

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Полосенко О.В., Шепелин А.П., Ажермачева Н.И., Абаев И.В.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВ

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, Оболенск, Московская область, Россия

*Проведен сравнительный анализ качества разработанных питательных сред: Основа агара Байрд-Паркера сухая и Основа агара Фогель-Джонсона сухая и зарубежных аналогов по результатам клинических испытаний. Качество испытуемых сред оценивали по основным биологическим показателям: чувствительность, скорость роста, дифференцирующие и ингибирующие свойства. Оценка статистической достоверности результатов испытаний клинических образцов оценивалась с учетом числа параллельных исследований и количества совпадений результатов исследований, проведенных разными исполнителями. Исследовано 116 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию ИЛЦ для исследования из МСЧ 164 в период проведения клинических испытаний. Выделено 46 культур предполагаемых возбудителей заболевания при посеве на испытуемые и контрольные среды: *S. aureus* -35; *S. epidermidis*-6; *S. saprophyticus* – 5. Проявление лецитиназной активности на среде «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и ферментации маннита на среде «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» в предварительном фенотипическом тесте позволили выделить и дифференцировать клинические изоляты *S. aureus* от *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.*

Ключевые слова: питательные среды; агар Фогель-Джонсона; агар Байрд-Паркера; стафилококки; лецитиназная активность.

Для цитирования: Полосенко О.В., Шепелин А.П., Ажермачева Н.И., Абаев И.В. Клинические испытания новых питательных сред для выделения стафилококков. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 115-121. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121>

Polosenko O. V., Shepelin A. P., Azhermacheva N. I., Abaev I. V.

CLINICAL TRIALS OF NEW CULTURE MEDIA FOR STAPHYLOCOCCUS ISOLATION

Federal Budgetary Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Rosпотребнадзор, 142279 Obolensk, Moscow region, Russia

A comparative analysis of the quality of the developed nutrient media, Baird-Parker dry agar base and Vogel-Johnson dry agar Base and foreign analogues, was done based on results of clinical trials. The tested media were qualified by the main biological parameters, such as sensitivity, growth rate, and differentiating and inhibiting properties. The evaluation of statistical reliability of the results of trials of clinical samples was evaluated taking into account the number of parallel studies and the number of matches of the results of studies conducted by different performers.

*116 clinical samples of received by a laboratory of the testing laboratory center for research from hospital no.164 over the period of clinical trials were analyzed. 46 cultures of potential pathogens were isolated when culturing on test and control media: *S. aureus* -35; *S. epidermidis*-6; *S. saprophyticus* – 5.*

*Lecithinase activity on the medium “Baird-Parker dry agar Base” and mannitol fermentation on the medium “Vogel-Johnson dry agar Base” in the preliminary phenotypic test allow the isolation and differentiation of clinical isolates of *S. aureus* from *S. epidermidis*, and *S. saprophyticus*.*

Key words: nutrient media; Vogel-Johnson agar; Baird-Parker agar; staphylococci; lecithinase activity.

For citation: Polosenko O. V., Shepelin A. P., Azhermacheva N. I., Abaev I. V. Clinical trials of new culture media for staphylococcus isolation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 115-121. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121>

For correspondence: *Polosenko O. V.*, Ph.D., leading researcher, microbiology unit; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

Information about authors:

Polosenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-5961-9041>;

Shepelin A.P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>;

Azhermacheva N. I., <http://orcid.org/0000-0002-8125-4699>;

Abaev I.V., <http://orcid.org/0000-0003-2724-557X>.

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

Acknowledgment. *The work was carried out within the sectoral program of Rosпотребнадзор.*

Received 17.08.2020
Accepted 07.09.2020

Введение. Бактерии рода *Staphylococcus* относятся к ведущим возбудителям внутрибольничных и внебольничных инфекций человека и способны вызывать раз-

ные по форме и тяжести заболевания: от поверхностных кожных инфекций до тяжёлых форм пневмонии, менингита, эндокардита и др. [1, 2]. Род *Staphylococcus*

Для корреспонденции: *Полосенко О.В.*, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

состоит из 47 видов: 11 видов коагулазопозитивных и 36 коагулазонегативных видов, причем 20 видов из них ассоциированы с болезнями человека [3].

Однако, наиболее распространенными и важными с медицинской точки зрения стафилококками являются коагулазопозитивный вид *Staphylococcus aureus* и два коагулазонегативных вида: *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus saprophyticus*. Стафилококки этих трех видов являются этиологическими агентами более чем сотни различных нозологических форм инфекционных заболеваний, в том числе, инфекций крови, урогенитальных и имплантат-ассоциированных инфекций. Массовые вспышки стафилококковых инфекций происходят за счёт токсигенных штаммов. Стафилококки, продуцирующие энтеротоксины, вызывают пищевые токсикоинфекции. Наибольшей опасности подвергаются группы населения с общей иммунной недостаточностью, в частности, люди старшего возраста и дети [4-7].

