

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Домотенко Л.В.¹, Косилова И.С.¹, Миронов А.Ю.^{2,3}, Подкопаев Я.В.¹,
Мицевич И.П.¹, Храмов М.В.¹



<https://elibrary.ru/oqwgth>

АЛГОРИТМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОТУЛИЗМА

¹ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Роспотребнадзора, 142279, Московская область, г. о. Серпухов, п. Оболенск, Россия;

²ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

³Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, Москва, Россия

Один из этапов расследования вспышки ботулизма летом 2024 года заключался в выделении возбудителя инфекции с использованием питательных сред. В Российской Федерации отсутствует промышленный выпуск специальных сред данного назначения.

Цель - оценка возможности использования коммерческих отечественных питательных сред, предназначенных для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих клостридий, при выделении *Clostridium botulinum* из клинических образцов и пищевых продуктов.

Материал и методы. Исследовано 440 образцов биологического материала человека, пищевой продукции, упаковочного материала с использованием отечественных питательных сред Китта-Тароцци, тиогликолевой среды, сульфитного агара с добавлением желточной эмульсии и D-циклосерина, импортных питательных сред специального назначения в качестве контрольных.

Результаты. Выделение возбудителя проведено из необработанных и обработанных образцов для уничтожения вегетативных бактерий и извлечения спор бактерий, высевая одновременно на все питательные среды неселективные среды обогащения и селективные плотные среды. Показано, что отечественная среда Китта-Тароцци по своей специфической активности не уступает импортному бульону с печенью. На сульфитном агаре с добавлением желточной эмульсии и цикloserина и на *Clostridium botulinum Isolation Agar Base* с желточной эмульсией и специальной селективной добавкой для *C. botulinum* выделены штаммы возбудителя ботулизма из одних и тех же образцов. Всего в 25 из 440 поступивших образцов обнаружены и выделены штаммы *C. botulinum*, подтвержденные микроскопией мазков, окрашенных по Граму и фазово-контрастной микроскопией, с наличием продукции ботулотоксинов типа А и В биологическим и молекулярно-генетическим методами.

Заключение. Показана возможность использования отечественных питательных сред при выделении возбудителя ботулизма из клинического материала и пищевых продуктов и необходимость промышленного выпуска отечественной специальной питательной среды для выделения *C. botulinum*.

Ключевые слова: ботулизм; *C. botulinum*; питательные среды; сульфитный агар; среда Китта-Тароцци; селективная добавка; желточная эмульсия; цикloserин

Для цитирования: Домотенко Л.В., Косилова И.С., Миронов А.Ю., Подкопаев Я.В., Мицевич И.П., Храмов М.В. Алгоритм использования отечественных питательных сред для выделения возбудителя ботулизма. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (3): 196-203.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-196-203>

EDN: OQWGTH

Для корреспонденции: Косилова Ирина Сергеевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. разработки питательных сред; e-mail: kosilova.irina@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 09.10.2024

Принята к печати 26.12.2024

Опубликовано 25.02.2025

Domotenko L.V.¹, Kosilova I.S.¹, Mironov A.Yu.^{2,3}, Podkopaev Ya.V.¹, Mitzevich I.P.¹, Khramov M.V.¹

THE ALGORITHM OF USING RUSSIA-MADE NUTRIENT MEDIA TO ISOLATE THE CAUSATIVE AGENT OF BOTULISM

¹Federal Budgetary Institution of Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, 142279, Obolensk setl., Serpukhov dtr., Moscow region, Russia;

²Federal Budgetary Institution of Science G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology, Rosпотребнадзор, 125212, Moscow, Russia;

³Federal research and clinical center of specialized medical care and medical technologies FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia

One of the stages of the investigation of the botulism outbreak this summer was to isolate the infectious agent using nutrient media. There is currently no industrial production of special media for this purpose in the Russian Federation.

Objective. To evaluate the possibility of using commercial national nutrient media for anaerobic microorganisms and sulfite-reducing clostridia when isolating *C. botulinum* from clinical samples and food produces.

Material and methods. The work examined 440 samples of human biological material, food products and packaging material using domestic Kitt-Tarozzi media, thioglycollate medium and sulfite agar with the addition of yolk emulsion and D-cycloserine, as well as imported special-purpose media as controls.

Results. The pathogen was isolated from untreated and treated samples to destroy vegetative bacteria and extract bacterial spores, seeding simultaneously on all media: non-selective enrichment media and selective agar media. It was shown that the domestic Kitt-Tarozzi medium is not inferior in its specific activity to foreign liver broth, and strains of the causative agent of botulism were isolated from the same samples on sulfite agar (with the addition of yolk emulsion and cycloserine) and on *Clostridium botulinum* Isolation Agar Base with yolk emulsion and a special selective supplement for botulism clostridia. In total, *C. botulinum* strains were detected and isolated in 25 of the 440 samples received, confirmed by Gram staining of smears and phase-contrast microscopy, as well as the presence of production of botulinum toxins of types A and B by biological and molecular genetic methods.

