

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.831.9-002.3-022.7-078

Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Храмов М.В., Шепелин А.П.

## ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск

*Разработаны отечественные питательные среды для выделения и культивирования основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов: гемофилус агар, шоколадный агар, ГБМ-агар. Изучены ростовые и селективные свойства разработанных питательных сред. Гемофилус агар обеспечивает рост Haemophilus influenzae, шоколадный агар, ГБМ-агар – Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae. Отечественные питательные среды не уступают по ростовым характеристикам иностранным аналогам. При использовании питательных сред с селективными добавками возможно избирательное выделение основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов с ингибированием роста микробов-ассоциантов.*

**Ключевые слова:** шоколадный агар; гемофилус агар; ГБМ-агар; селективные добавки; лабораторная диагностика бактериальных менингитов; Neisseria meningitidis; Streptococcus pneumoniae; Haemophilus influenzae.

**Для цитирования:** Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (5): 59–64.

Podkopaev Ya.V., Domotenko L.V., Morozova T.P., Khramov M.V., Shepelin A.P.

THE NATIONAL NUTRIENT MEDIUM FOR DIAGNOSTIC OF PURULENT BACTERIAL MENINGITIS

The state research center of applied microbiology and biotechnology of Rosпотребнадзор, 142279 Obolensk, Russia

*The national growth mediums were developed for isolating and cultivating of main agents of purulent bacterial meningitis - haemophilus agar, chocolate agar, PBM-agar. The growing and selective characteristics of developed growth mediums are examined. The haemophilus agar ensures growth of Haemophilus influenzae. The chocolate agar, PBM-agar ensure growth of Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae. By growing characteristics, the national growth mediums match foreign analogues. Under application of growth mediums with selective additions it is possible to achieve selective isolation of main agents of purulent bacterial meningitis with inhibition of growth of microbes-associates.*

**Key words:** chocolate agar; PBM-agar; haemophilus agar; selective additions; laboratory diagnostic; bacterial meningitis; Neisseria meningitidis; Streptococcus pneumoniae; Haemophilus influenzae

**Citation:** Klinicheskaya Laboratornaya diagnostika. 2015; 60(5): 59–64.

**Введение.** Диагностика инфекционных заболеваний невозможна без бактериологических исследований с выделением чистой культуры возбудителя на питательных средах. Не является исключением диагностика гнойных бактериальных менингитов (ГБМ).

ГБМ вызываются широким спектром микроорганизмов, способных проникнуть через гематоэнцефалический барьер: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и др [6, 7, 15]. Около 90% случаев бактериальных менингитов приходится на *N. meningitidis*, *H. influenzae* тип b, *S. pneumoniae* [4, 8, 13, 15]. Выделение и культивирование этих микроорганизмов осложнено их питательными потребностями.

Для роста *H. influenzae* необходимо наличие в питательной среде факторов роста – X (гемин или гематин) и V (никотинамидадениндинуклеотид – НАД) [1, 4]. Для менингококков и пневмококков требуются среды, содержащие кровь или сыворотку крови животных. Оптимальной питательной средой для выращивания основных возбудителей бактериальных менингитов является

среда лабораторного приготовления – шоколадный агар, содержащая все необходимые для их роста питательные вещества и факторы роста [1, 2, 4]. Ростовые свойства шоколадного агара напрямую зависят от соблюдения температурного режима приготовления среды, качества и типа используемой крови, что может негативно влиять на воспроизводимость исследований с его использованием. Коммерческие питательные среды в отличие от сред лабораторного приготовления стандартны, обладают стабильными ростовыми свойствами. Иностранные производители выпускают питательные среды, в которых густая кровь заменена сухим гемоглобином, витаминами, факторами роста [10, 14]. Эти среды, как сухие, так и готовые к применению, используются для выделения и культивирования основных возбудителей бактериальных менингитов [11, 12, 16].

