УДК 279.61

Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии

А.П. Шепелин, О.В. Полосенко, И.И. Марчихина, Л.П. Шолохова, И.А. Дятлов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Московская область, п. Оболенск, Россия

Culture media for detection of staphylococci in clinical and sanitary microbiology

A.P. Shepelin, O.V. Polosenko, I.I. Marchikhina, L.P. Sholokhova, I.A. Dyatlov

Federal State Institution of Science «StateResearch CenterforApplied Microbiologyand Biotechnology» (FSIS SRCAM&B), Obolensk, Russia

В статье дана краткая характеристика новых микробиологических питательных сред, выпускаемых в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии» Роспотребнадзора (ГНЦ ПМБ) с целью повышения эффективности диагностики инфекционных заболеваний, описаны преимущества этих сред по сравнению с импортными аналогами, технологические достижения в области разработки препаратов.
Ключевые слова: *патогенные микроорганизмы; питательные среды; дифференциально-диагностические препараты; стафилококки.*
Библиографическое описание: *Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Дятлов ИА. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. Биопрепараты 2015; (4): 39–43.*

The article summarizes the new microbiological culture media produced in FSIS SRCAMB to improve the efficiency of diagnosis of infectious diseases, describes the advantages of these environments compared to foreign analogs, technological achievements in the field of drug development.
Key words: *pathogens; differential diagnostic media; staphylococci; inhibition.*
Bibliographic description: *Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Dyatlov IA. Culture media for detection of staphylococci in clinical and sanitary microbiology. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (4): 39–43.*

Стафилококки играют значительную роль в возникновении различных заболеваний человека, как в госпитальных условиях, так и вне стационара. Их роль в этиологии инфекций, вызванных грамположительными микроорганизмами, неуклонно растет. Особенно велико значение стафилококков в отделениях реанимации и интенсивной терапии, где на их долю приходится до 50% всех случаев инфекции [1–3].

Род стафилококков включает более 20 видов, представители которых продуцируют 50 разновидностей антигенов, способные поражать любую ткань или орган и вызывать более 100 различных заболеваний – маститы, дерматиты, пневмонии, артриты, гнойные и раневые инфекции, пищевые отравления, сепсис, а их энтеротоксины как суперантигены стимулируют избыточный синтез Т-лимфоцитов, которые через образуемый интерлейкин-2 реализуют отравляющее действие [3–5].

Основными видами стафилококков являются золотистый, эпидермальный и сапрофитный. Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является наиболее критичным в масштабах воздействия на организм человека. Поражение этим видом стафилококка может затронуть самые различные органы, более того, именно этот стафилококк может спровоцировать значительное количество различных по специфике заболеваний, начиная от простейших в своем течении и заканчивая теми из них, исход которых является для больного летальным. Золотистый стафилококк располагает рядом адаптивных факторов, которые обеспечивают возможность противостояния защитным механизмам организма человека

С эпидермальным стафилококком (*S. epidermidis*) организм человека в здоровом его состоянии справляется без труда, в то время как для людей, находящихся, например, в условиях реанимационных отделений с соответствующим состоянием организма, он, оказываясь внутри тела, провоцирует тяжелейшие заболевания. В частности, к ним относятся сепсис, эндокардит, другие, как правило, нозокомиальные, осложнения.

S. saprophyticus вызывает циститы и дизурические расстройства; реже – пиелонефрит и эндокардит.

Актуальность совершенствования методических подходов к идентификации стафилококков связана с расширением видового состава данного рода и увеличивающимся значением в патогенезе рзличных заболеваний, что относится не только коагулазоположительным, но и коагулазоотрицательным стафилококкам. При определении таксономического положения выделенных патогенных и условно патогенных бактерий основным является бактериологический метод. Этот метод включает в себя использование накопительных и элективных питательных сред и создание условий культивирования для преимущественного накопления в культуре нужных форм микробов, способы получения чистых культур из отдельных колоний или клеток микроорганизмов [6].