Conclusion. The possibility of using Russia-made media for isolating the causative agent of botulism from clinical material and food products and the need for industrial production of a special nutrient medium for isolating *C. botulinum* are shown.

Key words: botulism; *C. botulinum*; nutrient media; sulfite agar; Kitt-Tarozzi; selective additive; yolk emulsion; cycloserine

For citation: Domotenko L.V., Kosilova I.S., Mironov A.Yu., Podkopaev Ya.V., Mitzevich I.P., Khramov M.V. Algorithm for using domestic nutrient media to isolate the causative agent of botulism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 196-203 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-196-203>

EDN: OQWGTH

For correspondence: Kosilova Irina Sergeevna, PhD (Biol.), Researcher Nutrient Medium Development Laboratory; e-mail: kosilova.irina@gmail.com

Information about authors:

Domotenko L.V., <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>;

Kosilova I.S., <https://orcid.org/0000-0003-4020-0894>;

Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;

Podkopaev Ya.V., <https://orcid.org/0000-0002-3420-3661>;

Mitzevich I.P., <https://orcid.org/0000-0003-2324-502X>;

Khramov M.V., <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 09.10.2024

Accepted 26.12.2024

Published 25.02.2025

Ботулизм – острое токсико-инфекционное заболевание, возникающее в результате употребления в пищу продуктов, контаминированных спорами *Clostridium botulinum* и, в редких случаях, штаммами близкородственных видов (*C. baratii* и *C. butyricum*) [1, 14]. Споры этих микроорганизмов распространены повсеместно в окружающей среде, способны неограниченно долго выживать в большинстве естественных условий, при кипячении и других обычных способах приготовления пищи [14].

Возбудитель ботулизма *C. botulinum* – грамположительные палочковидные анаэробные спорообразующие подвижные бактерии рода *Clostridium*. Таксономическим признаком этих бактерий является их способность синтезировать ботулинический нейротоксин (ботулотоксин), вызывающий у человека и животных ботулизм [2, 3, 14]. *C. botulinum* продуцирует восемь типов ботулотоксинов: А, В, С, D, Е, F, G, H [14]. В зависимости от типов и субтипов ботулотоксинов, культуральных, ферментативных и генетических свойств, особенностей экологии *C. botulinum* подразделяются на шесть фенотипических групп, существенно отличающихся друг от друга. Клостридии групп I, II, IV, V и VI вызывают ботулизм у человека, группы III – у животных [4].

Поскольку ботулизм является смертельно опасным для человека заболеванием, ранний и точный диагноз имеет решающее значение при назначении больному схемы лечения [5, 6]. Сложность диагностики бо-

тулизма на ранней стадии болезни связана с тем, что заболевание встречается относительно редко, поэтому врачи его часто не распознают или диагностируют неправильно, принимая за другие болезни с нервно-паралитическими симптомами или с симптомами пищевой токсикоинфекции [7, 16].

Клиническая лабораторная диагностика ботулизма, проводимая для подтверждения клинически предполагаемых случаев, включает индикацию и идентификацию ботулотоксина при исследовании крови, фекалий, рвотных масс, промывных вод желудка или раневого отделяемого (при раневом ботулизме), выделение из них чистой культуры возбудителя [14]. Лабораторные исследования также выполняют при эпидемиологических расследованиях для выявления продукта питания – предполагаемого источника ботулотоксина [8, 14].

Детекцию и идентификацию ботулотоксина проводят в реакции нейтрализации ботулотоксинов антиботулотоксинами сыворотками с биопробой на мышах, считающейся «золотым стандартом», и с помощью современных иммунохимических и молекулярно-генетических методов [9, 14].

Детекция ботулотоксина биологическим методом требует наличия лабораторных белых мышей и опытных специалистов, поэтому биопробу проводят только в специализированных микробиологических лабораториях. Более доступны диагностические тесты, способные быстро и точно идентифицировать ботулотоксин

в клиническом материале и продуктах питания: иммуноферментный анализ, иммуно-ПЦР, хемилюминесцентный иммунный блот, иммунохроматография, эндопептидазный тест, масс-спектрометрический метод (Endoper-MS), ПЦР-тест-системы как в классическом режиме, так и в режиме реального времени [4, 14]. Преимущественно, все эти тесты импортного производства. На сайте Росздравнадзора удалось найти только одно отечественное зарегистрированное медицинское изделие – набор реагентов для определения ботулинического нейротоксина типа А методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR-BoNT/A») (регистрационное удостоверение РЗН 2014/1424) [10].