Разработка и организация промышленного выпуска отечественных питательных сред, способных обеспечить рост основных возбудителей ГБМ, является актуальной задачей. В ГНЦ ПМБ разработана питательная среда для культивирования менингококков (менингоагар). Возможности использования данной питательной среды в диагностике бактериальных менингитов ограничены из-за узкого спектра специфической активности – менингоагар не поддерживает рост *H. influenzae* и недостаточно хорошо поддерживает рост пневмококков.

Цель исследования – разработать состав и техноло-

Для корреспонденции:

Подкопаев Ярослав Васильевич, podkopaev@obolensk.org

гию промышленного изготовления питательных сред для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ, не требующих добавления крови, изучить их биологические свойства.

**Материалы и методы.** При конструировании питательных сред применены белковые гидролизаты производства ФБУН ГНЦ ПМБ: панкреатический гидролизат казеина сухой (ПГК) по ТУ 9385-018-78095326-2006, сернокислотный гидролизат казеина (СГК) по ТУ 9385-077-78095326-2007, панкреатический гидролизат рыбной муки сухой (ПГРМ) по ТУ 9385-017-78095326-2006, сернокислотный гидролизат рыбной муки сухой (сернокислотный ГРМ марки ФКС) по ТУ 9385-069-78095326-2007, стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ) по ТУ 9385-016-78095326-2007.

В качестве сред сравнения использованы питательные среды: 1) ША ВД – шоколадный агар на основе GC агара (Becton Dickinson) с добавлением 1% гемоглобина (Becton Dickinson) и смеси факторов роста IsoVitaleX (Becton Dickinson); 2) ША ВМ – шоколадный агар со смесью факторов роста PolyViteX (bioMerieux), 3) кровяной агар на основе сердечно-мозгового агара (Brain Heart Infusion agar, Becton Dickinson) с добавлением 5% крови бараньей дефибрированной (Эколаб).

Использованы два клинических изолята *S. pneumoniae* сероваров 2 и 4 и штаммы микроорганизмов, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»: *H. influenzae* тип b 423, *H. influenzae* типа b ATCC 49247, *H. influenzae* типа a ATCC 9006, *S. pneumoniae* серотипа 5 ATCC 6305, *N. meningitidis* серотипа a ATCC 13090, *N. meningitidis* серотипа b ATCC 13077, *N. meningitidis* серотипа c ATCC 13102, *S. aureus* Wood-46, *S. aureus* ATCC 43300, *C. albicans* ATCC 60193, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* 3534, *L. monocytogenes* ATCC 11994, *Listeria seligery* «ГКПМ-Оболенск» В-4913, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Alcaligenes faecalis* ATCC 29212, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *S. pyogenes* Dick1, *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 19433, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018.

В качестве посевного материала использованы суточные культуры микроорганизмов, выращенные в соответствии с рекомендациями, изложенными в паспортах штаммов. Суспензии микроорганизмов для посева готовили в 0,9% растворе натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85 (МЕ) (исходное разведение). Для получения рабочих разведений ( $10^{-1}$ – $10^{-7}$ ) готовили десятикратные разведения в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида. Культуру каждого штамма из рабочих разведений засеивали по 0,1 мл на чашки Петри с питательными средами, распределяя посевной материал по поверхности среды покачиванием чашек, и инкубировали в течение 18–48 ч при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в атмосфере 5–10%  $\text{CO}_2$  в «свечном сосуде».

Качество питательных сред оценивали по физико-химическим свойствам (рН, содержание аминного азота, хлоридов, прочность агарового студня), специфической активности (чувствительность, дифференцирующие, ингибирующие свойства сред, скорость роста, стабильность морфологических признаков микроорганизмов) в соответствии с МУК 4.2.2316-08 [5].

Чувствительность *E. faecalis* к ванкомицину определяли диско-диффузионным методом с использованием дисков производства Becton Dickinson на агаре

Мюллера–Хинтона II (Becton Dickinson). Тестирование чувствительности *L. brevis* ATCC 367 проводили на среде лактобакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) – аналоге агара MRS, который успешно применяют для определения антибиотикочувствительности лактобактерий [17].

