



УДК: 579.083.13:576.8.083.3

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СРЕДЫ САБУРО ОТЕЧЕСТВЕННОГО И ИМПОРТНОГО ПРОИЗВОДСТВА

А.П. ШЕПЕЛИН

*Государственный научный
центр прикладной
микробиологии
и биотехнологии
Роспотребнадзора,
Московская область*

e-mail: andy.60@mail.ru

Проведена сравнительная оценка качества питательной среды Сабуро отечественного (ФГУН ГНЦ ПМБ) и импортного производства (Pronadisa, HiMedia). Отечественная среда Сабуро ГНЦ ПМБ намного дешевле импортных. Состав питательной среды № 2 ГРМ Сабуро обеспечивает чёткие морфологические признаки, являющиеся основой дифференциальной диагностики грибов рода *Candida* от других дрожжеподобных грибов, плесневых грибов и микробов-ассоциантов. Качество питательной среды Сабуро производства ГНЦ ПМБ не уступает импортным аналогам по всем параметрам, а по некоторым показателям превосходит их.

Ключевые слова: питательная среда Сабуро, контроль качества.

Инфекция с участием грибов рода *Candida* spp. в настоящее время имеет устойчивый статус актуальной клинической проблемы. В последние годы грибы как возбудители болезней приобретают все больший удельный вес в структуре заболеваемости. Борьба с микозами, их ранняя диагностика и терапия требуют многосторонних знаний о мицелиальных и тканевых формах возбудителей, использования иммунологических методов исследований и целенаправленного эпидемиологического обследования с выявления факторов, определяющих динамику развития микотических поражений [1].

Основная масса грибов относится к условно патогенным микробам (УПМ). Являясь составной частью окружающей среды, некоторые свободно живущие виды грибов, контактируя с организмом в условиях сниженного иммунного статуса, колонизируют биотопы организма, вызывая развитие ГВЗ. Чаще всего микотические поражения человека вызывают дрожжеподобные грибы рода *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, реже других видов. Возрастание случаев микозов среди населения связано с ухудшением экологических условий, нерациональным использованием антибиотиков, увеличением в популяции доли иммунокомпromетированных лиц. Дифференциацию дрожжеподобных возбудителей проводят по культуральным, морфологическим и тинкториальным, ферментативным и антигенным свойствам. Существуют тест-системы, облегчающие работу микробиологов по идентификации дрожжеподобных грибов, в тоже время необходимость изучения ферментативной и ассимиляционной способности грибов по стандартным методикам, остается актуальной. В ГНЦ ПМБ поставлена задача разработки среды для выделения грибов, содержащей в своем составе глюкозу, утилизируемую всеми грибами рода *Candida*.

Для выделения и количественного учёта *C. albicans* при санитарно-микологических исследованиях в среды добавляются антибиотики, 2% раствор теллурида калия, метабисульфит натрия или калия.

Белковой основой классического варианта среды Сабуро является пептон (мясной или казеиновый). В ГНЦ ПМБ белковой основой разрабатываемых сред является панкреатический гидролизат рыбной муки и панкреатический гидролизат казеина, обеспечивающие питательные потребности не только широкого круга бактерий, но и грибов.

Цель исследования — изучение диагностической ценности (специфическая активность: чувствительность, скорость роста, стабильность основных биологических свойств микроорганизмов, дифференцирующие и ингибирующие свойства), питательной среды для выращивания и подсчёта числа дрожжевых и плесневых грибов № 2 ГРМ (Сабуро) в сравнительных испытаниях с коммерческими препаратами, выпускаемыми в соответствии с нормативной документацией и в период их срока годности.



Материалы и методы. Материалами для исследования служили питательная среда № 2 ГРМ (Сабуро), питательные агары Сабуро различных фирм-производителей: Sabouraud Dextrose Agar (Pronadisa, Испания) и Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia, Индия), в качестве ингибитора использовался 2% раствор теллурита калия.

Для определения специфической активности сравниваемых питательных сред использовались следующие музейные тест-штаммы микроорганизмов: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, получены из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, а также отдела коллекционных культур ФГУН ГНЦ ПМБ.

Взвеси тест-штаммов и микробов ассоциантов готовили в 0,9% растворе хлорида натрия в концентрации, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42-28-59-86П). Исходные взвеси доводили до нужных концентраций, используемых при исследованиях в соответствии с Инструкциями для каждого испытуемого и контрольного препаратов.

