

Научная статья
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-245>



Модифицированная питательная среда для выделения и идентификации неферментирующих бактерий

Алешукина А.В. , Голошва Е.В.

Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Введение. Актуальность данного исследования обусловлена необходимостью лабораторного мониторинга за циркуляцией неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ), имеющих высокую этиологическую значимость в возникновении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, а также трудоёмкостью дифференциации данных бактерий на простых питательных средах от представителей энтеробактерий и отдельных представителей НГОБ.

Целью данного исследования явилось конструирование дифференциально-диагностической среды, содержащей отечественные ингредиенты.

Материалы и методы. Определяли эффективность роста тест-штаммов на сопоставляемых питательных средах, их культуральные и морфологические признаки.

Результаты. Предлагаемая модифицированная питательная среда позволяет по цвету колоний и характеру роста как отличать тест-штаммы НГОБ от тест-штаммов других бактерий (грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков), так и различать их между собой, что даёт возможность применять предлагаемую модифицированную питательную среду для дифференциации неферментирующих бактерий от ферментирующих и одновременно первичной дифференциации разных представителей неферментирующих бактерий по изменению цвета среды и цвету колоний.

Ключевые слова: грамотрицательные неферментирующие бактерии, дифференциально-диагностические среды, внутрибольничные инфекции, индикатор, тест-штаммы

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Алешукина А.В., Голошва Е.В. Модифицированная питательная среда для выделения и идентификации неферментирующих бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(5):552–556. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-245>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-245>

Modified nutrient medium for isolation and identification of non-fermenting bacteria

Anna V. Aleshukina , Elena V. Goloshva

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

The **relevance** of this study is due to the need for laboratory monitoring of the circulation of gram-negative non-fermenting bacteria that have a high etiological significance in the occurrence of nosocomial infections, as well as the complexity of differentiating these bacteria on simple nutrient media from representatives of enterobacteria and between individual representatives of gram-negative non-fermenting bacteria.

The **purpose** of this study was to design a differential diagnostic medium containing domestic ingredients.

Materials and methods. The growth efficiency of test strains on comparable nutrient media, their cultural and morphological characteristics were determined.

Results. The modified culture medium makes it possible to distinguish test strains of gram-negative non-fermenting bacteria from test strains of other bacteria (gram-negative enterobacteria, *Staphylococcus*), and between these strains by the color of the colonies and growth patterns. This feature gives the opportunity to apply modified medium for the differentiation of non-fermentative bacteria from fermenting ones and, simultaneously, for the primary differentiation of different representatives of non-fermenting bacteria by changing the color of the medium and different color of colonies.

Keywords: *gram-negative non-fermenting bacteria, differential diagnostic media, nosocomial infections, indicator, test strains*

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Aleshukina A.V., Goloshva E.V. Modified nutrient medium for isolation and identification of non-fermenting bacteria. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):552–556. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-245>

Введение

Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ) являются одними из основных возбудителей внутрибольничных инфекций. Частота возникновения обусловленных НГОБ внутрибольничных инфекций достигает 15% от всех инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, аэробными и факультативно-аэробными грамотрицательными бактериями. При этом их видовой состав в последние годы существенно расширился [1–5].

Выделение штаммов НГОБ на простых питательных средах типа мясопептонного или кровяного агара осложнено, поскольку в этих средах сильнее разрастаются культуры *Staphylococcus* и других сопутствующих бактерий, маскирующих присутствие НГОБ. При этом идентификация НГОБ на указанных средах также затруднена в связи с малой ферментативной активностью данных штаммов и относительной близостью их морфологических и культуральных признаков.

Трудности, возникающие в лабораторной практике при выделении и дифференциации НГОБ из образцов клинического материала, стимулировали разработку различных дифференциально-диагностических сред для выделения НГОБ.