Статистический анализ данных проводили, используя программную среду вычислений R (версия 3.0.2). Рассчитывали среднее арифметическое взвешенное и среднее квадратичное отклонение диаметров колоний культур, а также среднее арифметическое и среднее квадратичное отклонение количества колоний.

**Результаты и обсуждение.** Разработана пропись готовой к применению питательной среды для культивирования и выделения *H. influenzae* (гемофилус агар), не требующей добавления крови. В качестве белковой основы среда содержит ПГК. Источниками факторов X и V в среде служат СРГМ и НАД соответственно. Введение в состав питательной среды дрожжевого экстракта, мясного пептона позволило добиться повышения чувствительности среды и увеличения скорости роста *H. influenzae*. Через 18 ч культивирования штаммы *H. influenzae* формируют на гемофилус агаре круглые слизистые полупрозрачные колонии сероватого цвета, практически не отличающиеся от колоний, вырастающих на средах сравнения.

Гемофилус агар, помимо *H. influenzae*, поддерживает рост *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*. При одинаковом количестве их колонии заметно мельче, чем на средах сравнения. Диаметр колоний *S. pneumoniae* на гемофилус агаре через 18 ч культивирования составляет 0,2–0,4 мм, на средах сравнения – 0,4–0,6 мм. Колонии менингококков мельче на гемофилус агаре – 0,6–0,8 мм, на средах сравнения их диаметр достигает 1,0–1,2 мм.

Разработана питательная среда, на которой рост *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* не уступает их росту на иностранных аналогах. В качестве заменителя крови использована смесь гемоглобина и СРГМ в концентрациях 1,0 и 0,5% соответственно. Введение в состав питательной среды цианокобаламина, тиамин пиррофосфата, аденина, L-глутамин, цистеин гидрохлорида позволило улучшить биологические свойства питательной среды. Колонии *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, выращенные на новой среде, крупнее, чем выращенные на гемофилус агаре, практически не отличались ни по размеру, ни по количеству от выросших на ША ВД и ША ВМ.

Разработанная питательная среда получила название «шоколадный агар», так как сходна по внешнему виду с агаром с гретой кровью: однородная непрозрачная светло-коричневого цвета. В зоне роста колоний *S. pneumoniae* на 1-е сутки культивирования наблюдается позеленение питательной среды, типичное для шоколадного агара с гретой кровью, что позволяет проводить дифференциацию пневмококка и других  $\alpha$ -гемолитических стрептококков.

Шоколадный и гемофилус агары, являясь готовыми к применению средами, имеют срок годности один год. Для увеличения срока годности на основе шоколадного агара разработана сухая питательная среда для выделения возбудителей ГБМ (ГБМ-агар).

В ГБМ-агаре гемоглобин полностью заменен на СРГМ с конечной концентрацией в среде 1,2%. Исключение гемоглобина из состава привело к тому, что питательная среда, разлитая в чашки Петри, стала прозрачной светло-коричневого цвета. Сохранилась возможность дифференциации *S. pneumoniae* на питательной среде. В отличие от шоколадного агара на

Таблица 1

Средний размер колоний и среднее количество КОЕ *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* через 18 ч культивирования на различных средах