При работе использовали общепринятые физико-химические методы контроля, в том числе регламентируемые в соответствии с ТУ на питательные среды аналогичного назначения, в соответствии с МУК 4.2.2316-08 [3].

1. Определение внешнего вида.
2. Определение растворимости.
3. Определение прозрачности и цветности раствора
4. Определение рН.
5. Определение потери в массе при высушивании.
6. Определение аминного азота.
7. Определение хлоридов (в пересчёте на натрия хлорид).
8. Определение прочности студня среды.

Чувствительность, скорость роста, ингибирующие свойства изучали в соответствии с МУК 4.2.2316-08 [3], а также инструкциями по применению на коммерческие питательные среды, инструкцией по применению на питательную среду № 2 ГРМ (Сабуро). Качественное определение общего числа дрожжевых и плесневых грибов проводили по методике, изложенной в ГосФармокопеи XI [4].

Биохимические характеристики и стабильность сохранения основных биологических свойств микроорганизмов определяли с использованием тест-систем (системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов (СИБ), производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, «ПБДЭ» – пластины биохимические, дифференцирующие энтеробактерии производства «НПО «Диагностические системы»»), а также биохимического анализатора «Multiscan as sent» (Финляндия).

Производство питательной среды № 2 ГРМ (Сабуро) основано на применении гидролизата, имеющего низкий рН. Кислотность среды в значительной степени подавляет рост сопутствующей микрофлоры, но при этом не препятствует хорошему росту грибов рода *Candida*. Поскольку культуральный метод предполагает посев материала на плотные питательные среды с последующим выделением и идентификацией чистой культуры микроорганизма, для придания среде № 2 ГРМ (Сабуро) дополнительных селективных свойств, нами рекомендуется применение 2% раствора теллурита калия [4].

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследований изучен компонентный состав ведущих зарубежных фирм (табл. 1), а также химические свойства разработанной питательной среды № 2 ГРМ (Сабуро) в сравнении с аналогами (табл. 2).

В качестве белковой основы для питательной среды № 2 ГРМ (Сабуро) используются ферментативные гидролизаты рыбной муки и казеина, производимые Научно-производственным отделом «Питательные среды» ГНЦ ПМБ, обеспечивающие хорошие ростовые свойства. Ведущие зарубежные фирмы, с этой же целью, применяются микологические пептоны.

Сравнительный анализ физико-химических характеристик показал, что питательные агары Сабуро различных фирм-производителей: Sabouraud Dextrose Agar (Pronadisa, Испания) и Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia, Индия) по химическим характеристикам совпадают с питательной средой № 2 ГРМ (Сабуро), за исключением показателя по прочности геля. Уменьшение концентрации агара не повлияло на основные биологические показатели среды.

Приведённые данные являются средними значениями результатов, по меньшей мере, трёх измерений.



Таблица 1

Составы питательных агаров Сабуро различных производителей

HiMedia	Pronadisa	ГНЦ ПМБ
Sabouraud Dextrose Agar		Среда № 2 ГРМ
Кат. № М063-500 G	Кат. № 1064.00	ТУ 9398-002-78095326-2006 ФС 01012006/4121-06
<u>Состав, г/л:</u> Микологический пептон – 10,0 Глюкоза – 40,0 Агар-агар – 15,0 рН 5,6±0,2	<u>Состав, г/л:</u> Dextrose – 40,0 Mixture of peptic digest of animal tissue and pancreatic digest of casein – 10,0 Bacteriological agar – 15,0 рН 5,6±0,2	<u>Состав, г/л:</u> ПГРМ – 10,0 ПГК – 10,0 Дрожжевой экстракт – 2,0 Натрия фосфат однозамещенный – 2,0 Глюкоза – 40,0 Агар микробиологический – 10,0±3,0 рН 6,0±0,3

Таблица 2

Физико-химические характеристики питательных агаров Сабуро различных фирм

Наименование сред	рН	Аминный азот, %	Потеря в массе при высушивании, %	Прочность, г (по Валенту)
HiMedia				
Sabouraud Dextrose Agar	5,9	1,2	2,1	621
Merck				
Sabouraud Dextrose Agar	5,65	1,0	4,2	681
ГНЦ ПМБ				
Среда № 2 ГРМ с. 295	6,3	1,4	2,5	380