В современной бактериологической практике для выделения штаммов НГОБ из клинических образцов используется широкий спектр питательных сред отечественного и зарубежного производства. Например, для выделения штаммов *Pseudomonas aeruginosa* из клинических образцов и для дифференцирования их от других псевдомонад на основании формирования пигмента пиоцианина используют BD *Pseudomonas Isolation Agar* (агар для выделения псевдомонад). Зарубежные фирмы предлагают для селективного выделения *P. aeruginosa* среды с цетримидом. Поскольку питательная среда с цетримидом обладает низкой аналитической чувствительностью (возможен рост клебсиелл и серраций), ряд фирм добавляют в среду налидиксовую кислоту. Известна отечественная коммерческая «селективная питательная среда для выделения псевдомонад,

сухая» также с добавлением цетримидом и налидиксовой кислоты [6].

Для выделения и идентификации НГОБ используют также дифференциально-диагностические среды нового поколения — флюорогенные и хромогенные, позволяющие идентифицировать различные микроорганизмы непосредственно в процессе культивирования на питательных средах на этапе первичного посева. Принцип действия указанных сред основан на выявлении высокоспецифичных ферментов у искомым микроорганизмов. В состав этих сред входит хромогенный субстрат — вещество, при расщеплении которого ферментами, специфичными для определённого вида микроорганизмов, образуются окрашенные и/или флюоресцирующие продукты. В результате колонии искомым микроорганизмов и/или среда окрашиваются в определённый цвет или приобретают способность к флюоресценции при ультрафиолетовом облучении. HiFluoro *Pseudomonas Agar Base* («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.») предназначена для селективного выделения и идентификации бактерий *P. aeruginosa* из клинического и другого материала флюоресцентным методом. Хромогенная питательная среда BD *Seracia Medium* («Becton Dickinson») применяется для выделения неферментирующих бактерий *Burkholderia cepacia* из клинических образцов.

Таким образом, известные питательные среды зарубежного производства, предназначенные для выделения отдельных видов НГОБ, не обеспечивают возможности одновременного выделения и идентификации нескольких видов НГОБ, особенно при проведении широкомасштабного эпидемиологического мониторинга за ассоциациями штаммов НГОБ, циркулирующими внутри стационаров, к тому же являются дорогостоящими.

Запатентована отечественная дифференциально-диагностическая среда для выделения НГОБ (SU 1351975A1), которая содержит селективный агент — 2,3,5-трифенил-тетразолий хлористый, индикатор (бромтимоловый синий) и позволяет

выделить НГОБ из клинического материала и дифференцировать их от ферментирующих сахара энтеробактерий и протеев [7]. Данная среда, являясь хромогенной, обеспечивает окраску группы НГОБ в бордовый цвет, ферментирующих — в жёлтый, *Proteus mirabilis* формирует колонии чёрного цвета. Однако указанная среда не обеспечивает дифференциацию между отдельными представителями НГОБ.

Целью работы явилось конструирование дифференциально-диагностической среды, содержащей отечественные ингредиенты, позволяющей проводить дифференциацию НГОБ от ферментирующих бактерий и одновременно первичную дифференциацию разных представителей НГОБ по изменению цвета среды и/или колоний бактерий.

Материалы и методы

Состав и способ приготовления предложенной модифицированной питательной среды для выделения и идентификации НГОБ (МодСИ — Модифицированная Среда с Индикатором) защищены патентом на изобретение № 2715329 от 26.02.2020. Среда (рН $7,5 \pm 0,1$) содержит отечественные ингредиенты и имеет следующий состав:

- питательный бульон сухой — 20,0;
- экстракт кормовых дрожжей для микробиологических питательных сред — 1,0;
- Д-глюкоза — 1,0;
- Д-галактоза — 20,0;
- натрия хлорид — 5,0;
- натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия) — 0,3;
- натрий углекислый — 0,5;
- натрий сернистокислый — 0,5;
- феноловый красный — 0,05;
- бромтимоловый синий — 0,05;
- кальций углекислый — 5,0;
- агар микробиологический — $11,0 \pm 2,0$;
- дистиллированная вода — до 1 л.

Эффективность роста тест-штаммов бактерий (НГОБ, грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков) на предложенной среде МодСИ оценивали в сравнении с дифференциально-диагностической средой для выделения НГОБ (SU 1351975A1), питательной средой Эндо и желточно-солевым агаром (ЖСА).