Штамм, разведение	Гемофилус агар	Шоколадный агар	ГБМ-агар	ША BD	Кровяной агар
<i>H. influenzae</i> 423, 10 <sup>-6</sup>	1,32 ± 0,17*/68 ± 7**	1,33 ± 0,12/73 ± 9	1,35 ± 0,18/79 ± 9	1,32 ± 0,15/75 ± 8	Нет данных
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247, 10 <sup>-6</sup>	1,13 ± 0,16/91 ± 11	1,26 ± 0,18/85 ± 10	1,23 ± 0,17/82 ± 11	1,24 ± 0,18/87 ± 10	Нет данных
<i>H. influenzae</i> ATCC 9006, 10 <sup>-6</sup>	1,21 ± 0,16/112 ± 11	1,30 ± 0,19/119 ± 12	1,31 ± 0,18/116 ± 10	1,31 ± 0,19/108 ± 11	Нет данных
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13102, 10 <sup>-6</sup>	Данные не приводятся	1,26 ± 0,15/69 ± 8	1,27 ± 0,17/67 ± 7	1,26 ± 0,16/71 ± 8	Нет данных
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13077, 10 <sup>-6</sup>	Данные не приводятся	1,17 ± 0,14/94 ± 8	1,20 ± 0,14/91 ± 8	1,18 ± 0,15/97 ± 8	Нет данных
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13090, 10 <sup>-6</sup>	Данные не приводятся	1,00 ± 0,14/61 ± 9	0,97 ± 0,13/64 ± 9	0,98 ± 0,14/59 ± 10	Нет данных
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305, 10 <sup>-5</sup>	Данные не приводятся	0,45 ± 0,15/56 ± 6	0,57 ± 0,13/54 ± 6	0,45 ± 0,16/59 ± 6	0,64 ± 0,12/86 ± 7
<i>S. pneumoniae</i> серотип 2, 10 <sup>-5</sup>	Данные не приводятся	0,46 ± 0,16/51 ± 6	0,55 ± 0,12/56 ± 6	0,46 ± 0,14/61 ± 7	0,67 ± 0,12/93 ± 6
<i>S. pneumoniae</i> серотип 4, 10 <sup>-5</sup>	Данные не приводятся	0,49 ± 0,16/98 ± 8	0,62 ± 0,12/95 ± 9	0,48 ± 0,17/91 ± 8	0,72 ± 0,16/148 ± 10

Примечание. \* – средневзвешенный диаметр колоний и его среднее квадратичное отклонение, мм; \*\* – среднее арифметическое количество колоний и его среднее квадратичное отклонение.

ГБМ-агаре рост пневмококка сопровождается не позеленением, а обесцвечиванием питательной среды в зоне роста культуры. При одинаковом характере роста *H. influenzae* колонии *N. meningitidis*, выращенные на ГБМ-агаре, мельче выращенных на шоколадном агаре. Внесение глюкозы в концентрации 0,1% в питательную среду позволило добиться на ГБМ-агаре хорошего роста всех основных возбудителей бактериальных менингитов.

Изучены биологические показатели наработанных производственных серий питательных сред с использованием клинических изолятов и музейных штаммов. Средние размеры колоний микроорганизмов, среднее КОЕ на разработанных питательных средах без селективных добавок (СД), средах сравнения и результаты роста пневмококков на кровяном агаре через 18 ч культивирования приведены в табл. 1. Различия в характере роста исследованных штаммов на средах ША BD, ША VM незначительны, поэтому в табл. 1 приведены данные только для ША BD.

Морфология колоний *H. influenzae* на всех средах одинакова: штаммы росли в виде серых слизистых блестящих колоний. На гемофилус агаре через 18 ч культивирования у двух штаммов *H. influenzae* наблюдалась более низкая скорость роста; через 22–24 ч культивирования размер колоний всех исследованных штаммов гемофильной палочки был примерно равным на всех средах (см. табл. 1). Количество КОЕ практически одинаково на всех исследованных средах. Поскольку гемофилус агар предназначен только для выделения *H. influenzae*, данные о поведении менингококков и пневмококков на данной среде не приводятся.

Менингококки росли в виде полупрозрачных блестящих сероватого цвета колоний с идеально ровными краями. Размеры колоний *N. meningitidis* на шоколадном агаре, ГБМ-агаре, на агарах ША BD, ША VM не отличались друг от друга. Различия в КОЕ на всех исследованных средах незначительны.

Штаммы *S. pneumoniae* росли на всех средах в виде мелких полупрозрачных четко очерченных, не склонных к слиянию колоний. В период 18–24 ч культивирования колонии были полусферическими, уплощаясь на 2-е сутки роста. Вокруг колоний пневмококков на шоколадном агаре, на агарах ША BD, ША VM наблюдалось позеленение питательной среды, на ГБМ-агаре – обесцвечивание, на кровяном агаре – α-гемолиз. Колонии, вырос-

шие на шоколадном агаре, на агарах ША BD, ША VM, при одинаковой прочности агара незначительно мельче колоний, выросших на ГБМ-агаре. На кровяном агаре колонии всех штаммов *S. pneumoniae* заметно крупнее, их количество на 40–50% больше, чем на средах, не содержащих кровь.