Следующим этапом исследований было сравнение чувствительности агаров Сабуро. Все питательные среды готовились по соответствующим методикам без ингибитора и с применением 2% раствора теллурита калия (5,0 мл на 1 л готовой среды). Чувствительность среды определяли по наибольшему разведению, обеспечивающему формирование колоний *Candida spp.* на всех засеянных чашках Петри. Для этого из приготовленных разведений (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) брали по 0,1 мл взвеси, содержащей соответственно 1000, 100 и 10 клеток и внесли в хорошо просушенные чашки Петри с агаром Сабуро. Инокулят тщательно распределяли по поверхности среды, используя стерильные шпатели, инкубировали при температуре $(33 \pm 1)^\circ \text{C}$. Параллельно делали высевы на ГРМ-агар (для контроля роста). Учёт результатов проводили через 12, 18, 24, 48 ч инкубации с целью определения скорости роста. Результаты представлены в табл. 3.



Таблица 3

Сравнительная характеристика питательных агаров Сабуро по биологическим показателям

Тест-штаммы (разведения)	Sabouraud Dextrose Agar					
	HiMedia		Pronadisa		ГНЦ ПМБ	
	Без ингибитора	С ингибитором	Без ингибитора	С ингибитором	Без ингибитора	С ингибитором
кол-во колоний, диаметр (мм), морфология						
<i>C. albicans</i> NCTC 885-653 10 ⁻⁶	38 2,5-3,0 гладкие, выпуклые белого цвета, с ровным краем	37 1,8-2,0 гладкие, выпуклые серого цвета с ровным краем	29 3,0-3,5 гладкие, выпуклые белого цвета, с ровным краем	24 1,4-1,6 гладкие, выпуклые серого цвета с ровным краем	38 3,5-4,0 гладкие, выпуклые белого цвета, с ровным краем	31 2,0-2,5 гладкие, выпуклые чёрного цвета с ровным краем
<i>A. niger</i> 1119 10 ⁻³	Разветвленный, много-ядерный мицелий чёрного цвета	Разветвленный, много-ядерный мицелий чёрного цвета	Разветвленный, много-ядерный мицелий чёрного цвета	Разветвленный, много-ядерный мицелий чёрного цвета	Разветвленный, много-ядерный мицелий чёрного цвета	Разветвленный, много-ядерный мицелий чёрного цвета
<i>B. cereus</i> 8035 10 ⁻⁴	17 8,0-10,0 Матовые, кремового цвета, с неровным краем	Нет роста	Нет роста	Нет роста	22 10,0-15,0 Шероховатые, кремового цвета, с неровным краем	Нет роста
<i>E. faecalis</i> 775 10 ⁻³	Сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста
<i>E. cloacae</i> A-186 10 ⁻³	Слабый сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста
<i>S. epidermidis</i> 14990 10 ⁻³	Слабый сливной рост	Нет роста	Слабый сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста
<i>S. aureus</i> 209-P 10 ⁻³	Сливной рост	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Сливной рост	Нет роста
<i>E. aerogenes</i> 10006 10 ⁻³	Слабый сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста
<i>E. coli</i> ATCC 25922 10 ⁻³	Сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста	Сливной рост	Нет роста

Данные, представленные в табл. 3, получены через 48 ч инкубации, так как через 12 и 24 ч инкубации колонии на агарах Сабуро с теллуридом калия ещё недостаточно сформированы. Оптимальным временем инкубации следует считать 40-48ч ч при температуре (33±1)° С.

Далее определяли показатель ингибиции по отношению к микробам-ассоциантам *B. cereus*, *S. aureus*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*. При определении показателя ингибиции посевная доза микробов-ассоциантов должна превышать посевную дозу патогенной микрофлоры более чем в 100 раз. Приготовлены взвеси тест-штаммов, содержащие 10⁵, 10⁶, м.к./мл. Для придания агарам Сабуро селективных свойств, в качестве ингибиторов использовали 2% раствора теллурида калия (5 мл на 1 л среды), антибиотики (циклогексимида 0,4 г/мл, пенициллин 20 ЕД, стрептомицин 40 мг/мл), метабисульфит натрия (2 г/л).