ВОЗ оценивает *S. aureus* как один из пяти наиболее важных бактериальных возбудителей пищевой токсикоинфекции [8, 9]. Вирулентность штаммов *S. aureus* при пищевых токсикоинфекциях связана с продукцией энтеротоксинов, которые стабильны в окружающей среде и способны сохранять активность в желудочно-кишечном тракте человека. Следует отметить, что органолептические свойства продуктов при размножении *S. aureus* и накоплении энтеротоксинов, не изменяются [10, 11].

Стафилококки способны продуцировать большое число факторов патогенности – токсинов и ферментов, что наряду с высокой устойчивостью к хлористому натрию, часто лежит в основе идентификации и дифференциации стафилококков с помощью фенотипических методов. Разнообразии нозологических форм инфекций *S. aureus* тесно коррелирует с большим числом различных экзопродуктов с выраженными токсическими свойствами [12, 13].

В последнее время в связи с ухудшением экологической ситуации участились случаи гнойно-септических поражений кожи, различных органов, слизистых оболочек коагулазоотрицательными видами стафилококков: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* и др. Инфекции, вызванные коагулазоотрицательными стафилококками, развиваются чаще всего у ослабленных больных со сниженной иммунологической защитой, у новорожденных, онкологических больных, при длительной антибактериальной терапии [14, 15].

Несмотря на бурное развитие ускоренных методов диагностики (молекулярно-генетические, иммунохроматографические методы, иммуноферментный анализ и др.) различных заболеваний для подтверждения наличия в клинических образцах стафилококков, по-прежнему, остается бактериологический метод – выявление и идентификация возбудителя с помощью питательных сред. Они позволяют определить таксономически значимые признаки выросших культур микроорганизмов, а, следовательно, и правильно их идентифицировать.

Широкое применение в практическом здравоохранении нашли питательные среды для накопления и выделения культуры стафилококка: солевой бульон, бульон Жиолитти-Кантони с добавлением теллурита калия, лактозо-солевой бульон с фенолрот, питательная среда для выращивания *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* (питательная среда № 8), питательная среда для идентификации *Staphylococcus aureus* (питательная среда № 10) – маннит-солевой агар, питательная среда для

выделения стафилококков (стафилококкагар) [16-22].

Для первичного выделения стафилококков из исследуемого материала наиболее информативными и оптимальными являются дифференциально-диагностические среды, в которых элективность достигается высокой концентрацией хлористого натрия.

Недостатком некоторых солевых питательных сред для выделения стафилококков является то, что высокая концентрация хлористого натрия все же недостаточна для подавления некоторых штаммов протей. Высокая селективность современных питательных сред, таких как агары Байрд-Паркера, и Фогель-Джонсона обусловлена наличием хлорида лития и теллурита калия, а наличие в средах глицина и маннита компенсирует их ингибирующее действие на стафилококки.

В связи с этим необходимо применение сухих стандартных питательных сред, обладающих высокой чувствительностью, хорошими дифференцирующими, ростовыми и ингибирующими свойствами российского производства, позволяющими облегчить выделение и идентификацию стафилококков из исследуемого материала.

Как правило, штаммы *S. aureus* обладают лецитиназой и способностью к пигментообразованию, а культуры двух других видов: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* лишены их. Возможны исключения: некоторые штаммы *S. aureus* не имеют пигмента или лецитиназы, а ряд штаммов *S. epidermidis* обладает лецитиназной активностью. Но, тем не менее тест на лецитиназу является необходимым для определения *S. aureus* [23]. Поэтому питательные среды: желточно-солевой агар (ЖСА), молочно-желточно-солевой агар (МЖСА), агар Байрд-Паркера, содержащие желточную эмульсию, предназначены для получения первоначальных ориентировочных данных о принадлежности культуры к виду *S. aureus*. Одним из основных тестов при окончательной идентификации изолятов, дающих положительный тест на лецитиназу является последующее определение наличия плазмокоагулазы, дополнительным тестом – способность ферментировать маннит на средах: маннит-солевой агар, агар Фогель-Джонсона.

Перечень отечественных питательных сред для бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии обширен и неуклонно расширяется, а разработка современных микробиологических дифференциально-диагностических сред заслуживает отдельного наблюдения и исследования [20, 22].