В работе были использованы следующие тест-штаммы бактерий: НГОБ — *Pseudomonas aeruginosa* № 453, *Burkholderia cepacia* № В-7518, *Stenotrophomonas maltophilia* № В-7520; грамотрицательные энтеробактерии — *Escherichia coli* M-17, *Proteus vulgaris* № 869, *Proteus mirabilis* № 878, *Klebsiella pneumoniae* № 63, *Salmonella enterica typhimurium* № 67, *Salmonella enterica enteritidis* № 2269, *Salmonella enterica* Dublin № 1976; грамположительные кокки — *S. aureus* № 209-р, *S. epidermidis* № 136. Указанные тест-штам-

мы выращивали на скошенном мясопептонном агаре 24 ч при 37°C, выросшие колонии смывали стерильным изотоническим раствором 0,85% NaCl, готовили взвесь бактерий по оптическому стандарту мутности 10 МЕ и титровали до содержания 1000 кл/мл. Полученную взвесь культур (0,1 мл) высевали, равномерно распределяя шпателем Дригальского, параллельно на среду МодСИ, дифференциально-диагностическую среду для выделения НГОБ (SU 1351975A1), питательные среды Эндо и ЖСА. Посевы инкубировали 24 ч при 37°C. Определяли эффективность роста тест-штаммов на сопоставляемых питательных средах, их культуральные и морфологические признаки.

Результаты

Поставленная цель была достигнута введением в состав питательной среды двухкомпонентной индикаторной системы (феноловый красный + бромтимоловый синий), обеспечивающей дифференциацию НГОБ от ферментирующих бактерий и одновременно первичную дифференциацию разных представителей НГОБ по изменению цвета колоний и характеру роста. Добавление карбоната кальция предотвращает чрезмерное закисление среды продуктами жизнедеятельности бактерий. Среда содержит отечественные ингредиенты.

В ходе решения этой задачи был проведён подбор количества индикаторов для МодСИ. Индикатор феноловый красный и бромтимоловый синий добавляли в среду МодСИ по 0,025 или 0,05 мл/л. При добавлении в состав среды МодСИ индикаторов по 0,025 мл/л колонии исследуемых тест-штаммов (*P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*) не отличались друг от друга по цвету (серые колонии). В то же время при добавлении в среду индикаторов в количестве 0,05 мл/л зафиксирована различная окраска колоний тестируемых штаммов: колонии *P. aeruginosa* окрашивались в чёрно-фиолетовый с металлическим блеском цвет, *B. cepacia* — в белые флюоресцирующие колонии, *S. maltophilia* — в серые. Размеры колоний в обоих случаях составляли 1,5–2,0 мм, количество колониеобразующих клеток (КОЕ) на 1 мл также было практически одинаковым, что свидетельствовало о том, что добавление в среду индикаторов не приводило к угнетению роста исследуемых тест-штаммов.

Следующей задачей нашей работы было сравнение эффективности роста тест-штаммов бактерий (НГОБ, грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков) на МодСИ и аналоговой дифференциально-диагностической среде для выделения НГОБ (SU 1351975), питательной среде Эндо и ЖСА. В соответствии с патентом на изобретение № 2715329 от 26.02.2020 эффективность роста тест-штаммов бактерий на предлагаемой среде МодСИ в сравнении с дифференциально-диагно-

стической средой по SU 1351975, питательной средой Эндо и ЖСА рассчитывалась по количеству выросших КОЕ и проценту высеваемости на чашках со средой, исходя из количества микробных тел в 1 мл микробной взвеси.

Эффективность роста НГОБ на среде МодСИ составила 91–97 КОЕ/мл (91–97%), что сопоставимо с результатами роста на дифференциально-диагностической среде по SU 1351975A1 — 91–100 КОЕ/мл (91–100%).

Установлена достаточно высокая эффективность роста на среде МодСИ грамотрицательных энтеробактерий — 90–98 КОЕ/мл (90–98%) и стафилококков — 90–92 КОЕ/мл (90–92%), соответствующая показателям роста данных бактерий на среде Эндо для грамотрицательных энтеробактерий и ЖСА для стафилококков. Эти данные могут позволить использовать среду МодСИ для выращивания широкого спектра микроорганизмов.