Целью настоящего исследования является разработка составов отечественных питательных сред: питательной среды для выявления патогенных маннитоположительных стафилококков (агар Фогеля-Джонсона) и агара для выделения и учета коагулазоположительных стафилококков (агар Байрд-Паркера).

Материалы и методы

При разработке компонентного состава агара Фогеля-Джонсона была выполнена работа по выбору белковой основы. В качестве питательной основы использовали панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ), панкреатический гидролизат казеина (ПГК), триптоны отечественного производства и импортные, пептон мясной, а также, разработанный ГНЦ ПМБ гидролизат казеина низкой степени расщепления (ГКНСР). Белковой основой агара Фогеля-Джонсона является панкреатический гидролизат казеина низкой степени расщепления (ГКНСР), который обеспечивает ростовые потребности стафилококков, обладающих протеолитической активностью, но в значительной мере уменьшает скорость роста сопутствующих микроорганизмов. Белковой основой агара Байрд-Паркера является панкреатический гидролизат казеина со степенью расщепления 30–35%.

Обе среды содержат хлорид лития и теллурит калия для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Наличие теллурита калия вызывает почернение колоний стафилококков. Составы обеих сред оптимизированы по содержанию глицина. Было доказано, что при определенных условиях, глицин может не только стимулировать, но и ингибировать рост стафилококков.

Качество питательных сред оценивали по физико-химическим и биологическим показателям в соответствии с Методическими указаниями МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [7].

Для контроля качества питательных сред использованы тест-штаммы, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»: *Staphylococcus aureus* «Виотко», *S. aureus* Wood-46, *S. aureus* 6538-P, *S. saprophyticus* CCM 883, *S. epidermidis* ATCC 14990, *Proteus mirabilis* 3177, *P. vulgaris* HX 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Salmonella typhimurium* 79, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775), *Escherichia coli* 3912/41 (O55:K59), *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Методика посева изучаемых микроорганизмов включала подготовку стандартных взвесей культур каждого тест-штамма, соответствующих 10 единицам по стандартному образцу мутности, с использованием стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. Полученные взвеси культур методом десятикратных разведений (4,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида с 0,5 мл микробной взвеси) доводили до необходимых концентраций и осуществляли посев на питательные среды.

Изучение диагностической ценности разрабатываемых питательных сред (чувствительность, специфичность, скорость роста, стабильность основных биологических свойств микроорганизмов, дифференцирующие и ингибирующие свойства) проводили в сравнении с известными зарубежными коммерческими препаратами. В качестве контроля были использованы агары Фогеля-Джонсона (Vogel-Johnson agar, производства «Biolife»), (Vogel-Johnson agar, производства «Fluka»), агар Байрд-Паркера (Baird-Pparker agar, производства «Merck»).

Эмульсию яичного желтка готовили по общепринятой методике, включающей приготовление 10–20% желточной взвеси, полученной из желтка, асептически выделенного из яйца и внесенного в 200 мл изотонического раствора хлорида натрия [8].

При приготовлении питательных сред использовали 2% раствор теллурита калия, производство которого организовано в ФБУН ГНЦ ПМБ.

Результаты и обсуждение

Питательная среда для выявления патогенных маннитположительных стафилококков (агар Фогеля-Джонсона)

На первом этапе исследований изучали возможность использования в качестве белковой основы широкого спектра белковых гидролизатов. Было установлено, что при использовании большинства изученных гидролизатов в составе агара Фогеля-Джонсона наблюдался эффект сплошного роения протея и слабый рост некоторых штаммов стафилококка.

Для дальнейших исследований по оптимизации состава среды в качестве белковой основы агара Фогеля-Джонсона использовали ГКНСР. Дополнительно в состав среды был введен хлористый натрий для поддержания уровня осмотического давления, необходимого для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов, так как ГКНСР не содержит хлоридов. При использовании ГКНСР были получены хорошие ростовые свойства тест-штаммов стафилококков. Отмечено отсутствие роения протея, что является важным показателем для этой среды.