Цель работы – сравнительный анализ качества разработанных питательных сред: Основа агара Байрд-Паркера сухая и Основа агара Фогель-Джонсона сухая и зарубежных аналогов по результатам клинических испытаний.

Материал и методы. На базе бактериологической лаборатории Испытательного лабораторного центра (ИЛЦ) в ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 164 Федерального медико-биологического агентства» были проведены исследования образцов клинического материала с применением МИ (медицинских изделий): «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» производства ФБУН ГНЦ ПМБ с целью подтверждения возможности использования их по назначению.

В работе использованы 116 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию ИЛЦ для исследования из МСЧ № 164 в период проведения клиниче-

ских испытаний МИ: Основа агара Байрд-Паркера сухая и Основа агара Фогель-Джонсона сухая.

Каждый исследуемый образец клинического материала был зашифрован и сопровождался направлением от лечащего врача с указанием предварительного диагноза, времени отбора образца и необходимости бактериологического исследования на наличие патогена и определения его основных биологических свойств. Исследование доставленных образцов в лабораторию осуществляли в течение 24 ч с момента забора каждого образца: были произведены высевы на питательные среды (включая испытуемую среду и среду сравнения), на которых были выделены клинические изоляты по методике, применяемой в бактериологической лаборатории ИЛЦ в соответствии с приказом Минздрава СССР № 535 от 22.04.85 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [23].

В качестве сред сравнения использовали Baird-Parker Agar Base (HiMedia) (lot. №0000230369) РУ № ФСЗ 2009/03709, эмульсия яичного желтка кат. № FD046, теллурид калия кат. № FD047, Vogel-Johnson Agar Base w/o Tellurite (V.J.Agar), (HiMedia) (lot. № 0000288489) РУ ФСЗ 2009/03705, теллурид калия (1 %; 2 %; 3,5% раствор) кат. № FD052, РУ № ФСЗ 2008/01440.

В качестве дополнительных питательных сред и добавок к ним были использованы: питательная среда для выделения стафилококков сухая (Стафилококкагар) РУ № ФСР 2011/10007, желточно-солевой агар (ЖСА) лабораторного приготовления, питательная среда для идентификации *Staphylococcus aureus* (питательная среда № 10 ГРМ) РУ № ФСР 2007/00374, питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (среда Гисса-ГРМ с маннитом, с глюкозой, с лактозой, с сахарозой) РУ № ФСР 2008/03494, питательная среда для количественного определения микробной загрязненности (Среда № 1 ГРМ), калия теллурид, раствор 2% ООО Мини Мед, РУ № ФСР 2009/05371, плазма кроличья цитратная сухая НПО «Микроген», яйца куриные пищевые столовые, 1 категории по ГОСТ 31654-2012, водорода перекись медицинская ООО «Инновация» ТУ 2123-002-14356367-2004, фенолфталеинфосфат натрия ТУ 6-09-05-59, НПФ «Синбиас», кровь баранья дефибрированная, стерильная, кат. №50.99.РУ ФСР №2008/03081.

Определение функциональных характеристик питательных сред проводили в соответствии с действующими нормативными документами [23,24]. Качество испытуемых сред оценивали по основным биологическим показателям: чувствительность, скорость роста, дифференцирующие и ингибирующие свойства с использованием набора тест-штаммов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ГКПМ-Оболонск. Клинические образцы исследовались параллельно двумя специалистами путем одновременного посева на все питательные среды, заявленные в испытаниях.

Оценка статистической достоверности результатов испытаний клинических образцов оценивалась с учетом числа параллельных исследований и количества совпадений результатов исследований, проведенных разными исполнителями.

Для получения корректных данных были выполнены все звенья бактериологического исследования: от взятия клинического материала, транспортировки его в бакте-

риологическую лабораторию, идентификации возбудителя, до интерпретации полученных результатов [23, 24].

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы проведена сравнительная оценка качества разработанных питательных сред с коммерческими аналогами Baird-Parker Agar Base (HiMedia) и Vogel-Johnson Agar Base (HiMedia) (табл.1). Все питательные среды готовили в соответствии с прилагаемыми инструкциями по применению.

Агар Байрд-Паркера и Агар Фогель-Джонсона являются селективными средами за счет входящих в их состав хлорида лития и теллурида калия, которые подавляют рост большинства сопутствующих микроорганизмов. Стафилококки характеризуются наличием фермента – теллуридредуктазы, поэтому на средах образуют колонии черного цвета в связи с восстановлением теллурида калия до теллура.

