

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.842.23.083.137

Бынина М. П., Андрюков Б. Г., Матосова Е. В., Ляпун И. Н., Дробот Е. И.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СРЕДЫ СЕРОВА И ОСНОВЫ СЕЛЕКТИВНОГО АГАРА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИЙ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова» (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова), 690087, Владивосток, Россия

*Интерес к проблеме энтеропатогенных иерсиниозов в мире связан с повсеместным распространением этих инфекций и клиническим значением их возбудителей – Yersinia enterocolitica и Yersinia pseudotuberculosis. Несмотря на появление новых средств диагностики, основным методом их верификации является культуральный. Американскими и Европейскими практическими руководствами рекомендован селективный питательный агар для иерсиний, который хорошо зарекомендовал себя во многих странах для выделения патогенных Yersinia из клинического материала. Проведено сравнение дифференциально-диагностических свойств этой питательной среды с одним из рекомендованных действующими отечественными нормативными документами субстратов для иерсиний – средой Серова. На основе проведённых исследований сделан вывод о том, что использование среды Серова для идентификации энтеропатогенных иерсиний по своим дифференциально-диагностическим свойствам не уступает зарубежному аналогу.*

**Ключевые слова:** основа селективного агара для иерсиний; среда Серова; Yersinia enterocolitica; Yersinia pseudotuberculosis.

**Для цитирования:** Бынина М. П., Андрюков Б. Г., Матосова Е. В., Ляпун И. Н., Дробот Е. И. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических свойств среды Серова и основы селективного агара для выделения энтеропатогенных иерсиний. Клиническая лабораторная диагностика 2018; 63 (9): 564-567. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-564-567>

*Bynina M. P., Andryukov B. G., Matosova E. V., Lyapun I. N., Drobot E. I.*

### A COMPARATIVE EVALUATION OF DIFFERENTIAL AND DIAGNOSTIC PROPERTIES OF THE SEROV'S AGAR MEDIUM AND THE BASE OF SELECTIVE AGAR FOR ISOLATING ENTEROPATHOGENIC YERSINIA

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

*The interest in the problem of enteropathogenic yersinioses in the world is associated with the ubiquitous distribution of these infections and the clinical significance of their pathogenic agents, Yersinia enterocolitica and Y. pseudotuberculosis. In spite of the novel diagnostic tools, microbiological cultivation on nutrient media still remains the main method of their verification. As an agar of choice, American and European practical guidelines recommend a selective agar for Yersinia, which is widely used in many countries for isolating pathogenic Yersinia from clinical material. The authors compare the differential and diagnostic properties of the base of selective agar with those of the Serov's agar medium, as one of the substrates for Yersinia recommended by the current Russian regulatory documents. Based on the studies conducted, a conclusion has been made that the Serov's agar medium is not inferior to its foreign analogue in the differential and diagnostic properties for identification of enteropathogenic Yersinia.*

**Key words:** the basis of selective agar for Yersinia; the Serov's agar medium; Yersinia enterocolitica; Yersinia pseudotuberculosis.

**For citation:** Bynina M. P., Andryukov B. G., Matosova E. V., Lyapun I. N., Drobot E. I. A comparative evaluation of differential and diagnostic properties of the Serov's agar medium and the base of selective agar for isolating enteropathogenic yersinia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (9): 564-567 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-564-567>

#### Information about authors:

Bynina M. P., <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>  
Andryukov B. G., <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>  
Matosova E. V., <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>  
Lyapun I. N., <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>  
Drobot E. I., <https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

**For correspondence:** Bynina M.P., junior researcher of the laboratory of molecular microbiology; e-mail: marina.bynina@mail.ru

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 28.04.2018  
Accepted 04.05.2018

**Введение.** Yersinia являются грамотрицательными бактериями, относящимися к семейству Enterobacteriaceae. На протяжении последних десятилетий энтеропатогенные

**Для корреспонденции:** Бынина Марина Павловна, мл. науч. сотр. лаб. молекулярной микробиологии; e-mail: marina.bynina@mail.ru

виды Y. enterocolitica и Y. pseudotuberculosis являются актуальными возбудителями таких серьёзных заболеваний людей и животных как кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулёз, характеризующихся различными клиническими проявлениями [1-3]. Интерес к проблеме иерсиниозов в мире, связанный с повсеместным распространением

этих инфекций и клиническим значением их возбудителей, возрастает с каждым годом [3, 4]. В значительной степени этому способствует генотипическая близость возбудителей иерсиниоза и псевдотуберкулеза с возбудителем чумы – *Yersinia pestis* [1, 5, 6].

