

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.842.14.83.136

Шепелин А.П.¹, Полосенко О.В.¹, Марчихина И.И.¹, Шолохова Л.П.¹, Ажермачева Н.И.¹, Ершова М.Г.², Полетаева Е.Д.²

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, пос. Оболенск, Серпуховский район, Московская область;

²ГБУЗ Ярославской области «Инфекционная клиническая больница», 150040, Ярославль

Сальмонеллёзные инфекции остаются серьёзной проблемой современной медицины. Являясь возбудителями кишечных инфекций, представители рода Salmonella проявляют себя как патогенные бактерии, особенно при развитии внутрибольничных инфекций. Если учесть полиморфизм клинических проявлений сальмонеллёзов, лабораторные исследования с применением бактериологических и серологических методов являются важным звеном в их диагностике. Профилактика сальмонеллёза включает мероприятия по выявлению бактерионосителей, обеспечению контроля над заболеваемостью сельскохозяйственных животных и птиц, контролю пищевых продуктов и т. д. Перечень питательных сред для выделения и идентификации сальмонелл обширен и неуклонно расширяется, выбор конкретных сред во многом определяется исходя из характера исследуемого материала и представления о возможном содержании в нём бактерий рода Salmonella. При этом учитываются исследования, диагнозы или эпидемическую ситуацию. В ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора разработаны две питательные среды, предназначенные для накопления и выделения сальмонелл из различных образцов клинического материала: питательная среда для накопления сальмонелл сухая (магниева среда) и питательный агар с бриллиантовым зелёным, феноловым красным, лактозой и сахарозой сухой (БФЛС-ГРМ-агар)». Проведена сравнительная оценка ростовых и ингибиторных свойств новых питательных сред производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» с коммерческими отечественными и зарубежными аналогами с использованием клинического материала. Доказано соответствие отечественных питательных сред: магниевой среды и БФЛС-ГРМ-агара коммерческим аналогам при использовании этих сред с целью селективного накопления, выделения и учёта сальмонелл из клинического материала и получения объективных результатов бактериологического контроля.

Ключевые слова: питательные среды; БФЛС-ГРМ-агар; магниевая среда; энтеробактерии.

Для цитирования: Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Ажермачева Н.И., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 557-563. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563>

Shepelin A. P.¹, Polosenko O. V.¹, Marchikhina I. I.,¹ Sholokhova L. P.,¹ Azhermacheva N. I.,¹ Ershova M. G.,² Poletaeva E. D.²

CLINICAL TRIALS OF SALMONELLA ENRICHMENT MEDIUM

¹Federal State Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Rospotrebnadzor, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

²State budgetary institution of health care Infectious disease hospital, 150040 Yaroslavl, Russia

Salmonella infections continue to be a serious problem in modern medicine. Being intestinal infections-associated pathogens, representatives of the genus Salmonella manifest themselves as pathogenic bacteria, especially in developing nosocomial infections. Given the polymorphism of clinical symptoms of salmonellosis, laboratory studies using bacteriological and serological methods are an important link in the diagnosis. In addition, the general prevention of salmonellosis includes measures to identify bacteria carriers, to ensure control over the incidence in farm animals and birds, food safety, etc. The list of nutrient media to isolate and identify Salmonella is lengthy and steadily extending, and the choice of specific media is largely relies on the nature of the material under study as well as on the idea of the potential availability of Salmonella bacteria in it, with research, diagnosis or epidemic situation being taken into account. The SRCAMB (Rospotrebnadzor) has designed two nutrient media allowing the enrichment and isolation Salmonella from various clinical samples. These are "Nutrient Medium for Enrichment of Salmonella, Dry (Magnesium medium) and "Nutrient Agar with Brilliant Green, Phenolic Red, Lactose and Sucrose, Dry (BPLS-FMH agar)." Growth and inhibitory properties of the new culture media produced by the SRCAMB and commercial domestic and foreign counterparts have been compared by using clinical material. Domestic nutrient media such as Magnesium medium and BPLS-FMH agar were proved to correspond to their commercial analogues when being used for enrichment, isolating and counting Salmonella bacteria in clinical specimens to have bacteriological control real data.

Key words: nutrient media; BPLS-FMH agar; Magnesium medium; enterobacteria.

For correspondence: Polosenko O. V., candidate of biological sciences, leading researcher of the sector for microbiology; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

For citation: Shepelin A. P., Polosenko O. V., Marchikhina I. I., Sholokhova L. P., Azhermacheva N. I., Ershova M. G., Poletaeva E. D. Clinical trials of salmonella enrichment medium. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (9): 557-563 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563>

Для корреспонденции: Полосенко Ольга Владимовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. сектора микробиологических исследований; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

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

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

Received 02.04.2018
Accepted 25.05.2018

Ежегодно большое количество людей страдает пищевыми отравлениями и инфекциями пищевого происхождения, вызванными сальмонеллами.