В соответствии с нормативными документами выявление *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* осуществляют как из стерильных в норме локусов, так и из нестерильного клинического материала [4, 9]. При работе со стерильным в норме материалом используют неселективные питательные среды, при выделении возбудителей из нестерильного клинического материала дополнительно производят посев на селективные питательные среды [4].

Для выделения основных возбудителей ГБМ из контаминированного материала к каждой из разработанных питательных сред сконструированы селективные добавки (СД). СД к гемофилус агару содержит бацитрацин. К шоколадному агару, ГБМ-агару разработаны СД, которые позволяют избирательно выделять каждый из искомым микроорганизмов: СД-Г для выделения *H. influenzae*, СД-П для выделения пневмококков, СД-М для выделения менингококков. В состав СД-Г входят бацитрацин, амфотерицин В, ванкомицин; СД-П содержит амфотерицин В, полимиксин В, налидиксовую кислоту; СД-М состоит из амфотерицина В, полимиксина В, ванкомицина.

Разработанные питательные среды поддерживают хороший рост возбудителей ГБМ как без СД, так и с соответствующими добавками: СД или СД-Г, или СД-П, или СД-М. Селективные варианты питательных сред обладают ингибирующими свойствами в отношении многих микробов-ассоциантов. Результаты изучения ингибирующих свойств питательных сред при применении СД представлены в табл. 2.

Использование СД-Г в шоколадном агаре, ГБМ-агаре не оказывало отрицательного влияния на рост штаммов *H. influenzae*, полностью подавляло рост штаммов грамположительных микроорганизмов, включая *S. pneumoniae*. СД практически не ингибировала рост грамотрицательных микроорганизмов за исключением исследованных штаммов *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* ATCC 25238, рост которых отсутствовал через 24 ч культивирования при посеве из разведения 10<sup>-1</sup>, но наблюдался через 48–72 ч в виде единичных колоний. Подоб-

Ростовые свойства разработанных питательных сред с селективными добавками

Штамм	Гемофилус агар с СД	Шоколадный агар и ГБМ-агар с селективными добавками		
		СД-Г	СД-М	СД-П
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	+*/10 <sup>-7</sup> **	+/10 <sup>-7</sup>	-/исходное	-/исходное
<i>H. influenzae</i> 423	+/10 <sup>-7</sup>	+/10 <sup>-7</sup>	-/исходное	-/исходное
<i>H. influenzae</i> ATCC 9006	+/10 <sup>-7</sup>	+/10 <sup>-7</sup>	-/исходное	-/исходное
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13102	-/10 <sup>-2</sup>	-/10 <sup>-2</sup>	+/10 <sup>-7</sup>	-/исходное
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13077	-/10 <sup>-2</sup>	-/10 <sup>-2</sup>	+/10 <sup>-7</sup>	-/исходное
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13090	-/10 <sup>-2</sup>	-/10 <sup>-2</sup>	+/10 <sup>-7</sup>	- / исходное
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	-/исходное	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-5</sup>
<i>S. pneumoniae</i> серотип 2	-/исходное	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-5</sup>
<i>S. pneumoniae</i> серотип 4	-/исходное	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-5</sup>
<i>A. faecalis</i> ATCC 27853	+/10 <sup>-6</sup>	±/10 <sup>-6</sup>	-/исходное	-/исходное
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+/10 <sup>-6</sup>	±/10 <sup>-6</sup>	-/исходное	-/исходное
<i>E. coli</i> ATCC 35218	+/10 <sup>-6</sup>	±/10 <sup>-6</sup>	-/исходное	-/исходное
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	+/10 <sup>-6</sup>	+/10 <sup>-6</sup>	-/10 <sup>-2</sup>	-/исходное
<i>K. pneumoniae</i> 3534	+/10 <sup>-6</sup>	+/10 <sup>-6</sup>	-/10 <sup>-2</sup>	-/исходное
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	-/10 <sup>-2</sup>	-/10 <sup>-2</sup>	-/10 <sup>-3</sup>	-/исходное
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+/10 <sup>-6</sup>	±/10 <sup>-6</sup>	-/исходное	-/исходное
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-6</sup>	+/10 <sup>-6</sup>
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-/исходное	-/исходное	±/10 <sup>-6</sup>	+/10 <sup>-6</sup>
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	-/исходное	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-6</sup>
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	-/исходное	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-6</sup>
<i>G. vaginalis</i> ATCC 14018	-/исходное	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-6</sup>
<i>L. brevis</i> ATCC 367	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-6</sup>	+/10 <sup>-6</sup>
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 11994	нет данных	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-6</sup>
<i>L. seligery</i> B-4913	нет данных	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-6</sup>
<i>S. aureus</i> Wood-46	-/исходное	-/исходное	-/10 <sup>-2</sup>	+/10 <sup>-6</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	-/исходное	-/исходное	-/10 <sup>-2</sup>	+/10 <sup>-6</sup>
<i>S. pyogenes</i> Dick-1	-/исходное	-/исходное	-/исходное	+/10 <sup>-6</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	+/10 <sup>-5</sup>	-/исходное	-/исходное	-/исходное