Уменьшение количества ингибиторов в составе среды изучали методом полного факторного эксперимента в несколько этапов с одновременным изучением различных вариантов питательной основы. При этом концентрации всех остальных компонентов оставались на одном уровне с контрольными средами, так как считаются оптимальными.

Дальнейшая оптимизация состава среды заключалась в определении оптимальной концентрации хлористого лития. В ходе экспериментальной работы для среды Фогеля-Джонсона в качестве оптимальной была определена концентрация хлористого лития, составляющая 3,0 г/л. Необходимость в увеличении концентрации этого ингибитора отсутствует, так как использование ГКНСР в качестве белкового компонента и подобранная концентрация теллурита калия позволила сконструировать среду с заданными параметрами. Ввиду различной потребности штаммов стафилококков в аминокислотах и пептидах возникла необходимость определить оптимальную концентрацию глицина в составе среды, так как глицин в концентрации 10,0 г/л ингибирует рост стафилококков, и только концентрация 5,0 г/л, как нами было установлено, является полноценным стимулятором роста стафилококков.

В таблице 1 представлены сравнительные биологические показатели разработанной питательной среды и импортных аналогов с уменьшенной концентрацией теллурита калия и с рекомендуемой фирмами-производителями.

Рост тест-штаммов *P. mirabilis* 3177, *Ps. aeruginosa* 27/99, *E. coli* ATCC 25922, *Sal. typhimurium* 79, *Ent. faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775), *E. coli* 3912/41 (O55:K59), *B. subtilis* ATCC 6633, *P. vulgaris* HX 19 222 из разведений 10^{-4} на агарах Фогеля-Джонсона отсутствует. На агарах Фогеля-Джонсона производства «Biolife» и «Fluka» отсутствует рост

Таблица 1. Сравнительная характеристика биологических показателей агаров Фогеля-Джонсона

Тест-штамм	Агар Фогеля-Джонсона ГНЦ ПМБ 5 мл 2% раствор теллурита калия	Агар Фогеля-Джонсона («Biolife») 5 мл 2% раствор теллурита калия	Агар Фогеля-Джонсона («Biolife») 10 мл 2% раствор теллурита калия	Агар Фогеля-Джонсона («Fluka») 10 мл 2% раствор теллурита калия	Питательный агар для культивирования микроорганизмов ГРМ-агар
	Количество колоний, диаметр, морфология,48 ч инкубации				
S. aureus «Виотко» Разведение 10^{-6}	46, 46 1,8–2,2 Черные колонии, желтые зоны	50, 61 1,8–2,2 Черные колонии, желтые зоны	8 1,4–1,6 Черные колонии, желтые зоны	6 1,0–1,5 Черные колонии, желтые зоны	55, 48 3,0 Бесцветные, круглые
S. aureus Wood-46 Разведение 10^{-6}	46, 45 1,6–1,8 Черные колонии, желтые зоны	45, 50 1,6–1,8 Черные колонии, желтые зоны	Нет роста	Нет роста	45, 48 3,0 Бесцветные, круглые
S. aureus 6538-P Разведение 10^{-6}	48, 40 1,4–1,6 Черные колонии, желтые зоны	35, 42 1,7 Черные колонии, желтые зоны	5 0,8–1,0 Черные колонии, желтые зоны	28, 23 0,6–1,0 Черные колонии, желтые зоны	35, 41 3,0 Бесцветные, круглые
S. saprophyticus CCM 883 Разведение 10^{-6}	13 0,8–1,0 Черные колонии, желтые зоны	12 0,8–1,1 Черные колонии, желтые зоны	Нет роста	Нет роста	17 3,0 Бесцветные, круглые
S. epidermidis ATCC 14990 Разведение 10^{-6}	12 0,6–0,7 Черные колонии	17 0,6–0,7 Черные колонии	Нет роста	Нет роста	22 3,0 Бесцветные, круглые

как *S. aureus* Wood-46, так и *S. saprophyticus* CCM 883 с *S. epidermidis* ATCC 14990. Кроме того, диаметр колоний остальных коагулазоположительных стафилококков меньше, чем на агаре Фогеля-Джонсона ГНЦ ПМБ.