Далее были изучены дифференциальные свойства среды МодСИ в сравнении с контрольными питательными средами для НГОБ (SU 1351975A1), энтеробактерий (среда Эндо) и стафилококков (ЖСА). Указанные выше штаммы были засеяны на испытываемые питательные среды, выросшие колонии были учтены на следующие сутки. Фиксировался характер роста тест-штаммов на данных средах.

Так, на питательной среде сравнения по SU 1351975A1 рост тест-штаммов НГОБ (*Pseudomonas aeruginosa* № 453, *Burkholderia cepacia* № В-7518, *Stenotrophomonas maltophilia* № В-7520) был однотипным: все культуры давали зелёные с бордовым центром колонии диаметром 1,5–2,0 мм. На среде Эндо *B. cepacia* и *S. maltophilia* были неразличимы — бледно-розовые, 1,5–2,0 мм диаметром. *P. aeruginosa* на среде Эндо давала розовые колонии с ажурным краем, до 4 мм в диаметре. В отличие от сред сравнения, на среде МодСИ все 3 тест-штамма НГОБ давали отличающиеся друг от друга колонии: *P. aeruginosa* — чёрно-фиолетовые с металлическим блеском, 1,5–2,0 мм, *B. cepacia* — нежные белые флюоресцирующие, 1,5–2,0 мм, *S. maltophilia* — серые, 1,5–2,0 мм. Таким образом, на предложенной среде МодСИ можно уже при первичном учёте дифференцировать колонии тест-штаммов НГОБ.

При изучении дифференцирующих свойств среды МодСИ в отношении грамотрицательных энтеробактерий средой сравнения выступала среда Эндо, на которой колонии тест-штаммов *Escherichia coli* M-17, *Proteus vulgaris* № 869, *Proteus mirabilis* № 878, *Klebsiella pneumoniae* № 63 выглядели типично согласно общепринятым описаниям: *E. coli* — малиновые колонии с металлическим блеском, до 4,0 мм в диаметре, *P. vulgaris* и *P. mirabilis* — бледно-розовые полупрозрачные с «роением», от 4 мм и более, *K. pneumoniae* — розовые слизистые, 2–4 мм. На среде МодСИ *E. coli*

давали ярко-жёлтые, 1,5–2,0 мм в диаметре колонии; *P. vulgaris* — розово-фиолетовые, до чёрного, с «роением», 2,0–5,0 мм; *P. mirabilis* — сиреневые с «роением», 1,5–4,0 мм; *K. pneumoniae* — розово-жёлтые, слизистые, 2,0–3,0 мм в диаметре.

Колонии тест-штаммов сальмонелл (*Salmonella enterica typhimurium* № 67, *Salmonella enterica enteritidis* № 2269, *Salmonella enterica Dublin* № 1976) на среде Эндо выглядели однотипно и были неотличимы друг от друга — бледно-розовые, прозрачные, 1,5–2,0 мм в диаметре. На среде МодСИ данные штаммы формировали различные типы колоний: *Salmonella enterica typhimurium* № 67 — розовые с металлическим блеском, 1,5–2,0 мм колонии; *Salmonella enterica enteritidis* № 2269 — жёлтые, 1,5–2,0 мм; *Salmonella enterica Dublin* № 1976 — жёлто-розовые, 1,5–2,0 мм.

Таким образом, все испытываемые штаммы энтеробактерий на разработанной нами среде МодСИ демонстрировали различный тип колоний, что позволяло дифференцировать их друг от друга и от НГОБ.

Золотистые и эпидермальные стафилококки (*S. aureus* № 209-р, *S. epidermidis* № 136) на представленной среде давали, соответственно, жёлтые и белые колонии, 0,5–1,0 мм в диаметре и были явно отличимы от колоний НГОБ и энтеробактерий.

Совместное культивирование смесей тест-штаммов на среде МодСИ показало, что все изученные штаммы высевались на чашках в количествах, соответствующих посевной дозе, колонии сохраняли морфологические признаки, описанные выше.

Обсуждение

Таким образом, на среде МодСИ тест-штаммы НГОБ (*P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*) отличались по цвету колоний и характеру роста как от тест-штаммов других бактерий (грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков), так и между собой.