Главным диагностическим признаком агара Байрд-Паркера является выявление зон лецитиназной активности стафилококков, продуцирующих лецитиназу, в результате которой формируются характерные прозрачные и матовые зоны вокруг черных колоний стафилококков, а агара Фогель-Джонсона – выявление маннит ферментирующих стафилококков, изменяющих цвет среды вокруг колоний с красного на желтый в результате проявления кислых продуктов ферментации маннита.

Отличием разработанных питательных сред «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» от импортных аналогов является использование в составах сред отечественных белковых основ: панкреатических гидролизатов казеина разной степени расщепления.

Белковой основой питательной среды «Основа агара Байрд-Паркера сухая» является панкреатический гидролизат казеина со степенью расщепления 30–35%. Глицин и пируват натрия, защищая поврежденные микробные клетки, стимулируют рост стафилококков, что способствует выделению культуры.

При разработке компонентного состава питательной среды «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» в качестве питательной основы использовали панкреатический гидролизат казеина (ПГК), а также гидролизат казеина низкой степени расщепления (ГКНСР), который обеспечивает ростовые потребности стафилококков, обладающих протеолитической активностью, но в значительной мере уменьшает скорость роста сопутствующих микроорганизмов [19]. Состав разработанной питательной среды «Питательная среда для селективного выявления патогенных маннитположительных стафилококков» защищен патентом [25].

Специфическая активность и ингибирующие свойства оценивались по показателям чувствительности, скорости роста и проявлению типичных морфологических свойств тест-штаммов при росте на приготовленных питательных средах: агара Байрд-Паркера после внесения в основу 2 % раствора теллурида калия и желточной эмульсии, агара Фогель-Джонсона – после внесения в основу 2 % раствора теллурида калия. Инкубация посевов 48 ч при температуре (37±1) °С.

Фотоизображение роста некоторых контрольных тест-штаммов на приготовленном агаре Байрд-Паркера (основа+2 % р-р теллурида калия+желточная эмульсия) и агаре Фогель-Джонсона (основа+2 % р-р теллурида калия) и сред сравнения Baird-Parker Agar Base + до-

Сравнительная характеристика питательных сред по биологическим показателям на контрольных тест-штаммах

Наименование тест-штаммов, разведение (м.к./мл)	Агар Байрд-Паркера (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Baird-Parker Agar Base (HiMedia)	Агар Фогель-Джонсона (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Vogel-Johnson Agar Base (HiMedia)	ГРМ-агар (контроль)*
	Количество, диаметр (мм), свойства колоний через 48 ч				
<i>S. aureus</i> «Виотко», 10 ⁻⁶	71, 70 1,6-1,8 черные, с зоной протеолиза	72, 75 1,6-2,0 черные, с зоной протеолиза	71, 79 1,0-2,5 черные, с желтой зоной	43, 46 1,6-2,0 черные, с желтой зоной	55, 48 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>S. aureus</i> Wood-46 ATCC 10832, 10 ⁻⁶	68, 61 1,0-1,2 черные, с зоной липолиза и протеолиза	69, 68 1,0-1,2 черные, с зоной липолиза и протеолиза	78, 76 1,0-2,5 черные, с желтой зоной	75, 77 1,0-2,5 черные, с желтой зоной	67, 70 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P FDA 209, 10 ⁻⁶	52, 43 0,5 черные, с зоной липолиза протеолиза	47, 50 0,5 черные, с зоной липолиза протеолиза	49, 52 0,5-1,0 черные, с желтой зоной	46, 49 1,0-1,5 черные, с желтой зоной	45, 48 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305 CCM 883, 10 ⁻⁵	55, 64 менее 0,5 точечные черные	47, 50 менее 0,5 точечные черные	69, 66 0,8-1,0 черные	52, 54 1,2-1,4 черные	67 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990, 10 ⁻⁵	55, 58 менее 0,5 точечные черные	55, 53 менее 0,5 точечные черные	98, 92 0,5-0,8 черные	120, 111 0,2-0,3 черные	90 2,0-3,0 гладкие, круглые
<i>P. mirabilis</i> 3177, 10 ⁻⁴	30, 28 менее 1,0 коричневые, в R-форме	отсутствие роста	отсутствие роста	более 100 1,0-1,5 черные	сплошной рост, роение
<i>E. coli</i> ATCC 25922, 10 ⁻⁴	отсутствие роста	отсутствие роста	отсутствие роста	отсутствие роста	сплошной рост

Примечание. * – инкубация посевов 24 ч при температуре 37±1 °С.

бавки (HiMedia) и Vogel-Johnson Agar Base w/o Tellurite (V.J. Agar) +добавки (HiMedia) представлено на рис. 1, а, 1, б, 2, а, 2, б (см. обложку).