Таким образом, новая питательная среда – агар Фогеля-Джонсона ГНЦ ПМБ обеспечивает рост патогенных стафилококков и стафилококков-сапрофитов с ингибирующим эффектом в отношении сопутствующей микрофлоры. Стафилококки, ферментирующие маннит, образуют на агаре Фогеля-Джонсона черные колонии, окруженные желтой зоной, не ферментирующие маннит – черные колонии без пожелтения среды вокруг (рис. 1).

Питательный агар для выделения и учета коагулазоположительных стафилококков (агар Байрд-Паркера)

На первом этапе оптимизации агара Байрд-Паркера была проведена работа по выбору белковой основы. В качестве питательной основы использовали ПГРМ, ПГК, триптоны отечественного и зарубежного производства, пептон мясной, ГКНСР.

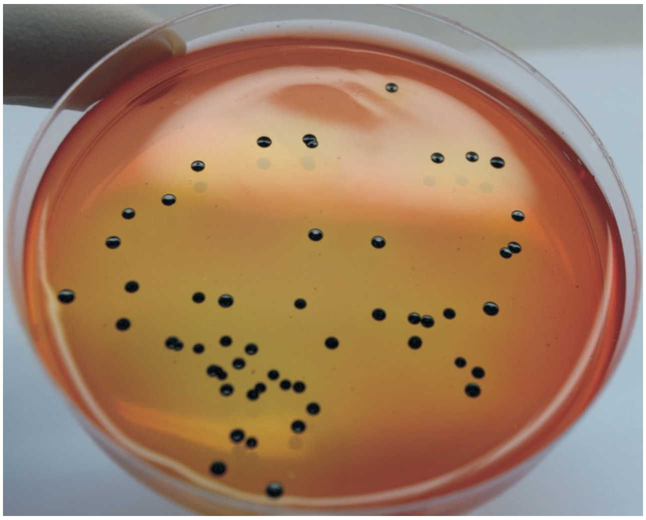

Рис. 1. Рост тест-штамма *S. aureus* «Виотко» на агаре Фогеля-Джонсона ГНЦ ПМБ.

При оптимизации агара Байрд-Паркера для выделения стафилококков наиболее приемлемой с нашей точки зрения считается концентрация 5 мл 2% раствора теллурита калия на 1 л среды и 5,0 г/л хлористого лития. Такая комбинация дает отличный рост стафилококков и ингибирует рост сопутствующей микрофлоры.

Концентрации пирувата натрия, мясного экстракта в дальнейших экспериментах оставались на одном уровне с контрольными средами, так как считаются оптимальными. Изменение соотношения этих компонентов или внедрение различных стимулирующих добавок приводило к увеличению роения протея. Различная потребность стафилококков не только в аминокислотах и пептидах, но и ростовых факторах вылилась в необходимость увеличения концентрации дрожжевого экстракта до 3 г/л и оптимизации концентрации глицина, который в количестве 10,0 г/л ингибирует рост тест-штаммов стафилококков. С этой же целью в составе среды мясной экстракт был заменен на пептон и оптимизирована его концентрация.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что разработанная питательная среда – агар Байрд-Паркера обеспечивает рост стафилококков, которые проявляют две характерные особенности: вокруг колоний наблюдаются окрашенные зоны и кольца, образующиеся в результате липолиза и протеолиза. Необходимо отметить, что диаметр колоний коагулазоположительных стафилококков на агаре Байрд-Паркера фирмы «Merck» меньше, чем на агаре Байрд-Паркера ГНЦ ПМБ. Результаты биологического контроля питательных сред на основе агара Байрд-Паркера представлены в таблице 2.