По статистической информации о состоянии здравоохранения по Российской Федерации в целом и по субъектам Российской Федерации за 2016 г., заболеваемость населения сальмонеллезными инфекциями составила 38,1 тыс. человек, что по сравнению с предыдущим годом увеличилось на 1,2 тыс. человек [4].

В этиологической структуре доля сальмонеллы группы D (*Salmonella enteritidis*) составляет 78–81% всех диагностированных случаев. В последние годы появились данные о возрастающей роли сальмонелл группы С (*S. infantis*), что свидетельствует о формировании новых резервуаров возбудителя в природе и требует дальнейших исследований для определения возможных источников инфекции, не имеющих большого значения в предыдущие годы [9].

Большинство сальмонелл патогенны как для человека, так и для животных и птиц, но в эпидемиологическом отношении наиболее значимы для человека лишь несколько из них: *Salmonella enterica* subsp. *typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enteritidis*, *S. enterica* subsp. *panama*, *S. enterica* subsp. *infantis*, *S. enterica* subsp. *london* и некоторые другие вызывают 85–91% случаев сальмонеллезов. При этом на долю первых двух приходится 75% всех изолятов, выделяемых в настоящее время от больных людей.

Серьёзной проблемой современной медицины являются сальмонеллезные, нозокомиальные инфекции. В подавляющем большинстве случаев (более 80%) возбудителем нозокомиального сальмонеллеза как в России, так и за рубежом является *S. enterica* subsp. *typhimurium* [1].

Механизм передачи сальмонеллезной инфекции фекально-оральный, основной путь передачи – пищевой и главным образом через продукты животного происхождения.

Санитарные правила (СП 3.1.7.2836-11 «Профилактика сальмонеллеза») [12] устанавливают основные требования к комплексу организационных, санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения сальмонеллеза среди населения.

Несмотря на стремительное развитие ускоренных методов диагностики (молекулярно-генетические, иммунохроматографические методы, иммуноферментный анализ и другие) различных заболеваний, в соответствии с санитарными правилами в качестве основного метода для подтверждения наличия сальмонелл является культуральный [2, 8, 13].

Культуральный метод основан на выделении и идентификации чистой культуры возбудителя из исследуемого материала. Его эффективность зависит от правильного и адекватного выбора питательных сред, что позволяет определить таксономически значимые признаки клинических изолятов и правильно их идентифицировать.

К числу общепризнанных питательных сред для накопления сальмонелл относятся магниевая среда, селе-

нитовый бульон, бульон Раппопорта – Вассилиадиса, среда Мюллера – Кауфмана и другие.

Магниевая среда используется для выделения сальмонелл в обычной концентрации (для исследования малых объёмов – испражнений, пищевых продуктов, сточных вод), в двойной концентрации (для исследования больших объёмов – сточных вод, воды открытых водоёмов), в виде концентрированных растворов («экспедиционная» модификация) [5].

Из плотных селективных дифференциально-диагностических питательных сред, производимых в РФ, широко применяются среда Левина, агар Эндо, агар Плоскирева, висмут-сульфит-агар, XLD-агар и другие.

Высокая питательная ценность селективного питательного агара с бриллиантовым зелёным, феноловым красным, лактозой и сахарозой (БФЛС-ГРМ-агар) обеспечивает хороший рост сальмонелл и их чёткую дифференциацию от лактозо- и сахарозоположительных микроорганизмов, увеличенная концентрация бриллиантового зелёного и дополнительное содержание малахитового зелёного в значительной степени подавляют рост грамположительных бактерий.

Следует отдавать предпочтение отечественным сухим питательным средам известных производителей, имеющим регистрационные удостоверения и разрешённым к применению на территории Российской Федерации для лабораторной диагностики [10].

Перечень питательных сред для выделения и идентификации возбудителей кишечных инфекций, в частности энтеробактерий, неуклонно расширяется. Практически весь ассортимент питательных сред ФБУН «ГНЦ ПМБ» внесён в ГОСТы и МУК для бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии. Эти среды широко используются бактериологическими лабораториями России для выделения и идентификации энтеробактерий, диагностики особо опасных инфекций, дисбиозов, дифтерии, гнойных бактериальных менингитов, при контроле микробной загрязнённости нестерильных лекарственных средств и др. [3, 14–16].