Для изоляции *Yersinia* разработаны несколько питательных сред. Предложена основа селективного агара CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) в качестве альтернативы лактозосодержащим питательным средам MacConkey и Cellobiose-Arginine-Lysine (CAL-agar), используемым для выделения энтеропатогенных иерсиний [7, 8]. Добавление антибиотиков в эту питательную среду вызывает специфическое ингибирование грамотрицательных и грамположительных бактерий и высокую селективность в отношении выделения *Yersinia* spp. [3, 9].

Многолетнее использование основы селективного агара в бактериологических лабораториях зарубежных клиник при рутинных микробиологических исследованиях показало его высокую эффективность для идентификации энтеропатогенных иерсиний и селективные преимущества перед альтернативными питательными средами [3, 9]. Это дало основание авторитетным международным научно-медицинским обществам США (American Society for Microbiology, ASM) и Европы (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, ESCMID) рекомендовать использование основы селективного агара CIN в качестве стандарта лабораторной практики для выделения иерсиний [8, 10].

Отечественными нормативно-методическими документами в качестве питательных сред для культивирования иерсиний в клинических, санитарно-эпидемиологических, научных микробиологических исследованиях рекомендовано использовать дифференциально-диагностические питательные среды: Эндо, с бромтимоловым синим (СБТС) и Серова<sup>1,2</sup> [11]. Г. П. Сомов с соавт. в 2001 г. оценили селективные свойства указанных сред и сделали однозначные выводы в пользу среды Серова [12].

Цель работы состояла в сравнительном исследовании дифференциально-диагностических свойств питательной среды Серова и основы селективного агара для выделения энтеропатогенных бактерий рода *Yersinia*.

**Материал и методы.** В работе использованы клинические штаммы из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова: *Y. pseudotuberculosis* 512 (серотип 01b); *Y. enterocolitica* 4626 (серотип O:6.31).

Используемые питательные среды: дифференциально-диагностическая среда Серова для выделения иерсиний и основа селективного агара (HiMedia Laboratories) для выделения иерсиний, приготовленные в лаборатории питательных сред НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова.

Для посева на чашки с исследуемыми средами использовали суточную культуру, выращенную на питательном агаре. Культуру иерсиний на средах инкубировали в термостате при 37° С в течение 24 часов и подращивали при комнатной температуре (22°-24° С). Для иерсиний дополнительная и параллельная инкубация посевов при комнатной температуре обеспечивает более чёткое проявление биохимических свойств.

Описание культуральных свойств проводили визуально после окончательного культивирования. Морфологию микроорганизмов оценивали с использованием микроскопической системы после предварительной окраски бактерий по Граму. Одновременно проводили сравнительную оценку биохимических свойств выращивания культур.

**Результаты.** На среде Серова *Y. pseudotuberculosis* образовывали колонии неправильной формы диаметром до 5 мм, с перламутровым блеском и неровными фестончатыми краями и выпуклыми острыми тёмно-красными центрами. Поверхность колоний матовая. Консистенция плотная, при взятии петлей перемещается по поверхности среды (рис. 1, а, см.обложку).

На основе селективного агара колонии *Y. pseudotuberculosis* диаметром до 3 мм, круглые, с выпуклыми сосцевидными центрами малинного цвета. Периферическая зона прозрачная, нежная. Края ровные. Поверхность колоний блестящая. Легко снимается петлей (рис. 1, б, см.обложку).

