



УДК 579.61:576.8.083.3:616.6

## СОВРЕМЕННЫЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ XLD-АГАР И RVS-БУЛЬОН ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

**А.П. ШЕПЕЛИН  
Л.П. ШОЛОХОВА  
О.В. ПОЛОСЕНКО  
И.И. МАРЧИХИНА**

*Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская область*

*e-mail: shepelin.rabota@rambler.ru*

В ФБУН ГНЦ ПМБ разработаны, зарегистрированы в порядке государственной регистрации и внедрены в промышленное производство питательный бульон для накопления сальмонелл по Раппапорту-Вассилиадису (RVS-бульон) и питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий (XLD-агар). RVS-бульон обеспечивает 2-5 кратное накопление сальмонелл через 3-6 ч инкубации по сравнению с контрольными импортными средами, XLD-агар предназначен для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий, в частности, сальмонелл и шигелл по признакам ферментации сахаров, образованию сероводорода и лизиндекарбоксилазы. Введение в состав XLD-агара желчи снизило стоимость среды, но самое главное, отпала необходимость её быстрого охлаждения в процессе приготовления.

Ключевые слова: питательная среда, накопление сальмонелл, выделение энтеробактерий.

Во всем мире наблюдается устойчивая тенденция к росту заболеваемости, вызванной кишечными патогенами. Современной особенностью эпидемиологии кишечных инфекций является резкое увеличение частоты импорта (заноса) инфекций с территорий эндемичных по заболеваемости стран ближнего и дальнего зарубежья, а также заражение жителей России при выезде в эти страны и в процессе миграции внутри страны. Широкому повсеместному распространению сальмонеллезом способствуют многие факторы, в том числе обилие источников возбудителей: домашние и дикие животные и птицы [1]. Идентификация энтеробактерий является сложной и дорогостоящей процедурой и основана на определении большого количества биохимических признаков [2]. Упрощение этой процедуры является актуальной проблемой микробиологии. Её решение снижает трудоёмкость и стоимость микробиологических исследований, увеличивает производительность бактериологических лабораторий. Наиболее широко известным и распространённым способом решения данной проблемы является применение питательных сред первичной дифференциации.

В соответствии с национальным стандартом РФ ГОСТ Р 52814 -2007 (ИСО 6579-2002) на Продукты пищевые (Метод выявления бактерий рода *Salmonella*) перечень дифференциально-диагностических питательных сред включает Ксилозолизинный агар с дезоксихолатом натрия (XLD-агар) и среду Раппапорта-Вассилиадиса (RVS бульон). Результаты семинаров, конференций, встреч с врачами-бактериологами подтвердили необходимость создания данных питательных сред, включённых в новый стандарт.

**Цель исследования** — разработать и внедрить в практику бактериологических исследований отечественные питательные среды XLD-агар и RVS бульон, не уступающих по качеству коммерческим аналогам.

**Материалы и методы.** RVS-бульон и XLD-агар адаптированы к сырьевой базе, имеющейся на производстве питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ. Проведена оптимизация по основным компонентам, определяющим назначение разрабатываемых питательных сред, т. е. по выбору белковой основы, содержанию хлористого магния, малахитового зелёного для RVS-бульона а также решена задача частичной замены дезоксихолата натрия на желчь очищенную для XLD-агара. Проведена сравнительная оценка качества по основным биологическим показателям: чувствительности, стабильности основных биологических свойств микроорганизмов, дифференцирующим, ингибирующим свойствам питательных сред. Для контроля питательных сред использовали тест-штаммы, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». При проведении исследований использовали стандартную взвесь культуры каждого тест-штамма, содержащую 10 единиц по ОСО 42-28-85, доведённую до требуемой концентрации микробных клеток методом 10-кратных разведений. В качестве питательных сред сравнения использованы ксилозолизинный агар с дезоксихолатом (XLD-агар) VM014787 838, годен до 2013/09/08 фирмы Merck и накопительный бульон для сальмонелл по Раппапорту-Вассилиадису VM033200 850 годен до 2013/11/24 фирмы Merck.



**Результаты и обсуждение.** XLD-агар предназначен для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий, в частности, сальмонелл и шигелл при проведении бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии.