Новая питательная среда подавляет рост сопутствующей микрофлоры. Так, рост тест-штаммов *Ps. aeruginosa* 27/99, *E. coli* ATCC 25922, *Sal. typhimurium* 79, *Ent. faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775), *E. coli* 3912/41 (O55:K59), *B. subtilis* ATCC 6633 из разведений 10^{-4} на агарах Байрд-Паркера отсутствует.

Расщепление лецитовителлина наблюдается в проявлении четкой непрозрачной зоны лецитиназной активности вокруг

Таблица 2. Сравнительная характеристика биологических показателей агаров Байрд-Паркера

Тест-штамм	Агар Байрд-Паркера ГНЦ ПМБ 5 мл 2% раствор теллурита калия	Staphylococcus selective agar base to Baird-Parker for microbiology «Merck» 5 мл 2% раствор теллурита калия	Staphylococcus selective agar base to Baird-Parker for microbiology «Merck» 10 мл 2% раствор теллурита калия	Питательный агар для культивирования микроорганизмов ГРМ-агар
	Количество колоний, диаметр, морфология, 48 ч инкубации			
S. aureus «Виотко» Разведение 10^{-6}	40, 40 1,6–1,8 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	52, 50 1,6–1,8 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	48, 50 1,4–1,8 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	55, 48 3,0 Бесцветные, круглые
S. aureus Wood-46 Разведение 10^{-6}	48, 50 1,0–1,2 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	49, 48 1,0–1,2 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	47, 46 0,6–0,8 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	45, 48 3,0 Бесцветные, круглые
S. aureus 6538-P Разведение 10^{-6}	55, 44 1,2–1,4 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	47, 50 1,0–1,2 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	45, 48 0,6–0,8 Черные колонии, зоны липолиза и протеолиза	35, 41 3,0 Бесцветные, круглые
S. saprophyticus CCM 883 Разведение 10^{-5}	Рост в виде точечных колоний черного цвета	Рост в виде точечных колоний черного цвета	Нет роста	17 3,0 Бесцветные, круглые
S. epidermidis ATCC 14990 Разведение 10^{-5}	Рост в виде точечных колоний черного цвета	Рост в виде точечных колоний черного цвета	10, 15 точечные	57 3,0 Бесцветные, круглые
P. mirabilis 3177 Разведение 10^{-4}	Зоны без роения	Зоны без роения	Зоны без роения	Сплошной рост, роение
P. vulgaris HX 19 222 Разведение 10^{-4}	Зоны без роения	Зоны без роения	Зоны без роения	Сплошной рост, роение

колоний, а наличие протеолиза – в формировании прозрачной зоны шириной 2–5 мм (рис. 2).

Таким образом, следует отметить, что в результате проведенных исследований разработаны две питательные среды – агар Фогеля-Джонсона и агар Байрда-Паркера, предназначенные для выделения и определения количества коагулазоположительных стафилококков из клинического материала, пищевых продуктов и других объектов. Установлено, что по совокупности биологических показателей питательные среды ФБУН ГНГЦ ПМБ не только не уступают, но по ряду показателей превосходят импортные аналоги. Государственная регистрация новых питательных сред и внедрение их в практику санитарных и клинических исследований позволит отказаться от закупки дорогостоящих импортных препаратов.

Рис. 2. Рост тест-штамма *S. aureus* «Виотко» на агаре Байрд-Паркера ГНЦ ПМБ.

Выводы

1. Установлено, что оптимальной белковой основой агара Фогеля-Джонсона является панкреатический гидролизат казеина низкой степени расщепления (ГКНСР), который обеспечивает ростовые потребности стафилококков, обладающих протеолитической активностью, но в значительной мере уменьшает скорость роста сопутствующих микроорганизмов; белковой основой агара Байрд-Паркера – панкреатический гидролизат казеина со степенью расщепления 30–35%.

2. Определено количественное соотношение основных компонентов питательных сред: Фогеля-Джонсона и Байрд-Паркера, обеспечивающих рост патогенных стафилококков и стафилококков-сапрофитов с ингибирующим эффектом в отношении сопутствующей микрофлоры.

