcescens</i> 1	-/-	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Proteus vulgaris</i> Hx19 222	-/-	-	Бесцветные R-форма, «роение»	-	+	Вишнёво-коричневые с таким же преципитатом, O-H форма
<i>Proteus mirabilis</i> 3177	-/-	-	Бесцветные R-форма, «роение»	-	+	Вишнёво-коричневые с таким же преципитатом, O-H форма
<i>Salmonella enterica typhimurium</i> 79	-/-	-	Бесцветные S-форма	-	-	Бесцветные, S-форма
<i>Shigella flexneri</i> 1a 8516	-/-	-	Бесцветные S-форма	-	-	Бесцветные, S-форма
<i>Shigella sonnei</i> 5063	-/-	-	Бесцветные S-форма	-	-	Бесцветные, S-форма
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	10 ⁻¹		Рост отсутствует			Рост отсутствует

ведения 10⁻⁶ вырастают в O-H форме (без «роения») вишнёво-коричневого цвета диаметром 2,5-3 мм с преципитатом вокруг колоний того же цвета. В то же время на традиционной среде Эндо при посеве референс-штаммов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* даже из разведения 10⁻⁷ на поверхности среды образуется сплошная слизистая плёнка бледно-розового цвета, препятствующая выделению и идентификации выросших бактерий, а также подсчёту их количества (см.таблицу).

Установлено, что, несмотря на внесение в среду натриевых солей желчных кислот, которые, как известно, используют для ингибирования роста лактозоположительных энтеробактерий, в частности *E. coli*, рост колиформных бактерий на усовершенствованной среде не задерживается.

Остальные характеристики традиционной среды Эндо сохраняются. Так, лактозоотрицательные энтеробактерии вырастают на среде бесцветными, лактозоположительные энтеробактерии благодаря присутствию в среде лактозы и фуксина окрашиваются в красный цвет. Грамположительные микроорганизмы подавляются при посеве из разведения 10⁻¹ вследствие присутствия в среде фуксина основного (рис. 1–5, см.обложку).

Следующим этапом экспериментальных исследований были клинические испытания усовершенствованной среды Эндо с использованием 210 образцов клинического материала, полученного от пациентов (моча, мокрота, кал). Роящиеся формы протеев (*P. vulgaris* и *P. mirabilis*) обнаружены в 15 образцах (7%). *P. vulgaris* выявлены в 11 образцах (5%), а *P. mirabilis* - 4 (2%). Установлено, что на оптимизированной среде ингибируется «роение» не только референс-штаммов протеев, но и клинических штаммов *P. vulgaris* и *P. mirabilis*.

Заключение. Введение в состав усовершенствованной среды Эндо определённого сочетания концентраций L-триптофана и натриевых солей желчных

кислот устраняет основной недостаток традиционной среды Эндо - «роение» *P. vulgaris* и *P. mirabilis*. Несмотря на то, что соли желчных кислот подавляют рост кишечной палочки, на разработанной среде поддерживается рост всех лактозоположительных энтеробактерий, в том числе *E. coli*. Кроме того, на усовершенствованной среде стало возможным с помощью родоспецифического фермента протеев - триптофандезаминазы одновременно с выделением идентифицировать по цвету все формы штаммов протеев (как роящиеся, так и нероящиеся). Разработанный состав среды обеспечивает чёткую дифференциацию энтеробактерий по цвету: патогенные энтеробактерии вырастают в виде бесцветных колоний, протеи вырастают в виде вишнёво-коричневых колоний с таким же преципитатом вокруг колоний, остальные условно-патогенные энтеробактерии - в виде красных колоний с металлическим блеском или без него.

Таким образом, усовершенствованная среда Эндо поддерживает рост всех энтеробактерий и имеет явные преимущества перед традиционной средой Эндо, поскольку позволяет одновременно с выделением патогенных и условно-патогенных энтеробактерий идентифицировать протеи по цвету и преципитату вокруг колоний, а также выделить культуру в чистом виде и провести точный количественный учёт выросших микроорганизмов, что особенно важно при клинических и санитарных исследованиях.

Результаты исследования позволяют рекомендовать усовершенствованную питательную среду Эндо для широкого использования в бактериологической практике. На усовершенствованную среду Эндо получен патент РФ [10].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.7 см. REFERENCES)