Колонии *Y. enterocolitica* на среде Серова имели выпуклую форму в виде неправильных многоугольников с сосочками в центре тёмно-красного цвета. Края более светлые по сравнению с центром, опалесцирующие. Диаметр от 2 до 3 мм. Колонии более плотные по сравнению с *Y. pseudotuberculosis* и легко снимаются петлей (рис. 1, в, см.обложку).

На основе селективного агара колонии *Y. enterocolitica* правильной круглой формы, выпуклые, с более тёмными центрами и прозрачными краями. Блестящие, влажные («бычий глаз»). Диаметр до 3 мм. Колонии легко снимаются петлей (рис. 1, г, см.обложку).

На среде Серова клетки *Y. pseudotuberculosis* полиморфные, чаще овоидной формы. Располагаются по одному, в виде цепочек и небольшими скоплениями. Грамотрицательные. Окрашиваются биполярно (рис. 2, а).

На основе селективного агара *Y. pseudotuberculosis* полиморфной, чаще овоидной формы. Располагаются одиночно, короткими цепочками из 2-5 клеток или попарно. Грамотрицательные. Окрашивание равномерное и интенсивное (рис. 2, б).

На среде Серова клетки *Y. enterocolitica* полиморфные, чаще овоидной формы. С закруглёнными концами, мелкие. С выраженным биполярным окрашиванием. Грамотрицательные. Формирует короткие цепочки чаще из клеток овоидной формы (рис. 2, в).

На основе селективного агара *Y. enterocolitica* клетки палочковидные с закругленными краями и более удлинённой формы, чем на среде Серова (рис. 2, г).

**Обсуждение.** Многообразие клинических проявлений иерсиниозов часто скрывается под маской других заболеваний, поэтому правильная и своевременная верификация их возбудителей играют решающую роль в проведении лечебных и профилактических мероприятий [13].

За последние годы появились новые иммунологические и молекулярно-генетические технологии, позволившие значительно улучшить диагностику иерсиниозов [14, 15], но золотым стандартом по-прежнему остаётся культуральный метод, не утративший своего значения [1, 3, 16].

<sup>1</sup> Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. М.: Медицина; 1986.

<sup>2</sup> Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза: МУ 3.1.1.2438-09. М.: Госсанэпиднадзор; 2009.