Питательная среда обладает селективным действием и позволяет дифференцировать колонии микроорганизмов по ферментации сахаров, образованию сероводорода и лизиндекарбоксилазы. Дифференцирующие свойства среды основаны на изменении pH в кислую сторону при росте бактерий, гидролизующих углеводы, входящие в состав среды, с образованием жёлтых или беловато-жёлтых колоний, окруженных жёлтой зоной, с преципитатом или без него. Бактерии, в частности рода *Salmonellaspp.*, продуцирующие сероводород, в присутствии тиосульфата натрия и соли железа (III), обнаруживаются по образованию чёрного пигмента колоний. Некоторые представители рода *Citrobacterspp.*, способные продуцировать сероводород, но не декарбоксилирующие лизин, в результате закисления среды продуктами сбраживания углеводов, образуют на XLD-агаре жёлтые колонии, иногда с чёрным центром. Бактерии декарбоксилирующие лизин, могут быть обнаружены по пурпурному окрашиванию среды вокруг колоний вследствие повышения pH. Реакции, протекающие в XLD-агаре могут проходить одновременно или последовательно, что вызывает появление различных оттенков цвета индикатора pH, или изменяет его цвет от жёлтого до красного при длительном культивировании.

Многолетний опыт по изучению сырьевой базы, используемой при производстве питательных сред в ФБУН ГНЦ ПМБ, определил возможность разработки и производства данных питательных сред с использованием импортного и отечественного сырья. Сравнительная оценка качества вышеуказанных сред по биологическим показателям представлена в табл. 1 и 2 и рис. 2 для RVS-бульона.

Таблица 1

**Сравнительная характеристика качества XLD-агара**

№ п/п	Тест-штаммы	XLD-агар с. 3 годеи до 06.2013 ФБУН ГНЦ ПМБ	XLD-агар VM014787 838, годеи до 2013/09/08 Merck	Контроль роста тест-штаммов на ГРМ агаре с.65 годеи до 06.2018
		Количество, диаметр мм, морфология		
1	<i>S.flexnerii</i> a8516	78 0,8-1,0 круглые, прозрачные, цвета среды	81 0,6-0,8 круглые, прозрачные, цвета среды	94 1,5-2,0 круглые, прозрачные, бесцветные
2	<i>S. typhimurium</i> 79	89 1,2-1,4 круглые, прозрачные, бесцветные с чёрным центром	92 0,6-1,0 круглые, прозрачные, бесцветные с чёрным центром	97 1,8-2,0 круглые, прозрачные, бесцветные
3	<i>S. enteritidis</i> 11272	92 1,2-1,8 круглые, прозрачные, бесцветные с чёрным центром	87 0,6-1,4 круглые, прозрачные, бесцветные с чёрным центром	106 1,2-1,8 круглые, прозрачные, бесцветные
4	<i>E. coli</i> 3912/41 (O <sub>55</sub> :K <sub>59</sub> )	53 1,2-1,8 круглые, непрозрачные, жёлтые, с жёлтой зоной вокруг	28 1,2-1,6 круглые, непрозрачные, кремовые, без жёлтой зоной вокруг	78 1,8-2,0 круглые, прозрачные, бесцветные
5	<i>P. mirabilis</i> 3177	76 1,0-1,8 круглые, прозрачные, жёлтого цвета с чёрным центром	73 1,0-1,6 круглые, прозрачные, жёлтого цвета с чёрным центром	Сплошное роение
6	<i>S. typhimurium</i> 79 и <i>E. coli</i> 3912/41 (O <sub>55</sub> :K <sub>59</sub> ) 1:1	Чёткая дифференциация	Чёткая дифференциация	Нет дифференциации
7	<i>S. aureus</i> Wood-46 Разведение 10 <sup>-4</sup>	Нет роста	Нет роста	Сплошной рост