Для селективного выделения возбудителя ботулизма в России отсутствуют специальные отечественные питательные среды [15, 18]. Такая ситуация объясняется, во-первых, редкостью появления ботулизма и, во-вторых, отсутствием современных стандартов по клинической лабораторной диагностике болезни и алгоритмов проведения эпидемиологического расследования, в которых имелись бы рекомендации по схеме исследований и выбору диагностических тест-систем и питательных сред. В утвержденных в 2021 году клинических рекомендациях «Ботулизм у детей» в разделе по специфической лабораторной диагностике ботулизма указано, что за данной информацией следует обращаться к научным публикациям¹, а действующий ГОСТ 10444.7-86², регламентирующий методы выявления ботулинических токсинов и *C. botulinum*, уже давно устарел и ориентируется только на питательные среды лабораторного изготовления. В руководстве по диагностике и лечению ботулизма Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC) также не приводятся рекомендации по выбору питательных сред [7,8].

Перечень питательных сред, выпускаемых зарубежными фирмами-производителями питательных сред, включает *Clostridium botulinum* isolation agar (CBI agar), содержащий желточную эмульсию для дифференциации на основе липазной активности ботулинических токсинов типов А, В, F и специальную селективную добавку; Reinforced clostridial agar (улучшенный кластридальный агар) для культивирования и учёта кластридий, других анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в пищевых продуктах и других объектах в комплекте со специальной селективной добавкой; Агар для кластридий М497, используемый для селективного выделения *Clostridium* spp. из смешанных культур в клиническом или другом материале, бульона с говяжьей печенью (Chopped Liver Broth), сульфит полимиксин сульфадiazин агар (SPS agar - sulfite polymyxin sulfadiazine agar), триптозо-декстрозный агар с циклосерином (Tryptose Cycloserine Dextrose Agar) и др. [7, 9, 15].

В ходе проведения эпидемиологического расследования массовых случаев ботулизма в России в июне 2024 года, вызванных употреблением пищевой продукции, приготовленной с нарушением правил и технологий, в испытательный лабораторный центр ФБУН ГНЦ ПМБ поступило большое количество образцов пищевой продукции и биологического материала. Все посту-

пившие образцы отправлены на бактериологическое исследование с целью обнаружения в них *C. botulinum* и изучения фенотипических и молекулярно-генетических свойств клинических изолятов для оценки эпидемиологической ситуации, прогноза её развития на будущие периоды, для разработки профилактических противоэпидемических мероприятий.

В исследовании использованы коммерческие питательные среды для выделения *C. botulinum* зарубежных производителей и отечественные питательные среды для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих кластридий.

Цель исследования: оценка возможности использования коммерческих отечественных питательных сред, предназначенных для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих кластридий, при выделении *C. botulinum* из клинических образцов и пищевых продуктов.

Материал и методы. Исследованы 440 анализов, подозрительных на наличие *C. botulinum*, из которых 275 образцов биологического материала человека (фекалии, промывные воды желудка, рвотные массы, кровь, аутопсийный материал), 163 образца пищевой продукции (салат в закрытой упаковке, остатки салата, отобранных в домашних очагах пострадавших, фасоль и др.), 2 образца упаковочного материала.

В работе использованы референс-штаммы *C. botulinum* ATCC 19397 (продуцирующий ботулотоксин типа А) и *C. botulinum* NCTC 7273 (продуцирующий ботулотоксин типа В), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ-Оболенск) в лиофилизированном виде.

Отбор и подготовка образцов пищевых продуктов и упаковочного материала проведены в соответствии с требованиями ГОСТ 10444.7-86², подготовка биологического материала - в соответствии с зарубежными рекомендациями [8, 9].

В работе использованы питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ: питательная среда для культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов - среда Китта-Тароцци (кат. № O230, годна до 05.2026); питательная среда для контроля стерильности сухая ((Тиогликолевая среда (ТГС), кат. № 0-56-К-309, годна до 07.2026)); питательная среда для выявления кластридий по сульфитредуцирующему признаку сухая «Сульфитный агар» модификации 3 (кат. № 0-79-К-17, годна до 03.2026); сульфитный агар модификации 3 (кат. № 0-79-К-17, годен до 03.2026) с добавлением 50,0 мл/л желточной эмульсии лабораторного приготовления по ГОСТ Р 52815-2007³ и 0,4 г/л D-циклосерина (NeoFroxx, кат. № 2377GR005, годен до 05.2027).

В качестве питательных сред сравнения (контрольных питательных сред) использован бульон с печенью для выделения и культивирования анаэробных микроорганизмов *Clostridium botulinum* из продуктов (HiMedia, кат. № M 606, годен до 08.2025); *Clostridium botulinum* Isolation Agar Base (CBI-agar, HiMedia, кат. № M 911, годен до 04.2027) с добавлением эмульсии яичного желтка (HiMedia, кат. FD045, годен до 11.2024) и селективной добавки для кластридий ботулизма (HiMedia, кат. № FD049, годен до 10.2024); RCA-agar (Merck, кат. № 105410, годен до 08.2025) с 7% дефибрированной

¹ Клинические рекомендации «Ботулизм у детей - 2021-2022-2023 (09.11.2021). Утверждены Министерством здравоохранения РФ».