Цель работы – внедрить в практику бактериологических исследований для выделения сальмонелл отечественные сухие питательные среды: питательную среду для накопления сальмонелл, сухую (магниевая среда) и питательный агар с бриллиантовым зелёным, феноловым красным, лактозой и сахарозой сухой (БФЛС-ГРМ-агар), не уступающих по качеству импортным коммерческим аналогам.

Материал и методы. В микробиологической лаборатории Инфекционной клинической больницы г. Ярославля в рамках Соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ФБУН «ГНЦ ПМБ» и ГБУЗ ЯО «ИКБ» от 06.06.2016 совместно с сотрудниками ФБУН «ГНЦ ПМБ» проведены исследования образцов клинического материала с применением питательной среды для накопления сальмонелл сухой (магниевая среда) по ТУ 9385-228-78095326-2015, БФЛС-ГРМ-агара по ТУ 9385-201-78095326-2013 производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» для подтверждения возможности использования данных сред по назначению.

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

Тест-штамм	Разведение	Питательный БФЛС-ГРМ-агар ФБУН «ГНЦ ПМБ»	BPLS – agar for the isolation of <i>Salmonella</i> фирмы «MERCK»
		число колоний, диаметр в мм	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhimurium</i> 79	10 ⁻⁶	87 2,5–3,2	85 1,6–1,8
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	Колонии круглые, гладкие, розового цвета
<i>S. enterica</i> subsp. <i>gallinarum</i> 665	10 ⁻⁶	105 1,6–1,8	Нет роста
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>paratyphi</i> A 225	10 ⁻⁶	125 1,4–1,8	103 1,8–2,0
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	Колонии круглые, гладкие, розового цвета
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhi</i> H-901 ГДР/ГИСК	10 ⁻⁶	79 1,0–1,8	45 0,6
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	Колонии круглые, гладкие, бледно-розового цвета
<i>S. flexneri</i> 1 a 8516	10 ⁻⁶	92 1,4–1,6	Нет роста
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	
<i>E. coli</i> O ₅₅ :K ₅₉ 3912/41	10 ⁻⁶	46 1,0–1,8	47 1,0–1,6
		Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета	Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета
<i>E. coli</i> 25922	10 ⁻⁶	49 1,6–2,0	38 1,2–1,4
		Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета	Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета
<i>P. vulgaris</i> HX 19222	10 ⁻⁶	125 1,8–2,0	85 1,0–1,2
		Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета, роения нет	Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета, роения нет
<i>S. aureus</i> 209-P	10 ⁻⁵	Нет роста	Нет роста

Проанализировано 520 образцов патогенных биологических агентов (ПБА). Клинический материал представляет собой 436 образцов испражнений (кал), 74 образца мочи, 5 мазков из гнойных ожоговых ран, 5 образцов крови.

Препараты сравнения для магниевой среды – селенитовый бульон, предоставленный ГУЗ ЯО «ИКБ № 1», для БФЛС-ГРМ-агара – SS-агар, среда Левина-ГРМ, BPLS – agar for the isolation of *Salmonella* фирмы «MERCK».

В качестве вспомогательных сред и сред сравнения для выделения энтеробактерий использованы:

- питательный бульон для накопления сальмонелл по Раппопорту – Вассилиадису сухой (RVS-бульон);
- транспортная питательная среда Кэри – Блэра;
- питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (агар Клиггера-ГРМ);
- питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (агар Эндо-ГРМ);
- питательная среда с эозин-метиленовым синим сухая (среда Левина-ГРМ);
- питательная среда для выделения сальмонелл и шигелл сухая (SS-агар);
- селенитовый бульон для накопления сальмонелл;
- питательная среда для контроля микробной загрязнённости (цитратный агар Симмонса) (питательная среда № 14 ГРМ);
- среда Гисса с сорбитом, с индикатором;
- питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (Гисса с глюкозой);
- питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (Гисса с лактозой);
- среда с лизином;
- Ornitin Decarboxylase Broth HiMedia 0000238812;
- Gram Stain Kit REF 212539 LOT 4140910 2015 – 10-31 «Becton, Dickinson»;

– сыворотки ПЕТСАЛ СПБНИИВС диагностические сальмонеллезные адсорбированные для реакции агглютинации (РА), лиофилизат для диагностических целей.

Взятие исследуемого материала и посев на питательные среды проводили в соответствии с нормативными документами [6, 7, 11].