## Сравнительная характеристика ростовых свойств RVS-бульона на расширенном наборе музейных тест-штаммов

Тест-штаммы	RVS бульон с.1 годен до 06. 2013ФБУН ГНЦ ПМБ	Контр. Высев после культивирования в RVS бульоне с.1 на Агар Эндо-ГРМ	RVS бульон VM033200 850 годен до 2013/11/24 Merck	Контр. Высев после культивирования в RVS бульоне (Merck) на Агар Эндо-ГРМ
<i>S. paratyphi</i> A-225	Слабое помутнение	Сплошной рост	Слабое помутнение	Сплошной рост
<i>S. paratyphi</i> B-8006	Дифф. помутнение	Сплошной рост	Дифф. помутнение	Сплошной рост
<i>S. typhimurium</i> 79	Дифф. помутнение	Сплошной рост	Дифф. помутнение	Сплошной рост
<i>S. enteritidis</i> 11272	Дифф. помутнение	Сплошной рост	Дифф. помутнение	Сплошной рост
<i>S. typhi</i> «bismuth» 869	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>S. gallinarum</i> 665	Слабое помутнение	Сплошной рост	Слабое помутнение	Сплошной рост
<i>S. 206neumo</i> 3496	Дифф. помутнение	Сплошной рост	Дифф. помутнение	Сплошной рост
<i>S. 206neumon-suis</i>	Дифф. помутнение	Сплошной рост	Дифф. помутнение	Сплошной рост
<i>S. typhi</i> H-901 ГДР/ГИСК	Помутнение отсутствует	6 колоний d 1,0-1,5 Бесцветные, круглые, прозрачные	Помутнение отсутствует	3 колонии d 1,0-1,5 Бесцветные, круглые, прозрачные
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>E. coli</i> 4 (O <sub>157</sub> :H <sub>7</sub> )	Нет роста	Нет роста	Нет роста	2; малиновые
<i>S. flexneri</i> 1 a 8516	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>S. sonnei</i> «S-form»	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Нет роста	Нет роста	Нет роста	1 колония d < 0,8 мм Слабо-розовые
<i>S. aureus</i> Wood-46	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>B. cereus</i> 8035	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>K. 206neumonia</i> 418	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>P. aeruginosa</i> 27/99	Визуальное отсутствие роста	4 колонии d 4,0-6,0 мм гладкие, блестящие, слабый зелёный пигмент	Слабая опалесценция	Сливной рост d 3,0-4,0 мм гладкие, блестящие, слабый зелёный пигмент
<i>P. aeruginosa</i> 453	Нет роста	Нет роста	Слабая опалесценция	Сливной рост d 10,0 мм гладкие, расплывчатые, с зелёным пигментом
<i>P. vulgaris</i> HX 19222	Нет роста	15 колоний Очаговое роение	Слабая опалесценция	Сливной рост без роения розового цвета

\*) Посевная доза 100 м.к. в 1 мл RVS бульона

В ноябре 2013 года XLD-агар ФБУН ГНЦ ПМБ хорошо зарекомендовал себя при микробиологических исследованиях клинического материала от больных в МБУЗ «Пятигорская городская инфекционная больница» — выявлена чёткая визуальная дифференциация сальмонелл от эшерихий (рис. 1).



Рис. 1. Рост колоний *Salmonella* spp. и *Escherichia coli* на XLD-агаре

Ведущими зарубежными фирмами выпускается ряд питательных сред для селективного накопления сальмонелл. В России производство данных сред сталкивается с определёнными трудностями, так например, селенистый бульон содержит гидроселенит натрия, вызывающий раздражение кожного покрова человека, поражение слизистой оболочки и дыхательных путей (ПДК 0,1 мг/м<sup>3</sup>). Питательная среда Мюллера готовится только в лабораторных условиях, так как содержит мел и раствор Люголя. Производство RVS-бульона сухого, являющегося аналогом магниевой среды, возможно только при наличии безводного хлористого магния.

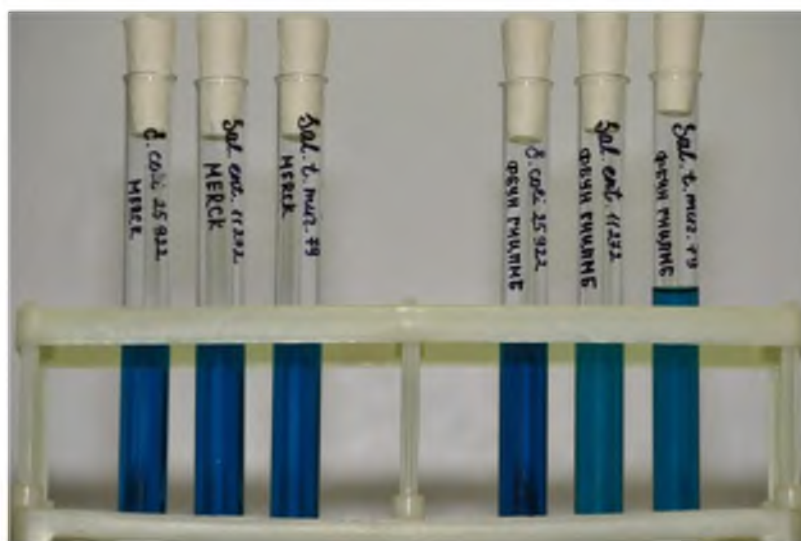


Рис. 2. Визуальная оценка качества RVS бульонов пр-ва MERCK и ГНЦ ПМБ по биологическим показателям