² ГОСТ 10444.7-86 «Продукты пищевые: методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*». М.: Стандартинформ; 2010.

³ГОСТ Р 52815-2007 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*». М.: Стандартинформ; 2010.

бараньей крови (ООО ГЕМ, кат. № 620100) и селективной добавкой для клостридий ботулизма (HiMedia, кат. № FD049, годен до 10.2024). Все посеы инкубировали в анаэроостате АЭ-01 (ТУ 9443-005-04699534-2010) с газогенерирующими анаэробными пакетами с индикатором GasPak (BD, кат № 260001).

Результаты обработаны статистически при помощи пакета программ MS-Excel. Достоверность различных средних величин оценена с использованием t-критерия Стьюдента. В сравнительном анализе использован двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты. Культивирование референс-штаммов *C. botulinum*. Перед началом исследования изучено поведение референс-штаммов *C. botulinum* ATCC 19397 тип А и *C. botulinum* NCTC 7273 тип В на сульфитном агаре, предназначенном для выявления клостридий по сульфитредуцирующему признаку, ранее не используемому для работы с *C. botulinum*. Референс-штаммы восстановлены из лиофилизированного состояния инкубацией на среде Китта-Тароцци при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. Оба референс-штамма демонстрировали типичный рост для анаэробов на данной питательной среде в виде диффузного помутнения

с прозоной в верхней части столбика среды.

Восстановленные штаммы пересеивали на сульфитный агар модификации 3 глубинным способом и на сульфитный агар той же модификации с желточной эмульсией и циклосерином поверхностным способом. Посевы инкубировали при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 24 часа инкубации на сульфитном агаре при глубинном посеве в пробирках отмечен рост референс-штаммов в виде диффузного почернения столбика питательной среды с прозоной в верхней части. Почернение происходит за счёт восстановления *C. botulinum* сульфит-иона, входящего в состав питательной среды, до сульфид-иона, вступающего в реакцию с ионами железа, образуя чёрный осадок.

На сульфитном агаре с желточной эмульсией и циклосерином наблюдали рост выпуклых шероховатых, немного расплывчатых колоний с неровными краями, окруженных узкой, около 1-2 мм «жемчужной» зоной, повторяющей контур колоний (рис. 1). Проявление на данных питательных средах радужной окраски («жемчужной» зоны) вокруг колоний, является характерным признаком для *C. botulinum*, обладающих липазной активностью.

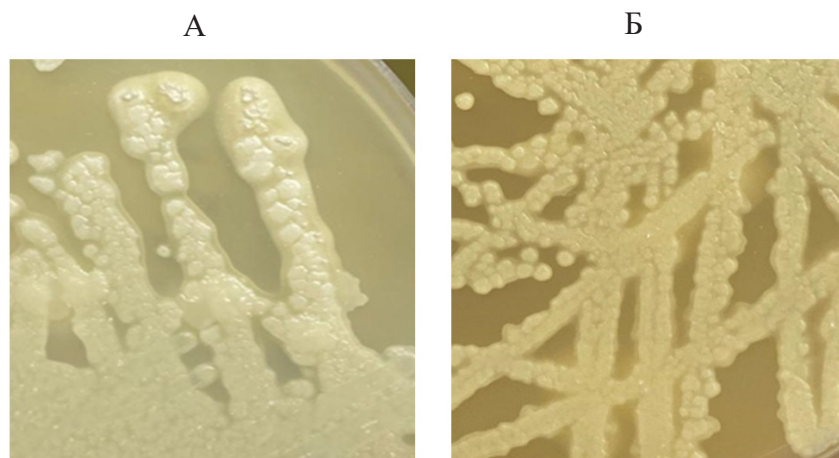


Рис. 1. Рост референс-штаммов на сульфитном агаре с желточной эмульсией и циклосерином: А – *C. botulinum* ATCC 19397; Б – *C. botulinum* NCTC 7273.

В некоторых публикациях проявление липазной активности в виде «жемчужной» или «перламутровой» зоны вокруг колоний *C. botulinum* на поверхности питательной среды ошибочно описывают как зоны лецитиназной активности. При наличии фермента лецитиназы у бактерий наблюдается образование непрозрачного ореола вокруг колоний, а для большинства типов *C. botulinum* характерно образование липазы, и лишь некоторые штаммы образуют лецитиназу [9-12, 14].