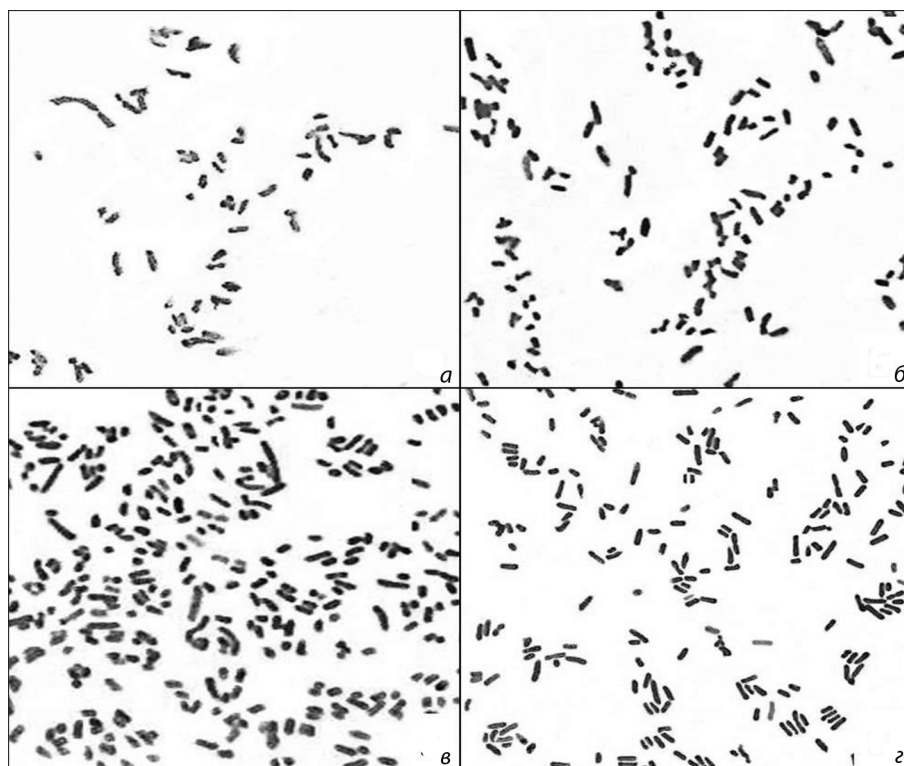


Рис. 2. Морфология *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* выращенные на среде Серова и на основе селективного агара. а – *Y. pseudotuberculosis* на среде Серова; б – *Y. pseudotuberculosis* на основе селективного агара; в – *Y. enterocolitica* на среде Серова; г – *Y. enterocolitica* на основе селективного агара.

Анализ состава исследуемых питательных сред позволяет выявить особенности селективного агара и дифференциально-диагностической среды Серова для выделения энтеропатогенных иерсиний (см. таблицу).

В среде Серова источником углерода служит мочевины и глюкоза, в соответствии с основными потребностями иерсиний. В качестве индикаторов используются водные растворы конго-рот и генцианвиолета, которые усиливают селективные свойства среды и при наложении друг на друга дают тёмно-красный цвет, что позволяет дифференцировать бактерии рода *Yersinia* и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Добавление в среду 30% водного раствора сухой желчи подавляет рост *Proteae*. В качестве питательных веществ и для стимуляции роста – сухой агар и молибденовокислый аммоний. Генцианвиолет подавляет кокковую флору, находящуюся в исследуемом материале.

В основе селективного агара источником углерода служит маннит. Ингибитором грамположительной контаминирующей микрофлоры является дезоксихолат натрия, в качестве индикатора кислотообразования – генцианвиолет. Иерсинии окисляют маннит с образованием кислоты, поэтому колонии окрашиваются в красный цвет вследствие изменения цвета индикатора генцианвиолета. Источником питательных веществ необходимых для

роста микроорганизмов является агар-агар и дрожжевой экстракт. Пируват натрия ослабляет токсический эффект кислорода и способствуют росту иерсиний, тогда как хлорид натрия поддерживает осмотический баланс. Сульфат магния является поставщиком ионов магния, необходимых в различных ферментативных реакциях и репликации ДНК. Сопутствующая грамотрицательная микрофлора подавляется смесью антибиотиков (селективная CIN-добавка).

Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10273-2013 для выделения энтеропатогенных иерсиний из разных клинических материалов и пищевых продуктов (для ветеринарии) рекомендует использовать основу с селективными добавками<sup>3</sup>. Но при этом отсутствие разрешения на использование основы селективного агара в нормативной документации РФ ограничивает законность её применения в клинической микробиологии<sup>4</sup>.

При использовании с селективными добавками основа для выделения иерсиний рекомендуется Межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10273-2013 для выделения энтеропатогенных иерсиний из разных клинических материалов и пищевых продуктов (для ветеринарии). На территории РФ основа селективного агара для выделения иерсиний разрешена для продажи<sup>5</sup>.

<sup>3</sup>ГОСТ ISO 10273-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения условно-патогенной бактерии *Yersinia enterocolitica*. М.: Стандартинформ; 2014.

Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. М.: Медицина; 1986.

<sup>5</sup>Регистрационное удостоверение на медицинское изделие МЗ РФ №2003/1663 от 23.12.2003 выданное Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (РОСЗДРАВНАДЗОР).

**Состав исследуемых дифференциально-диагностических сред для выделения иерсиний**

Дифференциально-диагностическая среда Серова	Основа селективного агара для иерсиний
Сухой агар	Агар-агар
Молибденовокислый аммоний	Дрожжевой экстракт
Конго-рот	Конго-рот
Генцианвиолета	Генцианвиолет
Раствор сухой желчи	Натрия дезоксихолат
Мочевина	Маннит
Глюкоза	Натрия пируват
Сода безводная	Магния сульфат
	Натрия хлорид
	Пептон специальный

**Заключение.** На основе проведенных исследований, можно сделать вывод о возможности использования основы селективного агара для идентификации энтеропатогенных бактерий рода *Yersinia*. Среда Серова, применяемая в РФ для идентификации иерсиний, по своим дифференциально-диагностическим свойствам не уступает основе селективного агара. Сложность в изготовлении среды Серова затрудняет её выпуск в промышленном масштабе, влияет на качество стандартизации и длительность приготовления в лабораторных условиях.