Таким образом, испытуемые питательные среды обеспечивали рост и предварительную дифференциацию стафилококков по продукции лецитиназы при росте на агаре Байрд-Паркера и ферментации маннита на агаре Фогель-Джонсона.

Сравнительная оценка функциональных характеристик МИ «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» по основным биологическим показателям: чувствительность, скорость роста, дифференцирующие и ингибирующие свойства показала соответствие испытуемых сред зарубежным аналогам.

Второй этап работы включал клинические испытания МИ: «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая». Испытания проводились в лабораторных условиях с применением остаточных образцов биоматериала пациентов, взятых в ходе лечебно-диагностического процесса для проверки функциональных свойств, эффективности, качества и безопасности медицинских изделий «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» при использовании в соответствии с назначением питательных сред.

Проанализировано 116 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию ИЛЦ для исследования из МСЧ № 164 в период проведения клинических испытаний медицинских изделий с направлением от лечащего врача (мокрота – 14, мазок из инфицированных ран – 3, мазок из носа – 29, мазок из зева – 24, мазок из уха – 5, мазок из глаза – 2, испражнения – 25, кровь – 1, моча – 13).

Тампоны-зонды с взятыми образцами помещались в стерильные пробирки и немедленно доставлялись в лабораторию ИЛЦ. В лаборатории осуществлялась подготовка доставленных образцов для соблюдения равнозначности исследования в соответствии с приказом Минздрава СССР № 535 [23]. После подготовки материал рассевали прямым методом по поверхности сред при помощи петли.

Предварительно через 24 ч, затем 48 ч инкубации посевов при температуре (37±1) °С визуально учитывали наличие и характер роста микроорганизмов, выросших на всех средах. Высевы осуществлялись сразу на несколько сред, для обнаружения возможного наличия стафилококков: желточно-солевой агар (ЖСА), Стафилококкагар; а также на Питательную среду № 1 с добавлением крови (кровяной агар) для выявления гемолитической активности. После инкубации для дальнейшего исследования были отобраны характерные колонии искомым патогенов (стафилококков). Отобранные визуально «подозрительные» колонии затем были отсеяны на среды для дополнительной идентификации и проведены идентификационные тесты.

В результате высева 116 образцов клинического материала, поступивших в лабораторию ИЛЦ для исследования из МСЧ № 164 в период проведения клинических испытаний МИ: «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и «Основа агара Фогель-Джонсона сухая», стафилококки были обнаружены в 46 образцах, из которых выделено:

46 культур предполагаемых возбудителей заболевания при посеве на испытуемые среды: *S. aureus* -35; *S. epidermidis*-6; *S. saprophyticus* – 5.

46 культур предполагаемых возбудителей заболевания с контрольных сред: желточно-солевой агар, стафи-

Результаты клинических испытаний *

Исследуемый материал	Предварительный диагноз	Агар Байрд-Паркера (основа с добавками) ФБУН ГНЦ ПМБ	Baird-Parker Agar Base (основа с добавками) HiMedia	Агар Фогель-Джонсона с 2 % раствором теллурида калия ФБУН ГНЦ ПМБ	Vogel-Johnson Agar Base HiMedia с 2 % раствором теллурида калия	Питательные среды, на которых подтверждено выделение патогена	Выделенный предполагаемый возбудитель**
Мазок из зева/носа (26 образцов)	Хронический тонзиллит/ангина/ОРЗ/ОРИ	Черные колонии с прозрачными матовыми зонами	Черные колонии с прозрачными матовыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Кровяной агар (гемолиз+) Желточно-солевой агар (лецитиназа+) Стафилококкагар (рост, пигмент +)	<i>S. aureus</i>
Отделяемое глаз (2 образца)	Конъюнктивит	Мелкие черные колонии	Мелкие черные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Кровяной агар (гемолиз-) Желточно-солевой агар (лецитиназа -) Стафилококкагар (рост, пигмент -)	<i>S. epidermidis</i>
Мазок из уха (1 образец)	Гнойный отит	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Кровяной агар (гемолиз+) Желточно-солевой агар (лецитиназа+) Стафилококкагар (рост, пигмент +)	<i>S. aureus</i>
Гнойное отделяемое раны левого бедра (3 образца)	Абсцесс	Мелкие черные колонии	Мелкие черные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Кровяной агар (гемолиз-) Желточно-солевой агар (лецитиназа -) Стафилококкагар (рост, пигмент -)	<i>S. epidermidis</i>
Мокрота (2 образца)	Острый трахеит	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Кровяной агар (гемолиз+) Желточно-солевой агар (лецитиназа+) Стафилококкагар (рост, пигмент +)	<i>S. aureus</i>
Испражнения (6 образцов)	Дисбактериоз Парапрактит ОКИ Диспепсия	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с прозрачными и матовыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Черные колонии с желтыми зонами	Кровяной агар (гемолиз+) Желточно-солевой агар (лецитиназа+) Стафилококкагар (рост, пигмент +)	<i>S. aureus</i>
Моча (6 образцов)	Цистит Беременность Уретрит	Мелкие черные колонии	Мелкие черные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Мелкие, черные, полупрозрачные колонии	Кровяной агар (гемолиз-) Желточно-солевой агар (лецитиназа -) Стафилококкагар (пигмент -)	<i>S. saprophyticus</i>