Выделение *C. botulinum* из клинических образцов и пищевых продуктов. Поступившие в лабораторию образцы распределены в зависимости от физического состояния по категориям: 1) твёрдые образцы (аутопсийный материал, салаты, остатки салатов, фасоль); 2) полутвёрдые образцы (фекалии, промывные воды, рвотные массы); 3) жидкие образцы (кровь). Подготовка образцов для анализа проведена в асептических условиях с использованием стерильной посуды и стерильного 0,9% раствора натрия хлорида (NaCl). Твёрдые и полутвёрдые образцы в количестве от 2 до 25 г (в

зависимости от объёмов, поступивших на анализ) переносили в ёмкость и с помощью блендера измельчали до однородного состояния. Измельчённый образец переносили в колбу с раствором NaCl в равных объёмных соотношениях. Жидкие образцы в количестве 20-25 мл переносили в колбу, добавляли равный объём раствора NaCl и осторожно перемешивали. Все подготовленные исследуемые образцы выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут.

Измельченные образцы делили на три равные навески. Первую навеску использовали без обработки, вторую - обрабатывали 96% этиловым спиртом в равных объёмных соотношениях, выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа и периодически встряхивали, третью навеску прогревали при температуре 80°C в течение 15 минут, проводя таким образом селективное выделение спор из исследуемых образцов.

Каждую навеску высевали по 0,1-0,2 мл на плотные питательные среды и на среды обогащения (в соотношении 1:9). Количество засеянных питательных сред

всех наименований рассчитывали с учётом инкубации в анаэробных условиях при двух температурах (30 ± 1) °C и (36 ± 1) °C. Как правило, на всех питательных средах рост исследуемых образцов при температуре инкубирования (36 ± 1) °C интенсивнее.

При первичном посеве в случае появления через 24-48 ч инкубации роста микроорганизмов на средах обогащения, засеянных обработанными образцами, производили высев с них на плотные питательные среды. При одновременном появлении роста из тех же образцов на плотных средах их вторичный посев не производили.

Через 24-48 часов инкубации практически все необработанные образцы показали рост микроорганизмов на средах обогащения в виде помутнения разной степени интенсивности (некоторые – с признаками газообразования): по 433 образца на бульоне с печенью и среде Китта-Тароцци, и 419 – на ТГС (см. таблицу).

Из обработанных образцов рост микроорганизмов на тех же питательных средах получен в меньшем количестве, поскольку в этих условиях обычно погибают аэробные микроорганизмы и вегетативные формы анаэробов, но сохраняются споры *C. botulinum*. Суще-

ственному снижению интенсивности роста микроорганизмов из исследуемых образцов способствовала их обработка нагреванием в течение 15 мин при температуре 80 °C. При обработке 96% этиловым спиртом рост микроорганизмов наблюдали на бульоне с печенью, среде Китта-Тароцци, ТГС из 108, 109 и 95 образцов, соответственно; при обработке нагреванием рост микроорганизмов отмечен на тех же питательных средах из 42, 42 и 35 образцов, соответственно.

При первичном посеве на плотные питательные среды обработанных и необработанных образцов рост микроорганизмов появлялся, как правило, через 48-72 ч и наблюдался в меньшем количестве случаев (примерно на 70-75% меньше, чем на неселективных средах обогащения). На количество проб с видимым ростом микроорганизмов оказывали влияние анаэробные условия инкубации посевов, наличие селективных добавок в питательных средах, содержащих циклосерин или комбинацию циклосерина, триметоприма и сульфометаксозола. При отсутствии признаков роста посе-вы продолжали инкубировать до 5 суток и на средах обогащения, и на плотных питательных средах.

Аналит, из которого получен рост микроорганизмов на питательных средах

Питательные среды	Условия обработки исследуемых образцов				
	Без обработки (исходный образец)	96% этиловый спирт		Нагрев 80 °C 15 минут	
		Всего образцов с ростом	Образцы с типичным ростом для <i>C. botulinum</i>	Всего образцов с ростом	Образцы с типичным ростом <i>C. botulinum</i>
Среды обогащения					
Бульон с печенью	433	108	-*	42	-
Среда Китта-Тароцци	433	109	-	42	-
ТГС	419	95	-	35	-
Плотные среды					
СВИ-агар с ЖЭ и СД	109	31	25	27	24
Сульфитный агар с ЖЭ и циклосерином	110	34	25	31	25

Примечание. * - Признак нельзя идентифицировать; ЖЭ - желточная эмульсия; СД - селективная добавка.

Использование селективных питательных сред позволило значительно снизить количество большинства сопутствующих микроорганизмов в исследованных образцах, которые росли на питательных средах, в основном, в виде небольших или точечных колоний, которые легко можно отличить от липазоположительных колоний *C. botulinum*. Благодаря высоким селективным

свойствам плотных питательных сред рост микроорганизмов на них наблюдался только из 27-34 обработанных образцов. Только из 20-25 образцов, в зависимости от условий обработки, на питательных средах с желточной эмульсией обнаружены колонии липазоположительных *C. botulinum* (рис. 2). По морфологии колонии, выделенные из пищевых продуктов и материала чело-