Стоит обратить внимание на то, что использование рекомендованных нормативными документами РФ питательных сред в научных микробиологических исследованиях, связанных с выделением *Yersinia*, ограничивает возможность публикаций полученных результатов в зарубежной печати.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-10, 13-16 см. REFERENCES)

- Смирнов И.В. Возбудитель иерсиниоза и близкие к нему микроорганизмы. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2004; 6(1): 10-21.
- Сомова Л.М., Андруков Б.Г., Плехова Н.Г. Проблема иерсиниозов в современном мире. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 12(4): 661-7.
- Панин А.Л., Краева Л.А., Сбойчаков В.Б., Белов А.Б., Болахан В.Н., Власов Д.Ю. и др. Микробиологический мониторинг иерсиний как основа санитарно - эпидемиологического надзора за иерсиниозами в организованных коллективах. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(3): 217-28.
- Сомов Г.П. Современное представление о сапронозах (основные итоги изучения проблемы). *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2001; 2. 67-73.

REFERENCES

- Smirnov I.V. The causative agent of yersiniosis and microorganisms close to it. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2004; 6 (1): 10-21 (in Russian)
- Somova L.M., Andrukov B.G., Plekhova N.G. The Yersinia-caused infections problem in modern world. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015; 12 (4): 661-7. (in Russian)
- Tan L.K., Ooi P.T., Carniel E., Thong K.L. Evaluation of a modified Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar for isolation of *Yersinia* spp. *PLoS One*. 2014; 9(8):e106329.
- Galindo C.L. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J. Pathog.* 2011; 2011: 182051.
- Martínez-Chavarría L.C., Vadyvaloo V. Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis infection: a regulatory RNA perspective. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 956.
- Fukushima H., Gomyoda M. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype O3 inhibited on cefsulodin-Irgasan-novobiocin agar. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24(1):116-20.
- Schiemann D.A. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.* 1979; 25:1298-1304.
- Clinical microbiology procedures handbook. American Society Press for Microbiology. 6<sup>th</sup>. Henry D. Isenberg, ed. Washington DC: ASM Press; 2012.
- González M., Gude M.J., Seral C., Abad M.P., Algarate S. Castillo F. Comparación de dos métodos para la recuperación de *Aeromonas* spp. de heces a partir de agar CIN (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina). *Rev. Esp. Quimioter.* 2010; 23(4):217-8.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC. *Official Journal L262*. 2000:0021-0045.
- Panin A.L., Kraeva L.A., Sboychakov V.B., Belov A.B., Bolekhan V.N., Vlasov D.Yu. et al. Microbiological monitoring of *Yersinia* as the basis of sanitary and epidemiological surveillance of yersiniosis in organized groups. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3 (3): 217-28. (in Russian)
- Somov G.P. The modern idea of sapronoses (the main results of the study of the problem). *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2001; 2. 67-73. (in Russian)
- Dekker J.P., Frank K.M. *Salmonella, Shigella and Yersinia*. *Clin. Lab. Med.* 2015; 35(2): 225-46.
- Kalia V.C., Kumar P. Genome Wide Search for Biomarkers to Diagnose *Yersinia* Infections. *Indian. J. Microbiol.* 2015; 55(4): 366-74.
- Jaakkola K., Somervuo P., Korkeala H.. Comparative Genomic Hybridization Analysis of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* Identifies Genetic Traits to Elucidate Their Different Ecologies. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 760494.
- Priyanka B., Patil R.K., Dwarakanath S. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian J. Med. Res.* 2016; 144(3):327-38.