Результаты и обсуждение. ФБУН «ГНЦ ПМБ» выпускает среды для накопления и выделения сальмонелл и шигелл, такие как RVS-бульон, агар Плоскирева, SS-агар, агар Мак-Конки, висмут-сульфит-агар, XLD-агар. При разработке новых сред, в частности при планировании целенаправленных и организованных экспериментов по оптимизации состава, например БФЛС-агара, использован статистический метод с варьированием нескольких факторов, влияющих на качество питательной среды. Магниевая среда и БФЛС-ГРМ-агар – питательные среды, предназначенные для накопления и выделения сальмонелл из различных материалов, полностью адаптированы к сырьевой базе ФБУН «ГНЦ ПМБ» [10]. По результатам экспериментальных работ определён оптимальный компонентный состав отечественного БФЛС-агара, обладающего стабильными физико-химическими и биологическими свойствами. Качество разработанных сред оценивалось по основным биологическим показателям с использованием набора тест-штаммов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН «ГНЦ ПМБ». Проведена сравнительная оценка качества разработанной питательной среды с коммерческим аналогом BPLS – agar for the isolation of *Salmonella* фирмы «MERCK» (табл. 1).

Совокупность компонентов разработанной питательной среды для накопления сальмонелл (магниевой среды) обеспечивает питательные потребности для роста и накопления сальмонелл из исследуемых образцов различ-

Таблица 2

Показатели эффективности магниевой среды и RVS-бульона через 6 ч инкубации при 37,0 ± 1°C

Тест-штамм, разведение	Магниевая среда			Показатель эффективности
	рост на ГРМ-агаре (число колоний, морфология, диаметр в мм)			
	до подращивания	после подращивания		
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhimurium</i> 79, 10 ⁻⁶	20 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1500 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		75
<i>S. enterica</i> subsp. <i>abony</i> IHE 103/39, 10 ⁻⁶	8 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	820 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		102
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritidis</i> 11272, 10 ⁻⁶	33 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1500 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		45
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhi</i> «bismuth», 10 ⁻⁶	17 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	85 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>paratyphi</i> B 8006, 10 ⁻⁶	15 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1000 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		66
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> <i>meunchen</i> O ₆ , 10 ⁻⁶	22 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	517 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		24
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhimurium</i> 79, 10 ⁻⁶	46 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1200 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		26
<i>S. enterica</i> subsp. <i>abony</i> IHE 103/39, 10 ⁻⁶	21 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1000 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		47
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritidis</i> 11272, 10 ⁻⁶	40 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1000 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		25
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhi</i> «bismuth», 10 ⁻⁶	12 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	4 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>paratyphi</i> B 8006, 10 ⁻⁶	27 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	45 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		16
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> <i>meunchen</i> O ₆ , 10 ⁻⁶	25 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	390 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		15

ной степени биологического загрязнения с показателем эффективности не менее 10. Селективные свойства среды основаны на низком значении pH и ингибирующем действии хлористого магния, малахитового зелёного, бриллиантового зелёного в отношении ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий. Разработанная магниевая среда по своим ингибирующим свойствам идентична RVS-бульону и обеспечивает визуальное отсутствие роста сопутствующих микроорганизмов в первые 6 ч инкубации посевов при 37 ± 1°C. Сравнительная характеристика эффективности накопления сальмонелл в магниевой среде и RVS-бульоне представлена в табл. 2.

В соответствии с ТУ эффективность магниевой среды должна быть не менее 10, что подтверждается экспериментальными данными.

В микробиологической лаборатории Инфекционной клинической больницы г. Ярославля проведены клинико-лабораторные испытания на трёх сериях каждой из вышеуказанных питательных сред – БФЛС-ГРМ-агаре и магниевой среде. Образцы питательных сред представлены ФБУН «ГНЦ ПМБ» по акту передачи образцов. Средами сравнения для БФЛС-ГРМ-агара служили

SS-агар и среда Левина-ГРМ, для магниевой среды – селенитовый бульон, предоставленные ГУЗ ЯО «ИКБ № 1».

Испытания проводились в 2 этапа.

1-й этап: входной контроль предоставленных для испытания трёх серий каждой из испытываемых сред на соответствие требованиям, заложенным в ТУ и описанным в паспортах качества (внешний вид, растворимость, прозрачность и цветность раствора), определяли визуально, pH – потенциометрическим методом.

2-й этап: проводили испытания медицинских изделий БФЛС-ГРМ-агар по ТУ 9385-201-78095326-2013 и магниевой среды по ТУ 9385-228-78095326-2015 производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» с целью подтверждения возможности использования их по назначению.

Подготовка и исследование образцов клинического материала с использованием БФЛС-ГРМ-агара проведена в соответствии с приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 и приказом Минздрава СССР от 16.08.1989 № 475.