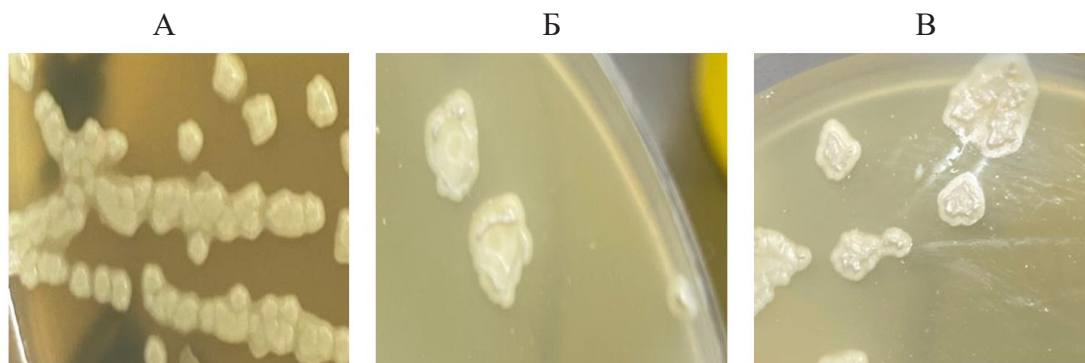


Рис. 2. Рост клинических изолятов *C. botulinum*: А – на контрольной питательной среде *Clostridium botulinum* Isolation Agar Base; Б и В – на сульфитном агаре с желточной эмульсией и циклосерином.

века, не отличались между собой.

Обработка исследуемых образцов спиртом или нагреванием может приводить к гибели спор клостридий (особенно при небольшом количестве в образцах) или к потере проявления липазной активности [13]. Возможно поэтому при первичном посеве одного исследуемого образца рост единичных колоний *C. botulinum* получен только на сульфитном агаре с добавками, а на импортном аналоге из этого же образца наблюдали рост лишь при вторичном высеве из среды обогащения.

На кровяном агаре RCA-agar *C. botulinum* формировали серые колонии с неровными краями, полупрозрачные или непрозрачные; чаще с узкой зоной β -гемолиза, проявление которого зависело от температуры инкубации.

Результаты испытаний по выделению *C. botulinum*

на питательных средах с желточной эмульсией представлены в таблице.

Предполагаемые колонии *C. botulinum*, выросшие на плотных питательных средах, отобраны для окраски по Граму и микроскопического исследования, и для детекции ботулотоксина биологическим и молекулярно-генетическим методами.

Бактериоскопия мазков, окрашенных по Граму выявила крупные грамположительные палочки с закруглёнными концами. В мазках, сделанных из колоний, хранившихся на воздухе при комнатной температуре в течение 6–8 ч, и в препаратах «раздавленная капля», хранившихся в течение суток, наблюдали клетки с терминально расположенными спорами овальной формы в виде «теннисной ракетки», характерные для *C. botulinum* (рис. 3).