1. *Руководство по медицинской микробиологии. Кн. 2. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций.* Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М., ред. М.: Бином; 2015.
2. Шендеров Б.А. Функциональное и персональное питание. Современное состояние и перспектива. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* 2010; 2-3: 2-5.
3. *Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. Кн. 3. т. 1.* Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., ред. М.: Бином; 2013.
4. *Диагностические препараты. Каталог продукции ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора РФ.* Шепелин А.П., ред. Оболensk: А-Принт; 2017.
5. Меджидов М.М. *Справочник по микробиологическим питательным средам.* М.: Медицина; 2003.
6. Голубева И.В., Килессо В.А., Киселева Б.С., Прямухина Н.С., Татаринова С.Д., Хоменко Н.А. и др. *Энтеробактерии. Руководство для врачей.* Покровский В.И., ред. М.: Медицина; 1985.
8. Султанов З.З. Разработка и усовершенствование технологий получения микробиологических питательных основ и сред. Дисс. д-ра биол. наук. Махачкала; 2007.
9. Степанова Э.Д., Юнусова Р.Ю., Меджидов М.М., Горелова В.Г. Модификации питательных сред для выделения и идентификации клинически значимых условно патогенных микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2012; 2: 117-9.
10. Степанова Э.Д., Юнусова Р.Ю., Горелова В.Г., Рамазанова Э.Р., Комбарова С.Ю., Алешкин А.В. и др. *Модифицированная питательная среда Эндо для выявления и идентификации энтеробактерий.* Патент РФ № 2574210; 2016: 4.

REFERENCES

1. *Medical microbiology manual. Book 2. Special medical microbiology and etiological diagnostics of infections.* [Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Kn. 2. Chastnaya meditsinskaya mikrobiologiya i etiologicaleskaya diagnostika infektsij]. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., Ivanova S.M., eds. Moscow: Binom; 2015. (in Russian)

2. Shenderov B.A. Functional and personal diet. Current state and perspective. *Zhurnal gastrojenterologiya Sankt-Peterburga.* 2010; 2-3: 2-5. (in Russian)
3. *Medical Microbiology Manual. Opportunistic infections: pathogens and etiological diagnostics. Book. 3.* [Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Opportunisticheskie infektsii: vobuditeli i etiologicaleskaya diagnostika. Kniga 3. Tom 1]. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., eds. Moscow: Binom; 2013. (in Russian)
4. *Diagnostic preparations. Catalog of production FBIS SRC AMB.* [Diagnosticheskie preparaty. Katalog produktsii FBUN GNC PMB Rospotrebnadzora RF]. Shepelin A.P., ed. Obolensk: A-Print; 2017. (in Russian)
5. Medzhidov M.M. *Directory of microbiological media.* [Spravochnik po mikrobiologicheskim pitatel'nyim sredam]. Moscow: Meditsina; 2003. (in Russian)
6. Golubeva I.V., Kileso V.A., Kiseleva B.S., Pryamuhina N.S., Tatarinova S.D., Homenko N.A. et al. *Enterobacteriaceae: Manual for doctors.* [Enterobakterii: Rukovodstvo dlya vrachey]. Pokrovskiy V.I., ed. Moscow: Meditsina; 1985. (in Russian)
7. Sandys G.H. A new method of preventing swarming of *Proteus* spp. with a description of new medium suitable for use routine laboratory practice. *Medical Laboratory Technology.* 1960; 17: 224-33.
8. Sultanov Z.Z. Development and improvement of technologies for obtaining microbiological nutrient bases and media [Razrabotka i usovershenstvovanie tehnologiy polucheniya mikrobiologicheskikh pitatel'nyh osnov i sred]. Dis. Makhachkala; 2007. (in Russian)
9. Stepanova E.D., Yunusova R.Yu., Medzhidov M.M., Gorelova V.G. Modification of culture media for the isolation and identification of clinically significant opportunistic microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2012; 2: 117-9. (in Russian)
10. Stepanova E.D., Yunusova R.Yu., Gorelova V.G., Ramazanova E.R., Kombarova S.Yu., Aleshkin A.V. et al. *Modified Endo culture medium for detection and identification of enterobacteriaceae* [Modifitsirovannaya pitatel'naya sreda Endo dlya vyavleniya i identifikatsii enterobakteriy]. Patent RF № 2574210; 2016: 4. (in Russian)

Поступила 16.10.17
Принята к печати 20.10.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 614.2:616-022.7-084-078

Наумкина Е.В.^{1,2}, Матущенко Е.В.¹, Абросимова О.А.², Калитина И.И.², Соколова Т.Н.², Иванова С.Ф.², Пядочкина Т.В.²

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ КАК ОСНОВА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА И АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ В УСЛОВИЯХ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА

¹ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 644050, Омск, Россия;

²БУЗОО «Городской клинический перинатальный центр», 644007, Омск, Россия

При изучении особенностей микробиоты и антибиотикорезистентности возбудителей, выделяемых из биоматериала пациентов в условиях многопрофильного стационара, проведено микробиологическое исследование 6148 образцов с использованием оптимального набора методов (классические тесты, хромогенные среды, иммуносерологические, масс-спектрометрия Maldi-ToF). Антибиотикорезистентность определяли диско-диффузионным методом (EUCAST 2016, анализатор Adagio).

Ведущая роль в этиологии гнойно-воспалительных процессов принадлежит *E. coli*, коагулазонегативным стафилококкам, энтерококкам, *S. albicans*. В отделении гнойной хирургии лидируют *S. aureus*, условно-патогенные энтеробактерии, гемолитические стрептококки, НФГОМ. В отделении травматологии и ортопедии на 1-м месте оказались представители семейства энтеробактерий во главе с *E. coli*, далее следует золотистый стафилококк, а затем – другие виды микроорганизмов.