Исследовано в двух повторностях 520 образцов ПБА, поступивших в лабораторию для исследования от 520 пациентов, госпитализированных в различные отделения ГБУЗ ЯО «ИКБ». Клинический материал представлен 436 образцами испражнений (кал), 74 образцами мочи, 5 мазками из гнойных ожоговых ран, 5

образцами крови. Каждый образец зашифрован (номера всех образцов, указанных в протоколе, соответствуют номерам, присвоенным этим образцам в журнале регистрации ПБА, поступающих для исследования при энтеропатогенных инфекциях по форме 512/у (ГБУЗ ЯО «ИКБ»)). Каждый образец сопровождался направлением от лечащего врача с указанием предварительного диагноза (острые кишечные инфекции, пищевые токсикоинфекции, сепсис и т. д.) и необходимости культурального исследования на патогены, в том числе сальмонеллы. Посевы и учёт результатов проводились параллельно двумя специалистами (врач-бактериолог ГБУЗ ЯО «ИКБ» и сотрудник ФБУН «ГНЦ ПМБ») в разных помещениях одной лаборатории.

Доставленный в транспортной питательной среде Кэри – Блэра клинический материал засеивали на питательные среды Левина-ГРМ, SS-агар и испытываемый БФЛС-ГРМ-агар. Равные количества транспортных сред Кэри – Блэра с оставшимися в них образцами залиты соответственно селенитовым бульоном и магниевой средой для инкубации посевов с целью селективного накопления сальмонелл.

Ферментативные свойства клинических изолятов, подозрительных на сальмонеллы, выросших на БФЛС-ГРМ-агаре

Подозри- тельные колони на БФЛС- ГРМ-агаре, № образца	Сероводород	Лактоза	Глюкоза (газ)	Сахароза	Мочевина	Подвижность	Индол	Фенилаланиндезаминаза	Цитрат Симмонса	Лизиндекарбоксилаза	Орнитиндекарбоксилаза	Сорбит	Мальтоза	Маннит	Дульцит	Рамноза	Ксилоза	Арабиноза	Инозит	Предва- рительная идентифика- ция (род)	Серовар
253	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
345	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
684	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
823	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>london</i>
955	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1229	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1249	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1251	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1663	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1803	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
343	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
371	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>stanley</i>
455	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
771	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>bovismorbificans</i>
865	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1163	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>virchow</i>

Через 24 ч инкубации посевов на плотных дифференциально-диагностических питательных средах учитывали рост колоний с характерной для искомым микроорганизмов морфологией: – круглые, гладкие, розового цвета диаметром от 1,5 до 3,0 мм на БФЛС-ГРМ-агаре и бледно-розовые с почернением или без него на SS-агаре и розовые на среде Левина.

По культуральным свойствам отобраны 112 чашек с ростом на SS-агаре, среде Левина-ГРМ, БФЛС-ГРМ-агаре, где обнаружены лактозоотрицательные колонии. Отобранные чашки с ростом – посев 59 образцов кала на SS-агаре, 59 образцов кала на среде Левина и 58 образцов на БФЛС-ГРМ-агаре.

По истечении срока накопления образцов в селени-товом бульоне и магниевой среде во всех посевах клинических образцов визуально наблюдался рост в виде диффузного помутнения с обесцвечиванием среды или без него. Из всех пробирок бактериологической петлём проводились штриховые пересевы на плотные среды: – среду Левина-ГРМ, SS-агар, агар Эндо-ГРМ. Посевы инкубировались 24 ч при 37 ± 1°С. Для дальнейшей идентификации отобрано 105 чашек с характерной для искомым микроорганизмов морфологией лактозоотрицательных колоний.

После накопления в селениновом бульоне выявлено 62 образца кала, а после накопления в магниевой среде – 53 образца кала, обсеменённые лактозоотрицательными микроорганизмами.

На чашках с посевами остальных образцов кала, мочи, гноя, крови подозрительных колоний не обнаружено ни на чашках с прямым посевом образцов, ни на чашках после накопления в магниевой среде и селениновом бульоне. Отрицательный результат посевов крови под-тверждён на анализаторе Vact/Alert 3D 60.

Подозрительные на принадлежность к роду *Salmo-nella* колонии по 1–6 с чашки идентифицировались по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативным и антигенным свойствам. Рост колоний на SS-агаре, среде Левина-ГРМ, БФЛС-ГРМ-агаре пред-ставлен на рис. 1., см. обложку.