Пр и м е ч а н и е. \* – характер роста: "+" – рост культуры, подавления нет; "±" – снижение скорости роста по сравнению со средой без селективных добавок; "-" – полное подавление роста. \*\* – минимальное разведение микроорганизма, при посеве из которого наблюдалось полное подавление роста.

ное поведение микроорганизмов отмечено при использовании СД в гемофилус агаре.

Добавление СД-М в шоколадный агар, ГБМ-агар не влияет на рост *N. meningitidis*, подавляет рост большинства грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, включая *H. influenzae*, *S. pneumoniae*. Для некоторых из исследованных микроорганизмов наблюдалось частичное подавление роста. *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis* ATCC 25238 росли в виде единичных колоний через 24 ч инкубирования при посеве из разведений 10<sup>-1</sup> и 10<sup>-2</sup> соответственно, не росли при посеве из последующих разведений. Подобный характер подавления роста наблюдался для *S. aureus*. СД-М не подавляла рост *L. brevis* ATCC 367; оказывала неодинаковое воздействие на рост штаммов *E. faecalis*. СД вызывала полное подавление роста *E. faecalis* ATCC 19433, при этом не влияла на рост *E. faecalis* ATCC 51299, практически не подавляла рост *E. faecalis* ATCC 29212. Исследования чувствительности к ванкомицину, входящему в состав СД-М, показали, что *L. brevis* ATCC 367, *E. faecalis* ATCC 51299

являются устойчивыми, *E. faecalis* ATCC 29212 чувствителен к ванкомицину. Для подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 потребовалось дополнительное увеличение концентрации ванкомицина с 3,0 до 4,0 мг/л.

Добавление СД-П к шоколадному агару, ГБМ-агару не вызывало подавления роста ни одного из исследованных грамположительных микроорганизмов, в том числе *S. pneumoniae*; наблюдалось ингибирование роста всех исследованных штаммов грамотрицательных микроорганизмов, включая *H. influenzae*, *N. meningitidis*.

Поскольку СД для ГБМ-агара, шоколадного агара (СД-Г, СД-М и СД-П) содержат амфотерицин, на всех селективных вариантах питательных сред полностью отсутствовал рост *C. albicans* ATCC 60193. В составе СД нет противогрибковых компонентов, поэтому на гемофилус агаре подавления *C. albicans* не происходит.