Поступила 28.04.18  
Принята к печати 04.05.18

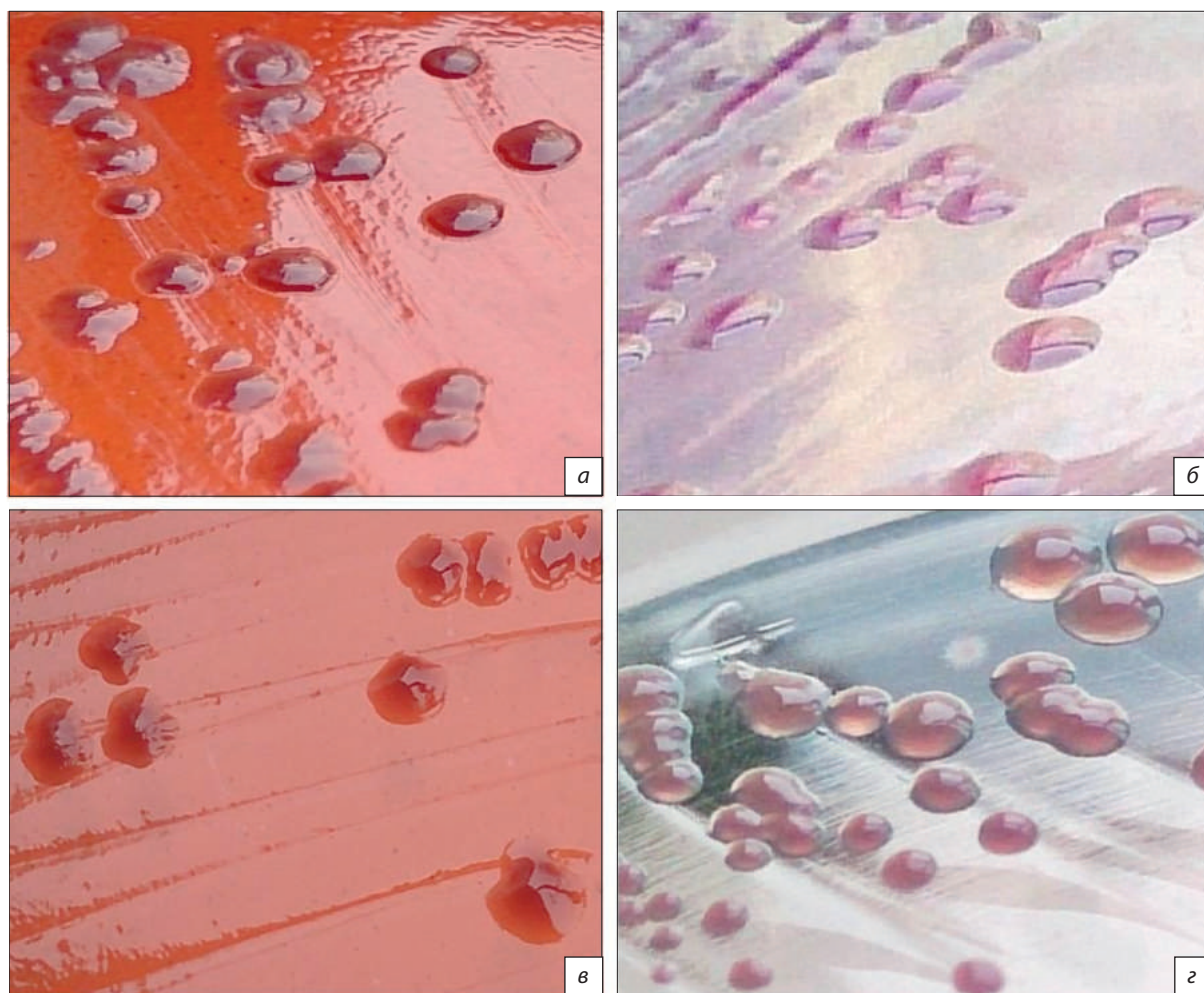


Рис. 1. Колонии *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* выращенные на среде Серова и на основе селективного агара. *a* – *Y. pseudotuberculosis* на среде Серова; *б* – *Y. pseudotuberculosis* на основе селективного агара; *в* – *Y. enterocolitica* на среде Серова; *г* – *Y. enterocolitica* на основе селективного агара.