На отобранных чашках Петри с исследуемой и кон-трольными питательными средами обнаружены сфор-мированные колонии с типичной для сальмонелл мор-фологией. На SS-агаре наблюдался рост розовых, бесц-ветных колоний и колоний с чёрным центром, на среде Левина-ГРМ – розовых, бесцветных колоний и колоний тёмно-фиолетового цвета без металлического блеска, на БФЛС-ГРМ-агаре – розовых колоний и колоний жёлто-го цвета. Рост колоний на SS-агаре после накопления в магниевой среде и селениновом бульоне представлен на рис. 2 и 3, см. обложку.

После накопления в магниевой среде выявление сальмонелл упрощается, поскольку сопутствующая ми-крофлора после культивирования в средах накопления в значительной степени подавлена.

Ферментативные свойства бактерий, подозритель-ных на принадлежность к сальмонеллам, определялись на среде Клигера и средах длинного «пестрого ряда». После дополнительных тестов для всех лактозоотрица-тельных микроорганизмов, выросших на испытуемых средах, родовая и видовая принадлежность к сальмо-неллам подтверждена только у 16 изолятов, остальным отобранным образцам дано отрицательное заключение «патогенные энтеробактерии не обнаружены» (табл. 3).

Антигенные свойства определяли в РА на стекле с агглютинирующими моно- и поливалентными О- и Н-сальмонеллёзными сыворотками по четырёхкrest-ной системе (рис. 4, см. обложку).

Таблица 4

Выявляемость искомых микроорганизмов на испытуемой и контрольных средах при посеве клинического материала

Показатель	БФЛС-ГРМ-агар		Контрольная среда (SS-агар**)
	среднее значение	среднее значение	
	1-й специалист	2-й специалист	
Количество посевов клинических образцов	520	520	520
Количество положительных образцов*:	58	54	59
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritidis</i>	12	12	12
<i>S. enterica</i> subsp. <i>london</i>	1	1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>stanley</i>	1	1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>bovismorbificans</i>	1	1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>virchow</i>	1	1	1
Лактозоотрицательные	42	38	43
Выявляемость и % ± m совпадений результатов исследования положительных проб	95 ± 2		95 ± 2

Примечание. * – при доверительной вероятности 90%, учёте среднего результата, полученного двумя специалистами на БФЛС-ГРМ-агаре; ** – на контрольной среде Левина-ГРМ получен аналогичный результат.

Сравнительная оценка выявляемости сальмонелл с использованием испытуемой и контрольных питательных сред из клинического материала представлена в табл. 4.

Выводы. Испытуемые среды: питательная среда для накопления сальмонелл сухая (магниева среда) и питательный агар с бриллиантовым зелёным, феноловым красным, лактозой и сахарозой сухой (БФЛС-ГРМ-агар) полностью соответствуют заявленным в ТУ требованиям по внешнему виду, растворимости, прозрачности, цветности и рН раствора.

Сравнительная оценка качества испытуемых сред и коммерческих аналогов по биологическим показателям на расширенном наборе тест-штаммов микроорганизмов доказывает полное соответствие назначению каждой из этих питательных сред и ряд преимуществ по показателям чувствительности и эффективности. БФЛС-ГРМ-агар в отличие от BPLS-agar for the isolation of *Salmonella* фирмы «MERCCK» обеспечивает рост, а, следовательно, и выделение из исследуемых образцов *S. gallinarum* 665 и *S. flexneri* 1a 8516. Количество прорастаемых от посевной дозы колоний в отношении *S. typhi* Н-901 ГДР/ГИСК на БФЛС-ГРМ-агаре более чем на 40% выше.

Магниева среда превосходит контрольный селенистый бульон по показателю эффективности накопления сальмонелл при инкубации посевов контрольных тест-штаммов микроорганизмов в течение 6 ч при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и соответствует требованиям ТУ для данной среды с показателем эффективности более 10.

При исследовании 520 образцов клинического материала в микробиологической лаборатории Инфекционной клинической больницы г. Ярославля при посеве на БФЛС-ГРМ-агар и после инкубации посевов образцов в магниева среде с целью накопления сальмонелл выявлено 16 изолятов для дальнейшей идентификации. При

использовании контрольных питательных сред также выделено 16 изолятов сальмонелл.

Выявляемость результатов исследования положительных проб на контрольном БФЛС-ГРМ-агаре и контрольных SS-агаре и среде Левина-ГРМ составила $95 \pm 2\%$.

Питательный БФЛС-ГРМ-агар и питательная магниева среда производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к средам аналогичного назначения.

Доказана возможность использования БФЛС-ГРМ-агара производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» с целью выделения сальмонелл наряду со средами аналогичного назначения.

Многолетний опыт производства и система контроля качества питательных сред гарантируют потребителям полное соответствие требованиям нормативной документации.