Из полученных результатов следует, что эффективность роста микроорганизмов, взятых в качестве тест-штаммов, на среде МодСИ высока и составляет в сравнении со средой Эндо 96–100%, с дифференциально-диагностической средой для выделения НГОБ (SU 1351975A1) — 97–100%, со средой ЖСА — 100%, что свидетельствует о возможности использования МодСИ для выращивания широкого спектра микроорганизмов.

Заключение

При оценке дифференцирующих свойств среды МодСИ для выделения и идентификации НГОБ установлено, что предлагаемая среда позволяет по цвету колоний и характеру роста отличить тест-штаммы НГОБ (*P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*) как от тест-штаммов других бактерий

(грамотрицательных энтеробактерий, стафилококков), так и между собой, что даёт возможность применять разработанную модифицированную питательную среду для дифференциации НГОБ от ферментирующих бактерий и одновременно первичной дифференциации разных представителей НГОБ по изменению цвета среды и различному цвету колоний в лабораторной практике, в том числе при эпидемиологическом мониторинге за ассоциациями штаммов НГОБ, циркулирующих в стационаре.


СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Благодрава А.С., Зуева Л.П. Основы современной классификации инфекций, связанных с медицинской помощью. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2011; (3): 20–5.
2. Аблякимова Л.Х. Роль микробиологического контроля в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2014; (1): 41–5.
3. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, Общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов. *Инфекции и антимикробная терапия*. 2003; 5(1): 55–9.
4. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, эпидемиологические и микробиологические особенности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2005; 7(3): 271–85.
5. Маркелова Н.Н., Семёнова Е.Ф., Тутельян А.В. Мониторинг возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) в стационаре. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2019; 9(2): 68–74. <https://doi.org/10.18565/epidem.2019.9.2.68-74>
6. Храмов М.В., Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Мартовецкий М.Н. Селективная питательная среда для выделения псевдомонад, сухая. Патент РФ № 2530549; 2014.
7. Кушиева Т.Г., Мороз А.Ф., Меджидов М.М. Дифференциально-диагностическая среда для выделения неферментирующих грамотрицательных бактерий. Патент РФ № SU1351975A1; 1987.

REFERENCES

1. Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., Brusina E.B., Blagodarava A.S., Zueva L.P. Bases for the current classification of healthcare-associated infections. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2011; (3): 20–5. (in Russian)
2. Ablyakimova L.Kh. The role of microbiological control purposes in the prevention of infections, holy associated with the provision of medical assistance. *Zhurnal fundamental'noy meditsiny i biologii*. 2014; (1): 41–5. (in Russian)
3. Zubkov M.N. Non-fermenting bacteria: classification, General characteristics, role in human pathology. Identification of *Pseudomonas* spp. and similar microorganisms. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya*. 2003; 5(1): 55–9. (in Russian)
4. Shaginyan I.A., Chernukha M.Yu. Non-fermentative gram-negative bacteria in the etiology of nosocomial infections: clinical, epidemiological and microbiological features. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2005; 7(3): 271–85. (in Russian)
5. Markelova N.N., Semenova E.F., Tutel'yan A.V. Monitoring the pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) of healthcare-associated infections in a hospital. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2019; 9(2): 68–74. <https://doi.org/10.18565/epidem.2019.9.2.68-74>. (in Russian)
6. Khramov M.V., Shepelin A.P., Polosenko O.V., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Martovetskiy M.N. Selective nutrient medium for the isolation of pseudomonads, dry. Patent RF № 2530549; 2014. (in Russian)
7. Kushieva T.G., Moroz A.F., Medzhidov M.M. Differential diagnostic environment for the isolation of non-fermenting gram-negative bacteria. Patent RF № SU1351975A1; 1987. (in Russian)

Информация об авторах


Алешукина Анна Валентиновна  — д.м.н., рук. лаб. вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону, Россия, aaleshukina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9797-2441>

Голошва Елена Владимировна — к.б.н., в.н.с. лаб. вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4149-9333>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 27.07.2022;
принята к публикации 31.09.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Anna V. Aleshukina  — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of virology, microbiology and molecular biological research methods, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia, aaleshukina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9797-2441>

Elena V. Golosha — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of virology, microbiology and molecular biological research methods, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4149-9333>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 27.07.2022;
accepted for publication 31.09.2022;
published 30.10.2022