**Заключение.** Разработаны прописи и технологии промышленного производства питательных сред для выделения и культивирования основных возбудителей ГБН: гемофилус агар, шоколадный агар, ГБМ-агар. Гемофилус

агар обеспечивает рост *H. influenzae*, шоколадный агар, ГБМ-агар – рост всех основных возбудителей ГБМ (*H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*), при использовании СД – избирательное выделение данных микроорганизмов и подавление роста ассоциантов. Разработанные питательные среды не нуждаются в дополнительном внесении крови. Среда не уступает по ростовым свойствам иностранным коммерческим аналогам. Каждая из разработанных сред представляет собой набор реагентов, состоящий из основы, НАД-содержащей ростовой и СД. Основа ГБМ-агара – сухая, а основы гемофилюса агара, шоколадного агара – стерильные готовые к применению среды. Гемофилюс агар и шоколадный агар зарегистрированы в качестве медицинских изделий (регистрационные удостоверения № ФСР 2011/11118 и № ФСР 2012/13081). ГБМ-агар в настоящий момент проходит процедуру государственной регистрации. Информация по использованию разработанных питательных сред для диагностики ГБМ изложена в методических рекомендациях МР 4.2.0078/1-13 [3].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Богданович Т.М., Стецюк О.У., Кречикова О.И., Боронина Л.Г., Катосова Л.К., Фаустова М.Е. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2 (20): 93–109.
2. Кречикова О.И., Козлов Р.С., Богданович Т.М., Стецюк О.У., Суворов М.М., Катосова Л.К. и др. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 1 (2): 88–98.
3. Методические рекомендации МР 4.2.0078/1-13. Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2014.
4. Методические указания МУК 4.2.1887-04. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2005.
5. Методические указания МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред. М.; 2008.
6. Миронов А.Ю., Савицкая К.И., Воробьев А.А., Нестерова М.В. Микрофлора при заболеваниях ЛОР-органов и нервной системы у больных региона Московской области. *Вестник оториноларингологии*. 2001; 4: 31–5.
7. Миронов А.Ю., Савицкая К.И., Воробьев А.А. Условно-патогенные микроорганизмы при гнойно-воспалительных заболеваниях ЛОР-органов и менингитах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2001; 2: 21–5.
8. Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Глюкина Т.В. *Основы клинической микробиологии и иммунологии. Учебное пособие под ред. проф. А.Ю. Миронова*. Ростов-на-Дону; ГОУ ВПО РостГМУ; 2011.
9. Приказ Министерства Здравоохранения СССР от 22.04.85 г. № 535 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. М.; 1985.
10. Difco & BBL Manual: Manual of microbiological culture media. 2-е изд. Becton, Dickinson and Company; 2009.
11. Gehanno P., Nguyen L., Barry B., Derriennic M., Pichon F., Goehrs J.M. Eradication by ceftriaxone of *Streptococcus pneumoniae* isolates with increased resistance to penicillin in cases of acute otitis media. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 1999; 43 (1): 16–20.
12. Johswich K.O., Zhou J., Law D.K.S., Michael F.St., McCaw S.E., Jamieson F.B. и др. Invasive potential of nonencapsulated disease isolates of *Neisseria meningitidis*. *Infect. and Immun.* 2012; 80(7): 2346–53.
13. Report WHO/CDS/CSR/EDC/99.7. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO communicable disease surveillance and response. World Health Organization: Geneva; 2008.
14. Martin Jr J.E., Billings T.E., Hackney J.F., Thayer J.D. Primary isolation of *N. gonorrhoeae* with a new commercial medium. *Public Health rep.* 1967; 82 (4): 361–3.
15. van Sorge N.M., Doran K.S. Defense at the border: the blood-brain barrier versus bacterial foreigners. *Future microbiol.* 2012; 7 (3): 383–94.
16. Vastine D.W., Dawson C.R., Hoshiwara I., Yoneda C., Daghfous T., Messadi M. Comparison of media for the isolation of *Haemophilus* species from cases of seasonal conjunctivitis associated with severe endemic trachoma. *App. microbiol.* 1974; 28 (4): 688–90.
17. Zdolec N., Filipović I., Cvrtila Fleck Ž., Marić A., Jankuloski D., Kozačinski L. и др. «Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese». *Vet. Arh.* 2011; 81(1): 133–41.