Примечание. * – результаты посева каждого образца вторым специалистом аналогичны; ** – принадлежность к данному роду/виду определена после постановки дополнительных тестов.

лококкагар – *S. aureus* -35; *S. epidermidis* – 6; *S. saprophyticus* – 5.

Результаты клинических испытаний представлены в табл. 2 (отрицательные образцы не указаны).

В остальных образцах ни на одной из сред стафилококки не обнаружены.

Идентификацию выделенных изолятов проводили с использованием различных питательных сред. Среды Гисса использовали для определения ферментативных свойств в отношении сахарозы, маннита, глюкозы, лактозы. Кровь баранья использовалась для выявления гемолитической активности (при добавлении к среде №1 ГРМ). Желточная эмульсия применялась для определения лецитиназной активности. Перекись водорода использовалась для определения каталазной активности (на питательной среде №1 ГРМ). Фенолфталеинфосфат

натрия использовали для постановки теста на фосфатазу. 2% раствор теллурида калия применяли для выявления фермента – теллуритредуктазы. Плазма кроличья использовалась для постановки коагулазного теста (на наличие свёртывающего фактора).

Все испытания проводились двумя специалистами в разных помещениях бактериологической лаборатории ИЛЦ одновременно. Результаты испытаний, проведенные двумя специалистами, совпали полностью: типичная морфология колоний, размеры, цвет, количество и скорость роста на испытуемых средах и средах сравнения были оценены и подтверждены обоими специалистами одинаково. Отмечено, что из выделенных 5 изолятов *S. saprophyticus* маннитположительных выявлено не было; из выделенных 6 изолятов *S. epidermidis* не было выявлено культур, обладающих гемолитической и лецитиназной активностью.

Всего на базе бактериологической лаборатории ИЛЦ в ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 164 ФМБА» было исследовано 116 образцов клинического материала, из них выявлено положительных 46 изолятов стафилококков. Таким образом, на всех четырех использованных при работе питательных средах получено 184 положительных результата, что подтверждает отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

В соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации (Москва, 2018)» по статистической обработке данных согласно приложению В, проведена оценка статистической достоверности результатов испытаний в зависимости от числа независимых опытов при доверительной вероятности 90% и показано, что истинное значение найденных положительных находок составляет не менее 96 %

Заключение. По среде «Основа агара Байрд-Паркера сухая»: в результате испытаний при посеве клинических образцов подтверждены диагностические характеристики – на испытуемой среде и среде сравнения визуально четко наблюдали наличие характерных для стафилококков колоний черного цвета, окруженных прозрачной зоной протеолиза или зоной протеолиза с непрозрачной зоной липолиза.

По среде «Основа агара Фогель-Джонсона сухая»: в результате испытаний при посеве клинических образцов подтверждены диагностические характеристики – на испытуемой среде и среде сравнения наблюдали наличие характерных для стафилококков колоний черного цвета. Ферментирующие маннит стафилококки, формировали на среде черные колонии, окруженные желтой зоной; не ферментирующие маннит – черные колонии без пожелтения среды вокруг колоний.

Проявление лецитиназной активности на среде «Основа агара Байрд-Паркера сухая» и ферментации маннита на среде «Основа агара Фогель-Джонсона сухая» в предварительном фенотипическом тесте позволяет выделять и дифференцировать клинические изоляты *S. aureus* от *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.

Таким образом, анализ биологических характеристик разработанных питательных сред Основа агара Байрд-Паркера сухая и Основа агара Фогель-Джонсона сухая по результатам клинических испытаний доказал высокое качество и эффективность препаратов в сравнении с зарубежными аналогами.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-11, 13 см. REFERENCES)

12. Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Коробова О.В., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Сравнение гемолитической активности и генов гемолитических токсинов клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных на территории РФ. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(5): 294-8.
14. Корниенко М.А., Копыльцов В.Н., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В., Любасовская Л.А., Припутневич Т.В. и др. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016; 34 (1): 18-25.
15. Меньшиков В.В., ред. Клиническая лабораторная аналитика. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Т. 4. Справочник. 2003; 343-50.