**Заключение.** RVS-бульон обеспечивает 2-5 кратное накопление сальмонелл через 3-6 ч инкубации по сравнению с контрольными импортными средами, определяемое в соответствии с МУК 4.2.2316-08. Среда обеспечивает высокие ингибирующие свойства в отношении эшерихий и стафилококков. Особенностью XLD-агара является необходимость быстрого охлаждения после нагрева, так как перегрев или медленное охлаждение ведёт к образованию кристаллического преципитата солей, и среда становится непригодной к использованию. Введение в состав XLD-агара производства ФБУН ГНЦ ПМБ желчи снизило стоимость среды, но самое главное, отпала необходимость её быстрого охлаждения в процессе приготовления. За 18-20 час инкубации посевов на XLD-агаре ФБУН ГНЦ ПМБ формируются более крупные колонии, что облегчает визуальную интерпретацию результатов. RVS-бульон ФБУН ГНЦ ПМБ обладает выраженным ингибирующим эффектом в отношении сопутствующей микрофлоры и превосходит ком-



мерческий аналог по степени накопления сальмонелл. Получены Регистрационные удостоверения на набор реагентов для бактериологических исследований РУ № ФСР 2010/09163 от 13 ноября 2013 года на RVS-бульон и РУ № ФСР 2010/09165 от 13 ноября 2013 года на XLD-агар.

Многолетний опыт производства и многостадийная система контроля качества гарантирует потребителям соответствие питательных сред по физико-химическим и биологическим требованиям, заложенным в технических условиях и производственных регламентах.

#### Литература

1. Милютина Л. Н., Гурьева О. В., Рожнова С. Ш., Головинова М. А. Эволюция лекарственной резистентности *Sal. Enteritidis*, выделенных от детей // Эпидемиол. и инфекц. болезни. – 2008. - № 2. – С. 44-47.
2. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. т. 1. – М.: Мир, 1997. – С. 430.
3. Продукты пищевые «Методы выявления бактерий рода *Salmonella*». ГОСТ Р 52814 -2007 (ИСО 6579-2002). – С. 19.
4. Методы контроля бактериологических питательных сред: Метод. Указ МУК 4.2.2316-08 – М.: Роспотребнадзор, 2008. – С. 68.
5. Микробиология: Каталог 2004/2005 (MERCK), - М.: ООО ВИТЕК-ФАРМ, 2005. – С. 162, 200.

## ADVANCED DOMESTIC CULTURE MEDIA XLD-AGAR AND RVS-BROTH FOR THE ISOLATION OF SALMONELLA AND THEIR USE IN CLINICAL LABORATORIES

**A.I. SHEPELIN**  
**L.P. SHOLOKHOVA**  
**O.V. POLOSENKO**  
**I.I. MARCHIKHINA**

*Federal budget institution of science "State research center for applied microbiology and biotechnology"*

*e-mail:*  
*shepelin.rabota@rambler.ru*

In institution developed, registered in the order of state registration and first commercialized nutrient broth for *Salmonella* accumulation by Rappaport - Vassiliadis (RVS- broth) and a growing medium for the isolation and differentiation of pathogenic enterobacteria (XLD-agar). RVS-broth provides 2-5 fold accumulation of *Salmonella* within 3-6 hours of incubation as compared to control media imported, XLD-agar is used for isolation and differentiation of pathogenic enterobacteria, in particular *Salmonella* and *Shigella* featured by fermentation of sugars and production of hydrogen sulphide decarboxylase. Introduction of the XLD- agar bile reduced cost environment, but most importantly, it eliminated the need for rapid cooling of the preparing process.

Keywords: culture media, accumulation of *Salmonella*, isolation of enterobacteria.