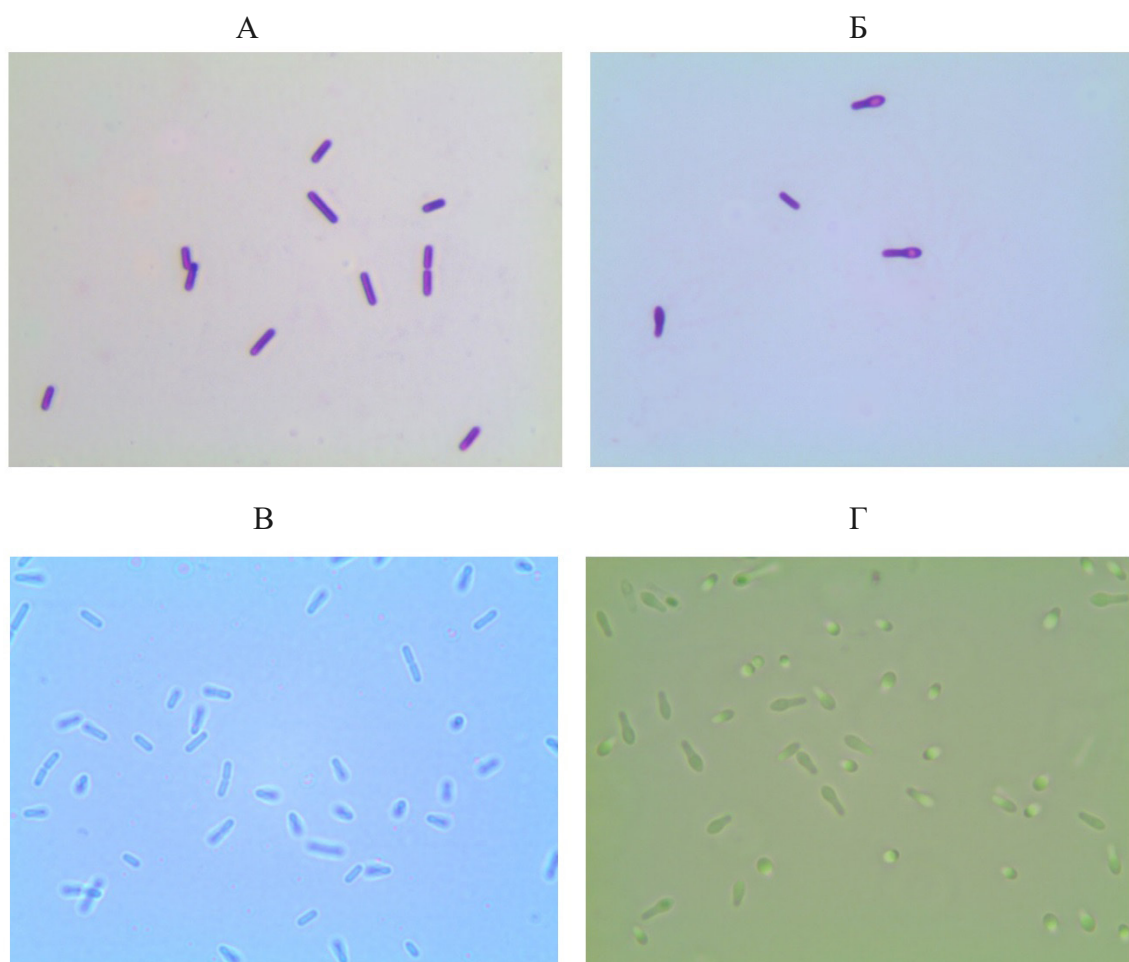


Рис. 3. *C. botulinum* (Ув. $\times 1000$). Световая микроскопия мазка по Граму: А – свежеприготовленный препарат; Б – препарат из колоний, хранившихся при комнатной температуре в аэробных условиях в течение 8 часов. Фазово-контрастная микроскопия препаратов «раздавленная капля»: В – свежеприготовленный препарат; Г – препарат, хранившийся в течение суток.

При исследовании выделенных культур *C. botulinum* биологическим и молекулярно-генетическим методами выявлены ботулотоксины А и В.

Обсуждение. В ходе исследования 440 образцов пищевой продукции и клинического материала от больных с подозрением на ботулизм из 25 образцов выделен возбудитель инфекции – *C. botulinum* с использованием специальных питательных сред импортного производ-

ства и отечественных питательных сред, предназначенных для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих клостридий. Количество выделенных культур на импортных и отечественных питательных средах одинаково.

Показано, что сульфитный агар с желточной эмульсией позволяет выявлять липазоположительные штаммы *C. botulinum*, продуцирующие ботулотоксины типа

А и типа В.

При сравнении ингибирующих свойств питательных сред необходимо отметить более высокую эффективность СВИ-агар и РСА-агар, в состав которых входит селективная добавка, содержащая комбинацию из трёх antimicrobных препаратов – циклосерина, сульфаметоксазола, триметоприма, в отличие от сульфитного агара, содержащего только циклосерин. При использовании сульфитного агара с добавкой циклосерина, сульфаметоксазола и триметоприма отмечено улучшение его ингибирующих свойств.

Для обогащения роста исследуемых образцов отечественная коммерческая питательная среда Китта-Тароцци по своей специфической активности не уступает импортному бульону с печенью. ТГС также может быть использована для накопления роста клостридий.

Заключение. Селективное выделение *C. botulinum* с использованием специально предназначенных для этих целей питательных сред является неотъемлемой частью лабораторной диагностики ботулизма и санитарно-бактериологического исследования источника инфекции, направленное на выявление *C. botulinum* в объектах окружающей среды. В Российской Федерации отсутствует промышленный выпуск таких питательных сред. Во время расследования вспышки ботулизма летом 2024 года возникла необходимость использования среды Китта-Тароцци и сульфитного агара, предназначенных для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих клостридий, соответственно.

Полученные положительные результаты исследования показали, что отечественная среда Китта-Тароцци и сульфитный агар в модификации 3 с добавлением желточной эмульсии и циклосерина при выделении *C. botulinum* из клинических образцов и пищевых продуктов не уступают специальным средам зарубежных производителей. Потребность обязательного внесения в сульфитный агар добавок показывает необходимость разработки и промышленного выпуска специальной отечественной питательной среды для выделения *C. botulinum* с дифференцирующей (в виде желточной эмульсии) и селективной добавки, содержащей циклосерин, триметоприм и сульфаметоксазол. Решение данной задачи является особенно актуальным в рамках программы импортозамещения [17, 18].