Для корреспонденции: Наумкина Елена Витальевна, д-р мед. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, зав. лаб. клин. микробиологии; e-mail: evn04@mail.ru



Рис. 1. Среда Эндо. Посев штрихом референс-штаммов *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis* (наличие сплошной пленки из-за «роения» *P. mirabilis*).

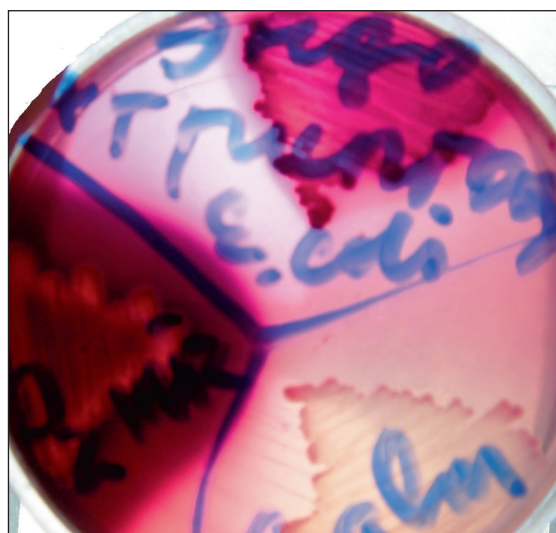


Рис. 2. Усовершенствованная среда Эндо. Посев штрихом референс-штаммов *E. coli* (красные колонии), *S. typhimurium* (бесцветные колонии), *P. mirabilis* (вишнево-коричневые с таким же преципитатом). Здесь и на рис. 3, 5: отсутствует пленка за счёт ингибирования «роения» *P. mirabilis*.

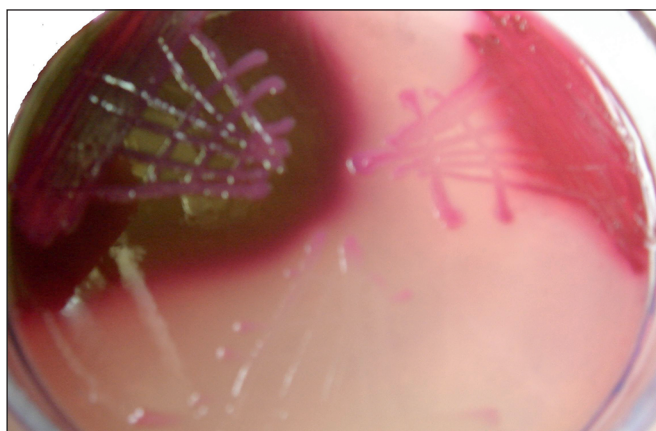


Рис. 3. Усовершенствованная среда Эндо. Посев штрихом референс-штаммов *E. coli* (красные колонии), *S. typhimurium* (бесцветные колонии), *P. mirabilis* (вишнево-коричневые с таким же преципитатом) (открытая чашка Петри).

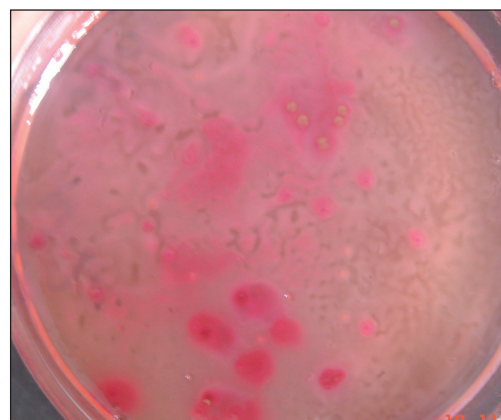


Рис. 4. Среда Эндо. Посев из разведения 10^{-6} референс-штаммов *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis* (наличие сплошной плёнки из-за «роения» *P. mirabilis*).

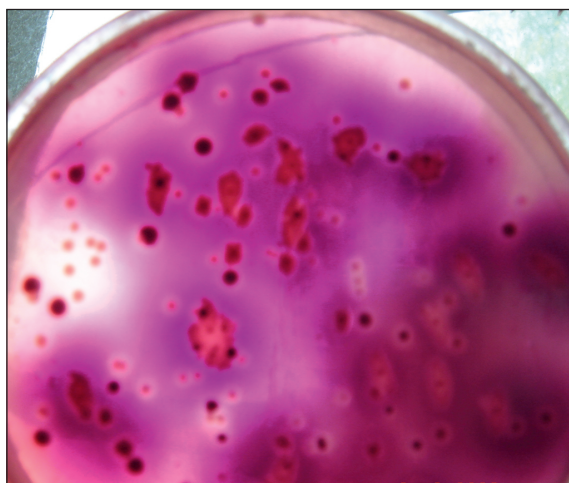


Рис. 5. Усовершенствованная среда Эндо. Посев из разведения 10^{-6} референс-штаммов *E. coli* (красные колонии), *S. typhimurium* (бесцветные колонии), *P. mirabilis* (вишнево-коричневые с таким же преципитатом).