## REFERENCES

1. Bogdanovich T.M., Stetsyuk O.U., Krechikova O.I., Boronina L.G., Katosova L.K., Faustova M.E. Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Haemophilus influenzae*. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*. 2000; 2 (20): 93–109. (in Russian)
2. Krechikova O.I., Kozlov R.S., Bogdanovich T.M., Stecjuk O.Y., Suvorov M.M., Katosova L.K. et al. Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Streptococcus pneumoniae*. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*. 2000; 1 (2): 88–98. (in Russian)
3. Methodical recommendations MR 4.2.0078/1-13. The use of culture media for the diagnosis of purulent bacterial meningitis. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology; 2014. (in Russian)
4. Methodical instructions MUK 4.2.1887-04. Laboratory diagnosis of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology; 2005. (in Russian)
5. Methodical instructions MUK 4.2.2316-08. Methods of control of bacteriological culture media. Moscow; 2008. (in Russian)
6. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorob'ev A.A., Nesterova M.V. Microflora in diseases of upper respiratory tract and nervous system in patients of Moscow region. *Vestnik Otorinolaringologii*. 2001; 4: 31–5. (in Russian)
7. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorob'ev A.A. Opportunistic pathogens with inflammatory diseases of upper respiratory tract and meningitis. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. 2001; 2: 21–5. (in Russian)
8. Mironov A.Yu., Kharseeva G.G., Glyukina T.V. *Fundamentals of Clinical Microbiology and Immunology. Textbook Edited by Professor Mironov A.Yu. [Osnovy Klinicheskoy Mikrobiologii i Immunologii. Uchebnoe Posobie pod Redaktsiey Professora A.Yu. Mironova]*. Rostov-na-Donu: GOU VPO RostGMU; 2011. (in Russian)
9. Order of the Ministry of Health USSR from 22 April 1985 № 535 On the Unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions. Moscow; 1985. (in Russian)
10. Difco & BBL Manual: Manual of microbiological culture media. 2-nd ed Becton, Dickinson and Company; 2009.
11. Gehanno P., Nguyen L., Barry B., Derriennic M., Pichon F., Goehrs J.M. Eradication by ceftriaxone of *Streptococcus pneumoniae* isolates with increased resistance to penicillin in cases of acute otitis media. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 1999; 43 (1): 16–20.
12. Johswich K.O., Zhou J., Law D.K.S., Michael F.St., McCaw S.E., Jamieson F.B. и др. Invasive potential of nonencapsulated disease isolates of *Neisseria meningitidis*. *Infect. and Immun.* 2012; 80(7): 2346–53.
13. Report WHO/CDS/CSR/EDC/99.7. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*,

- Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO communicable disease surveillance and response. World Health Organization: Geneva; 2008.
14. Martin Jr J.E., Billings T.E., Hackney J.F., Thayer J.D. Primary isolation of *N. gonorrhoeae* with a new commercial medium. *Public Health rep.* 1967; 82 (4): 361–3.
15. van Sorge N.M., Doran K.S. Defense at the border: the blood-brain barrier versus bacterial foreigners. *Future microbiol.* 2012; 7 (3): 383–94.
16. Vastine D.W., Dawson C.R., Hoshiwara I., Yoneda C., Daghfous T., Messadi M. Comparison of media for the isolation of *Haemophilus* species from cases of seasonal conjunctivitis associated with severe endemic trachoma. *App. microbiol.* 1974; 28 (4): 688–90.
17. Zdolec N., Filipović I., Cvrtila Fleck Ž., Marić A., Jankuloski D., Kozačinski L. и др. «Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese». *Vet. Arh.* 2011; 81(1): 133–41.

Поступила 21.01.15

Received 21.01.15

**Уважаемые читатели!**

Приглашаем Вас посетить сайт  
«Издательства "Медицина"» в Интернете

Наш адрес:  
**[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)**