16. Шепелин А.П., Сергеева А.Б., Полосенко О.В. Выявление стафилококков при использовании современных импортзамещающих питательных сред. *Бактериология*. 2018; 3(2): 64-71.
17. Шепелин А. П., Дятлов И. А., Полосенко О. В. Питательные среды для контроля качества пищевой продукции. *Современная лабораторная диагностика*. 2017; 1: 1: 22-5.
18. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И. Бактериологическая диагностика стафилококковых инфекций. *Справочник заведующего КДЛ*. 2018; 2: 37-44.
19. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Дятлов И.А. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015; 4 (56): 39-43.
20. Попова А.Ю., Дятлов И.А., ред. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. 2020.
21. Шепелин И. А., Миронов А. Ю., Шепелин К. А. Питательные среды. *Справочник бактериолога*. 2-изд. 2018.
22. Дятлов И. А., Миронов А. Ю., Шепелин А. П., Алешкин В. А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (8): 61-5.
23. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ Минздрава СССР № 535; 1985.
24. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
25. Питательная среда для селективного выявления патогенных маннитположительных стафилококков. Патент RF 2 620 965 С2. – № 2015143570/15; 2017.

REFERENCES

1. Plata K., Rosato A.E., Wegrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an Infectious Agent: Overview of Biochemistry and Molecular Genetics of Its Pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*. 2009; 56: 597-612.
2. Chambers H.F., Deleo F.R. Waves of resistance in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 629–41. doi: 10.1038/nrmicro2200.
3. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014;27(4):870-926. doi:10.1128/CMR.00109-13.
4. Murray R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J.* 2005; 35 Suppl 2: 106-19.
5. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Bio Med Research International*. 2014; doi: 10.1155/2014/827965.
6. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2000; 61: 1–10. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00377-9.
7. Argudin MÀ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 2010; 2:1751–73. doi: 10.3390/toxins2071751
8. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases 2015. World Health Organization; 2015. English ISBN 978 92 4 156516 5. https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/
9. EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2015. *European Food Safety Authority journal*. 2016; 14: 4634. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
10. Pinchuk I.V, Beswick E.J, Reyes V.E. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins* 2010; 2(8): 2177–97
11. Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, García-Gimeno RM, Zurera G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol.* 2009; 133: 186-94
12. Abaev I. V., Skryabin Y. P., Korobova O. V., Polosenko O. V., Shepelin A. P. Comparison of hemolytic activity and hemolytic toxin

- genes of *Staphylococcus aureus* clinical strains, isolated in Russia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (5): 294-298 (in Russian)
13. Sato Y, Omoe K, Naito I, Ono HK, Nakane A, Sugai M, et al. Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 2637–40. doi: 10.1128/JCM.00661-14.
 14. Kornienko M. A., Kopyltsov V. N., Shevlyagina N. V., Didenko L. V., Lyubasovskaya L. A., Pripitnevich T. V. et al. The ability of staphylococci of various types to form biofilms and their impact on human cells. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2016; 34 (1): 18-25. (in Russian)
 15. Menshikov V. V., ed. *Spravochnik. Clinical laboratory Analytics. Private analytical technologies in a clinical laboratory. Vol.3. [Klinicheskaya laboratornaya analitika. Chastnye analiticheskie tekhnologii. Tom 3]*. 2003. (in Russian)
 16. Shepelin A. P., Sergeeva A. B., Polosenko O. V. In the detection of staphylococci using modern import-substituting nutrient media. *Bakteriologiya*. 2018; 3(2): 64-711 (in Russian)
 17. Shepelin A. P., Dyatlov I. A., Polosenko O. V. Nutrient media for quality control of food products. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika* 2017; 1: 22-5. (in Russian)
 18. Shepelin A. P., Polosenko O. V., Marchikhina I. I. Bacteriological diagnostics of staphylococcal infections. *Spravochnik zaveduyushhego KDL*. 2018; 2: 377-44. (in Russian)
 19. Shepelin A. P., Polosenko O. V., Marchikhina I. I., Sholokhova L. P., Dyatlov I. A. Nutrient media for detecting staphylococci in clinical and sanitary microbiology. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2015; 4 (56): 39-43. (in Russian)
 20. Microbiological quality control of food products [Mikrobiologicheskiy kontrol kachestva pishchevoy promyshlennosti]. Popova A. Yu., Dyatlov I. A., eds. 2020. (in Russian)
 21. Shepelin I. A., Mironov A. Yu., Shepelin K. A. Nutrient media [Pitateľnye sredy]. *Spravochnik bakteriologa*. 2nd ed. 2018 (in Russian)
 22. Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Shepelin A. P., Aleshkin V. A. The state and development trends of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60 (8): 61-5. (in Russian)
 23. On unification of microbiological (bacteriological) research methods being used by clinical diagnostic laboratories structured into medical-preventive institutions. *Prikaz Minzdrava SSSR No.535*; 1985. (in Russian)
 24. Methods to control bacteriological nutrient media. *Metodicheskie ukazaniya. MUK 4.2.2316-08*. Moscow: Federalnyi tsentr gigieny i epidemiologii. Rosпотrebnadzor; 2008. (in Russian)
 25. Culture medium for selective detection of pathogenic mannitol-positive staphylococci. Patent RU 2 620 965 C2. -No. 2015143570/15; 2017. (in Russian)