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 2, 3, 5-13 СМ. REFERENCES)

1. Шерхова Д.З. Ботулизм: клиника, диагностика, лечение (обзор литературы). *Молодой ученый*. 2020; 50(340): 389-91.
4. Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К., Дятлов И.А. Ботулизм: характеристика возбудителя и лабораторные методы его диагностики. *Бактериология*. 2018; 3(4): 47-59. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-47-59.
14. Миронов А.Ю., Шепелин И.А., Шепелин К.А. Патогенные клостридии: Справочник бактериолога. М.: Типография Копиринг; 2019. ISBN 978-5-9905485-0-3.
15. Миронов А.Ю., Шепелин И.А., Иванов А.В. Питательные среды: Справочник микробиолога. М.: Эпидбиомед-диагностика; 2024. ISBN 978-5-600-04208-7.
16. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Миронов А.Ю. О готовности медицинских организаций к предупреждению заноса и распространения опасных инфекционных заболеваний. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2022; 27(1): 60-70. DOI: 10.17816/EID108391.

17. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алешкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63-5.
18. 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.

REFERENCES

1. Sherkhova D.Z. Botulism: clinical features, diagnostics, treatment (literature review). *Molodoy uchenyi*. 2020; 50(340): 389-91. (in Russian)
2. Maslanka S.E., Luquez C., Dykes J.K., Tepp W.H., Pier C.L., Pelletet S. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. *J. Infect. Dis.* 2016; 213(3): 379-85. DOI: 10.1093/infdis/jiv327.
3. Akbulut D., Grant K.A., McLaughlin J. Improvement in laboratory diagnosis of wound botulism and tetanus among injecting illicit-drug users by use of real-time PCR assays for neurotoxin gene fragments. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(9): 4342-50. DOI: 10.1128/JCM.43.9.4342-4348.2005.
4. Eruslanov B.V., Svetoch E.A., Mitzevich IP, Fursova N.K., Dyatlov I.A. Botulism: characteristics of the pathogen and laboratory methods of its diagnosis. *Bakteriologiya*. 2018; 3(4): 47-59. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-47-59. (in Russian)
5. Lonati D., Schicchi A., Crevani M., Buscaglia E., Scaravaggi G., Maida F. et al. Foodborne botulism: clinical diagnosis and medical treatment. *Toxins (Basel)*. 2020; 12(8): 1-17. DOI: 10.3390/toxins12080509.
6. Brunt J., Vliet A., Stringer S., Carter A.T., Lindström M., Peck M.W. Pan-genomic analysis of *Clostridium botulinum* group II (Non-Proteolytic *C. botulinum*) associated with foodborne botulism and isolated from the environment. *Toxins (Basel)*. 2020; 12(5): 1-19. DOI: 10.3390/toxins12050306.
7. Rao A.K., Sobel J., Chatham-Stephens K., Luquez C. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of botulism, 2021. *MMWR Recomm. Rep.* 2021; 70(2): 1-30. DOI: 10.15585/mmwr.rr7002a1.
8. Centers for disease control and prevention, National Center for Infectious Diseases, Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Botulism in the United States, 1899-1996; handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. USA: Atlanta GA; 1998.
9. Maslanka S.E., Solomon H.M., Sharma S., Johnson E. Clostridium botulinum and its toxins. In: American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Chapter 32. USA: APHA Press; 2013. DOI: 10.2105/MBEF.0222.037.
10. Auricchio B., Anniballi F., Fiore A., Skiby J.E., Medici D.D. Evaluation of DNA extraction methods suitable for PCR-based detection and genotyping of *Clostridium botulinum*. *Biosecur. Bioterror.* 2013; 11: 200-6. DOI: 10.1089/bsp.2012.0082.
11. Barash J.R., Aron S.S. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(2): 183-91. DOI: 10.1093/infdis/jit449.
12. Gullmar B., Molin N. Effect of nutrients on physiological properties of *Clostridium botulinum* type E. *J. Bacteriol.* 1967; 94(6): 1924-9. DOI: 10.1128/jb.94.6.1924-1929.1967.
13. Dezfulian M., McCroskey L.M., Hatheway C.L., Dowell V.R. Selective medium for isolation of *Clostridium botulinum* from human feces. *Journal of Clinical Microbiology*. 1981; 13(3): 526-31.
14. Mironov A.Yu., Shepelin I.A., Shepelin K.A. Pathogenic clostridia: Handbook of bacteriologist. Moscow: Tipografiya Kopiring; 2019. ISBN 978-5-9905485-0-3. (in Russian)
15. Mironov A.Yu., Shepelin I.A., Ivanov A.V. Nutritious environments: A Microbiologist's Handbook. Moscow: Epidbiomed-diagnostika; 2024. ISBN 978-5-600-04208-7. (in Russian)
16. Nikiforov V.V., Suranova T.G., Mironov A.Yu. On the readiness of medical organizations to prevent the introduction and spread of dangerous infectious diseases. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2022; 27(1): 60-70. DOI: 10.17816/EID108391. (in Russian)
17. Shepelin A.P., Domotenko L.V., Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Alyoshkin V.A. Modern approaches to the problem of import substitution in

the field of production of nutrient media. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(6): 63-5. (in Russian)

18. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Alyoshkin V.A. Status and

trends in the 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)