3. Показано, что стафилококки, ферментирующие маннит, образуют на агаре Фогеля-Джонсона черные колонии, окруженные желтой зоной, не ферментирующие маннит – черные колонии без пожелтения среды вокруг; на агаре Байрд-Паркера колонии стафилококков проявляют две характерные особенности: вокруг колоний наблюдаются зоны и кольца, образующиеся в результате липолиза и протеолиза.

Литература:

1. Акатов АК, Зуева ВС. Стафилококки. М.: Медицина; 1983.
2. Тотолян АА, Малеев ВВ. Современные проблемы кокковых инфекций. Микробиология 2001; (2): 117–20.
3. Сидоренко СВ. Механизмы резистентности микроорганизмов. В кн.: Страчунский ЛС, Белоусов ЮБ, Козлов СН, ред. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. М.: Боргес; 2002.
4. Беляков ВД. Стафилококки и стафилококковая инфекция. Саратов; 1980.
5. Поздеев ОК. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-Мед; 2001.
6. Омарова СМ, Баснакьян ИА, Артемова ТА. Сухие питательные среды для культивирования кокковых культур. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2005; (6): 30–3.
7. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
8. Лабинская АС, Блинкова ЛП, Ещина АС, ред. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина; 2004.

References

1. Akatov AK, Zueva VS. Staphylococci. M.: Meditsina; 1983 (in Russian).
2. Totolyan AA, Maleev VV. Modern problems of cocci infections. Mikrobiologiya 2001; (2): 117–20 (in Russian).
3. Sidorenko SV. Mechanisms of microbial resistance. In: Strachunskiy LS, Belousov YuB, Kozlov SN, eds. Practical Guide to anti-infective chemotherapy. Moscow: Borges; 2002 (in Russian).
4. Belyakov VD. Staphylococci and staphylococcal infection. Saratov; 1980 (in Russian).
5. Pozdeev OK. Medical Microbiology. Moscow: GEOTAR-Med; 2001 (in Russian).
6. Omarova SM, Basnakyan IA, Artemova TA. Dry culture media for the cultivation of cocci cultures. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2005; (6): 30–3 (in Russian).
7. Control methods of bacteriological culture media. Guidelines 4.2.2316-08. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology; 2008 (in Russian).
8. Labinskaya AS, Blinkova LP, Eschina AS, eds. General and sanitary microbiology techniques with microbiological studies. Moscow: Meditsina; 2004 (in Russian).

Authors:

Federal State Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology» (FSIS SRCAM&B), Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, 142279, Russian Federation.

Shepelin AP. Deputy Director for scientific and production work. Doctor of Biological Sciences.

Polosenko OV. Senior researcher of Laboratory of microbiological and physico-chemical methods of analysis of scientific and production department of culture media. Candidate of Biological Sciences.

Marchihina II. Head of Laboratory of microbiological and physico-chemical methods of analysis of scientific and production department of culture media.

Sholohova LP. Head of Section of microbiological studies of Laboratory of microbiological and physico-chemical methods of analysis of scientific and production department of culture media.

Dyatlov IA. Director. Doctor of Medical Sciences, professor, corresponding member of Russian Academy of Sciences.

Об авторах

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ). Российская Федерация, 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск.

Шепелин Анатолий Прокопьевич. Заместитель директора по научно-производственной работе, д-р биол. наук.

Полосенко Ольга Вадимовна. Старший научный сотрудник лаборатории микробиологических и физико-химических методов анализа научно-производственного отдела питательных сред, канд. биол. наук.

Марчихина Ирина Ивановна. Заведующий лабораторией микробиологических и физико-химических методов анализа научно-производственного отдела питательных сред.

Шолохова Любовь Петровна. Заведующий сектором микробиологических исследований лаборатории микробиологических и физико-химических методов анализа научно-производственного отдела питательных сред.

Дятлов Иван Алексеевич. Директор, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН.

Адрес для переписки: Шепелин Анатолий Прокопьевич; info@obolensk.org

Поступила 26.10.2015 г.
Принята 06.11.2015 г.