Добавление в среду ингибиторов подавляет рост всей сопутствующей микрофлоры. Рост тест-штаммов *C. albicans*, *A. niger* на питательных агарах Сабуро имели типичную морфологию:



C. albicans — гладкие, выпуклые белого цвета, в виде полусферы с ровным краем. *Aspergillus niger* имели разветвлённый, многоядерный мицелий чёрного цвета. Колонии *C. albicans* в присутствии теллурита калия приобретают чёрную окраску.

Выводы. Анализируя результаты по определению чувствительности разрабатываемой среды и скорости роста можно сделать вывод о высокой чувствительности среды, так как на всех засеянных чашках при посеве тест-штаммов из разведений 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} грибы рода *Candida* выросли в виде хорошо сформированных, более крупных, чем на коммерческих средах, колоний (рис.1).



Рис. 1. Рост колоний *Candida* spp. на среде Сабуро разных производителей.

Интенсивность окрашивания, характерная для *Candida* в присутствии теллурита калия, ярче выражена на питательной среде № 2 ГРМ (Сабуро), чем на Sabouraud Dextrose Agar (Pronadisa) и Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia) (рис. 2).

Состав питательной среды № 2 ГРМ (Сабуро) обеспечивает чёткие морфологические признаки, являющиеся основой дифференциальной диагностики грибов рода *Candida* от других дрожжеподобных грибов, плесневых грибов и микробов-ассоциантов.

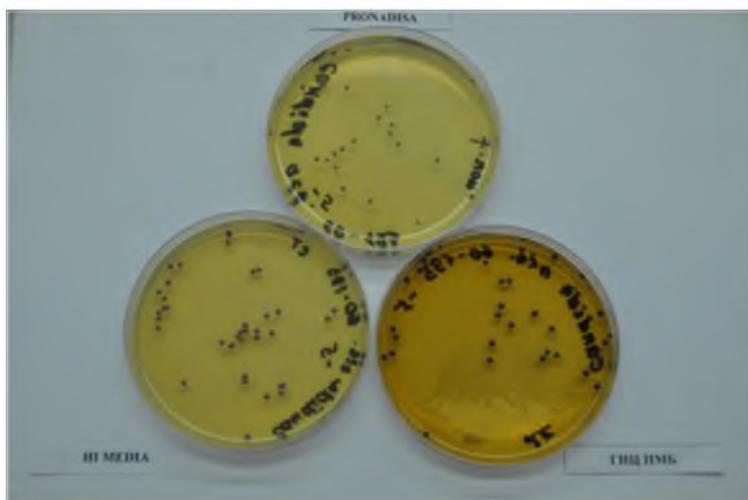


Рис. 2. Рост колоний *Candida* spp. на среде Сабуро разных производителей в присутствии теллурита калия

Литература

1. Капкин П. Н., Лисин В. В. Практическое руководство по медицинской микологии. – Л., 1983. – 192 с.
2. Микробиологическая диагностика вульво-вагинального кандидоза. Метод. рекомендации / Карпунина Т. И., Олина А. А., Машуров М. Г. – Пермь, 2006. – 36 с.
3. Методы контроля бактериологических питательных сред. Метод. указания МУК 4.2.2316-08. Утверждены Роспотребнадзором 18. 01. 2008.
4. XI Государственная Фармакопея СССР / Вып. 2. – М.: 1990. – 496 с.



THE COMPARATIVE QUALITY EVALUATION OF SABURO MEDIUM OF DOMESTIC AND IMPORTED PRODUCTION

A.P. SHEPELIN

*State Research Center for Applied
Microbiology and Biotechnology
Epidemiology*

e-mail: andy.60@mail.ru

The comparative quality evaluation of Saburo medium of domestic (Federal State-Funded Research Institution State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology) and imported production (Pronadisa, HiMedia) was performed. The domestic Saburo medium of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology is much cheaper than the imported media. The composition of № 2 GRM Saburo medium provides clear morphological features, which are the basis of differential diagnostics of *Candida* fungi from another yeast-like fungi, molds and microbial associates. The quality of Saburo medium of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology does not cede to imported analogs in all parameters but exceeds them in some of them.

Keywords: culture media Saburo, quality control.