Использование разработанных питательных сред по совокупности признаков и достигаемому эффекту при проведении микробиологических исследований не меняют алгоритмы работы диагностических лабораторий практического здравоохранения.

Питательная магниева среда и питательный БФЛС-ГРМ-агар рекомендуются для выявления сальмонелл в клинической бактериологии.

Обоснованное применение отечественных питательных сред позволит в полном объёме удовлетворить потребности клинической и санитарной микробиологии и отказаться от импортных поставок, не снижая при этом качества микробиологических исследований. Это обеспечит поддержание безопасности Российской Федерации на должном уровне и адекватный ответ на возникающие вызовы и новые биологические угрозы.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

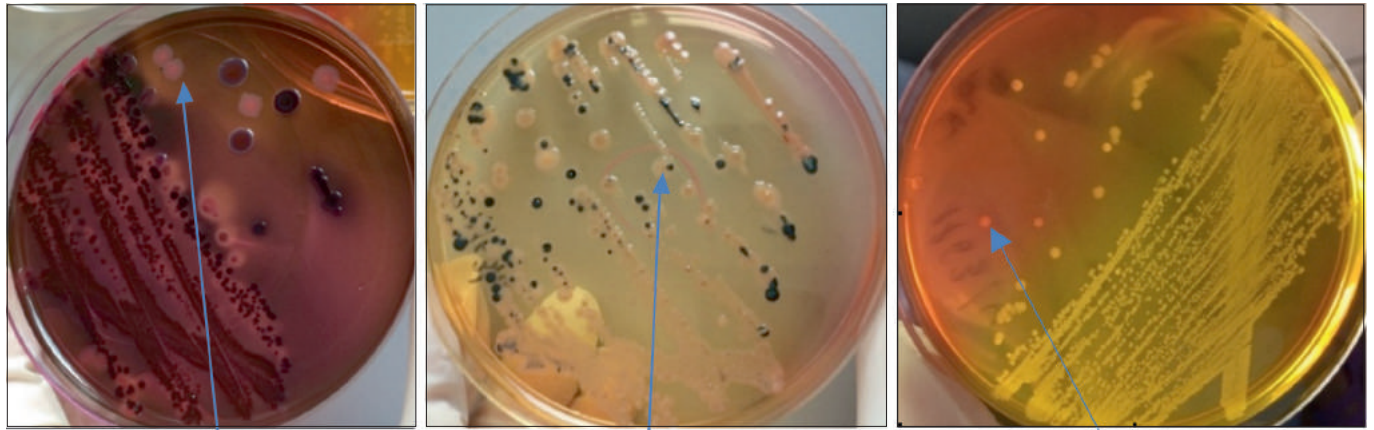
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Акимкин В.Г. Современные аспекты эпидемиологии и профилактики нозокомиального сальмонеллеза/Акимкин В.Г. *Медицинский совет*. 2013; 5-6: 33-9.
- Воробьев А.А., ред. *Медицинская микробиология, вирусология и иммунология*. Учебник для студентов медицинских вузов. 2-е изд., испр. и доп. М.: ООО Медицинское информационное агентство; 2012.
- Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин В.А., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60((8): 61-5.
- Здравоохранение в России. Статистический сборник. М., 2017.
- Методические рекомендации по применению магниева среды для выявления сальмонелл из испражнений больных и носителей, пищевых продуктов, сточных жидкостей и воды открытых водоемов от 20.06.1973. М.: МЗ СССР; 1973.
- Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями. МУ 04-723/3. М.: МЗ СССР; 1984.
- Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
- Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Клюкина Т.В. Основы клинической микробиологии и иммунологии: Учебное пособие. Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ; 2011.

9. Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеробактерий. М.: Династия; 2017.
 10. Шепелин И.А., Миронов А.Ю., Шепелин К.А. Питательные среды: Справочник бактериолога. 2-е изд. М: ЗАО А-Принт; 2015.
 11. Приказ Минздрава СССР № 535 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений, 1985.
 12. СП 3.1.7.2836-11. Профилактика сальмонеллеза. Санитарно-эпидемиологические правила. Изменения и дополнения № 1 к СП 3.1.7.2616-10. Зарег. в Минюсте РФ 14.03.2011 № 20089. М.; 2011.
 13. Лабинская А.С., Блиникова Л.П., Ешена А.С. *Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований*. Учебное пособие. 2-е изд. СПб: Лань; 2017.
 14. 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; 56 (4): 39-43.
 15. Шепелин А.П. Современное состояние и направления развития производства питательных сред в России. *Современная лабораторная диагностика*. 2015; 16 (2): 18-20.
 16. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 ((6) : 63-5.
-
- REFERENCES
1. Akimkin V.G. Modern aspects of epidemiology and prevention of nosocomial salmonellosis. *Medsitskiy sovet*. 2013; 5-6: 33-9. (in Russian)
 2. Vorob'ev A.A., ed. *Medical Microbiology, Virology and immunology* [Medsitsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: Uchebnik dlya studentov meditsinskikh vuzov]. 2nd ed. Moscow: ООО Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2012. (in Russian)
 3. Dyatlov I.A. The state and tendencies of development 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)
 4. Health in Russia [Zdravoohranenie v Rossii]. Statisticheskij sbornik. Moscow; 2017. (in Russian)
 5. Methodical recommendation of the use of Magnesium medium for identifying Salmonella in feces of patients and carriers, food products, sewage and open reservoir water of 20.06.1973. Moscow: Minzdrav SSSR; 1973. (in Russian)
 6. Guidelines for microbiological diagnosis of enterobacteria-associated diseases. MU 04-723/3. Moscow: Minzdrav SSSR; 1984. (in Russian)
 7. Methods to control bacteriological nutrient media. Methodical instructions. MUK 4.2.2316-08. Moscow: Federal Center for Hygiene & Epidemiology. Rospotrebnadzor; 2008. (in Russian)
 8. Mironov A.Yu., Kharseeva G.G., Klyukina T.V., eds. Fundamentals of clinical Microbiology and immunology [Osnovy klinicheskoy mikrobiologii i immunologii: Uchebnoe posobie]. Rostov-na-Donu: GOU VPO Rostovskiy gosudarstvennyi universitet; 2011. (in Russian)
 9. Shepelin A.P., Dyatlov I.A. Culture media for enterobacteria [Pital'nye sredy dlya jenterobakteriy. Monografiya]. Moscow: Dinastiya; 2017. (in Russian)
 10. Shepelin I.A., Mironov A.Yu., Shepelin K.A. Nutrient medium [Pital'nye sredy: Spravochnik bakteriologa]. 2nd ed. Moscow: ZAO A-Print; 2015. (in Russian)
 11. The order of Ministry of Health, USSR No.535 On unification of microbiological (bacteriological) research methods being used by clinical diagnostic laboratories structured into medical-preventive institutions. 1985. (in Russian)
 12. SR 3.1.7.2836-11 Prevention of salmonellosis. Sanitary and epidemiological rules. Moscow; 2011. (in Russian)
 13. Labinskaya A.S., Blinnikova L.P., Eshena A.S. eds. Private medical Microbiology with technique of microbiological researches [Chastnaya medicinskaya mikrobiologiya s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij :Uchebnoe posobie] 2rd ed. St. Peterburg: Lan'; 2017. (in Russian)
 14. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Dyatlov I.A. Nutrient media to identify staphylococci in clinical and sanitary microbiology. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie*. 2015; 56 (4): 39-43. (in Russian)
 15. Shepelin A.P. Current state and directions of development of culture medium production in Russia. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 16 (2): 18-20. (in Russian)
 16. Shepelin A.P. Modern approaches to the problem of import substitution in the production of culture media. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(6): 63-5. (in Russian)

Поступила 02.04.18
Принята к печати 25.05.18



Колонии, подозрительные на сальмонеллы, на среде Левина-ГРМ.

Колонии, подозрительные на сальмонеллы, на SS-агаре.

Колонии, подозрительные на сальмонеллы, на БФЛС-ГРМ-агаре.

Рис. 1. Рост на среде Левина-ГРМ, SS-агаре, БФЛС-ГРМ-агаре.



Рис. 2. Посев на SS-агар после накопления образца в магниевой среде.

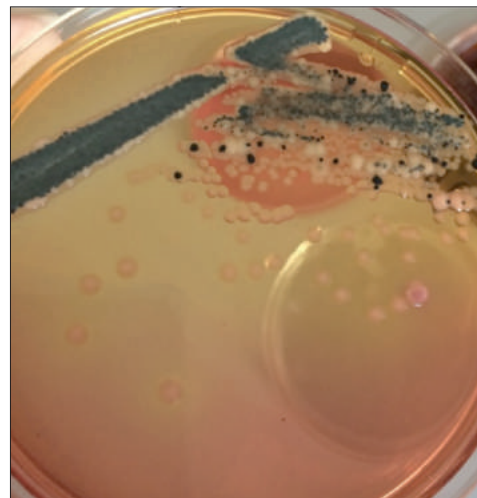


Рис. 3. Посев на SS-агар после накопления образца в селенитовом бульоне.



Рис. 4. РА на стекле с O-сывороткой.