Поступила 17.08.20

Принята к печати 07.09.20

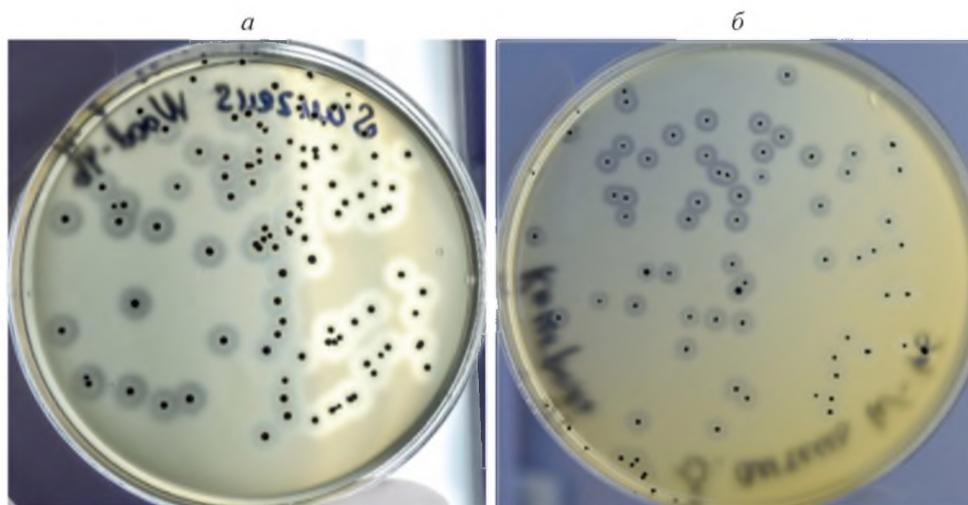


Рис. 1. Рост *S. aureus* Wood-46.

a – на агаре Байрд-Паркера (ФБУН ГНЦ ПМБ); *б* – Baird-Parker Agar Base (HiMedia).

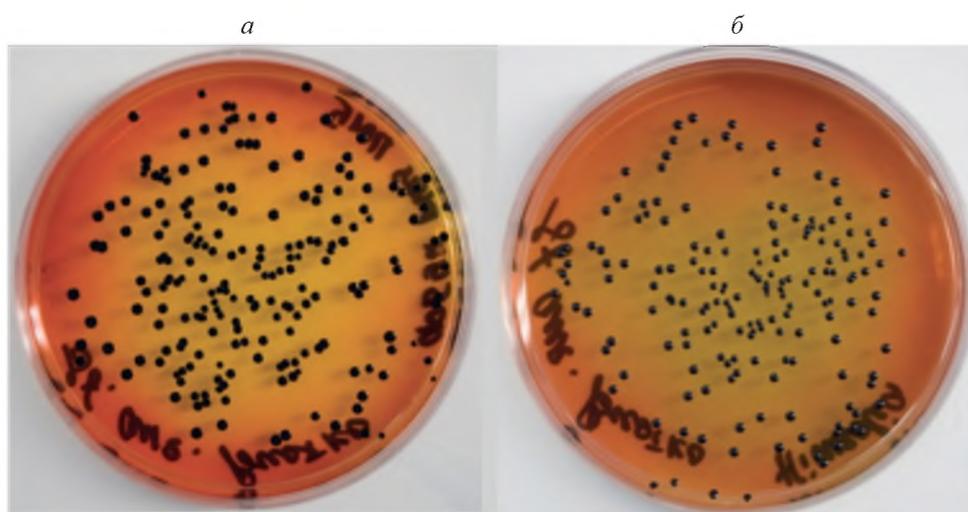


Рис.2. Рост *S. aureus* «Виотко».

a – на агаре Фогель-Джонсона (ФБУН ГНЦ ПМБ); *б* – на Vogel-Johnson Agar Base. (HiMedia).