

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
**Федеральное бюджетное учреждение науки**  
**«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»**

*На правах рукописи*

Подкопаев Ярослав Васильевич

**РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И  
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНЫХ  
БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ**

Специальности 03.02.03— «Микробиология», 03.01.06— «Биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)»

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат химических наук  
Домотенко Любовь Викторовна

Научный консультант:  
доктор биологических наук  
Шепелин Анатолий Прокопьевич

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ . . . . .</b>	<b>5</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ . . . . .</b>	<b>7</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ . . . . .</b>	<b>13</b>
1.1 Роль основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов (ГБМ) в этиологической структуре инфекционных заболеваний . . .	13
1.2 Характеристики основных возбудителей ГБМ . . . . .	15
1.2.1 <i>Neisseria meningitidis</i> . . . . .	16
1.2.2 <i>Haemophilus influenzae</i> . . . . .	17
1.2.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i> . . . . .	19
1.3 Лабораторная диагностика ГБМ . . . . .	20
1.4 Питательные среды для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ . . . . .	22
1.4.1 Питательные среды лабораторного приготовления . . . . .	22
1.4.2 Полусинтетические и синтетические питательные среды . . .	24
1.4.3 Селективные питательные среды . . . . .	27
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ . . . . .</b>	<b>30</b>
2.1 Микроорганизмы . . . . .	30
2.2 Питательные среды . . . . .	31
2.3 Компоненты питательных сред . . . . .	32
2.4 Приготовление питательных сред . . . . .	34
2.5 Микробиологические методы исследования . . . . .	34
2.5.1 Посев и инкубирование микроорганизмов . . . . .	34
2.5.2 Определение биологических показателей качества питательных сред . . . . .	35
2.5.3 Определение стерильности . . . . .	36
2.5.4 Кондуктометрический метод исследования . . . . .	36
2.5.5 Метод электронной микроскопии . . . . .	37
2.5.6 Клинические испытания . . . . .	38

2.5.7	Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам . . . . .	39
2.6	Молекулярно-биологические методы . . . . .	40
2.7	Физико-химические методы исследования питательных сред . . . . .	41
2.7.1	Определение pH . . . . .	41
2.7.2	Определение массовой доли влаги и сухого остатка . . . . .	41
2.7.3	Определение содержания аминного азота . . . . .	42
2.7.4	Определение содержания хлоридов . . . . .	43
2.7.5	Определение прочности студня, температуры и продолжительности плавления студня . . . . .	44
2.7.6	Определение срока годности . . . . .	44
2.8	Прочие методы, использованные при проведении исследования . . . . .	45
2.8.1	Получение дрожжевого автолизата . . . . .	45
2.8.2	Лиофильное высушивание . . . . .	46
2.8.3	Математическая обработка данных . . . . .	46
<b>Глава 3. РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД . . . . .</b>		<b>47</b>
3.1	Конструирование основы питательной среды для культивирования основных возбудителей ГБМ . . . . .	47
3.1.1	Выбор белкового гидролизата . . . . .	47
3.1.2	Обогащение питательной среды . . . . .	50
3.2	Конструирование питательной среды для выделения и культивирования <i>H. influenzae</i> . . . . .	55
3.3	Конструирование питательных сред для выделения <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> и <i>H. influenzae</i> . . . . .	62
3.4	Изучение биологических показателей качества разработанных питательных сред . . . . .	68
3.4.1	Исследование культуральным методом . . . . .	69
3.4.2	Электронно-микроскопическое исследование . . . . .	73
3.4.3	Исследование методом ПЦР . . . . .	75
<b>Глава 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД . . . . .</b>		<b>79</b>
4.1	Разработка технологии серийного производства основ питательных сред . . . . .	79

4.1.1	Разработка технологии серийного производства основы ГБМ-агара . . . . .	79
4.1.2	Разработка технологии серийного производства основы Гемофилус агара . . . . .	81
4.1.3	Разработка технологии серийного производства основы Шоколадного агара . . . . .	83
4.2	Разработка технологии серийного производства ростовых и селективных добавок . . . . .	86
4.3	Определение сроков годности разработанных питательных сред . .	90
4.4	Определение требований к биологическим показателям производственных серий питательных сред . . . . .	92
<b>Глава 5. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СЕРИЙ РАЗРАБОТАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД . . . . .</b>		<b>96</b>
5.1	Сравнительная оценка биологических показателей качества разработанных питательных и известных сред для культивирования ГБМ . . . . .	96
5.2	Изучение диагностической ценности разработанных питательных сред при исследовании клинических образцов . . . . .	101
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ . . . . .</b>		<b>108</b>
<b>ВЫВОДЫ . . . . .</b>		<b>112</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ . . . . .</b>		<b>113</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ . . . . .</b>		<b>127</b>
<b>СПИСОК РИСУНКОВ . . . . .</b>		<b>130</b>
<b>СПИСОК ТАБЛИЦ . . . . .</b>		<b>133</b>
<b>Приложение А. Фотографии, полученные в результате электронно-микроскопического исследования . . . . .</b>		<b>134</b>
<b>Приложение Б. Регистрационные удостоверения разработанных питательных сред . . . . .</b>		<b>136</b>

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АПД** — Автолизат пекарских дрожжей
- ГБМ** — Гнойные бактериальные менингиты
- ГКнсп** — Панкреатический гидролизат казеина неглубокой степени расщепления
- ГРМ** — Сернокислотный гидролизат рыбной муки
- КА** — Кровяной агар
- КОЕ** — Колониеобразующая единица
- Кровь КРС** — Кровь крупного рогатого скота
- МУК** — Методические указания
- НАД** — Никотинамидадениндинуклеотид
- НАДазы** — Ферменты, разрушающие никотинамидадениндинуклеотид
- НАДФ** — Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НАДФазы** — ферменты, разрушающие никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НАКФФ** — Открытое акционерное общество «Национальное агентство клинической фармакологии и фармации»
- НИИВС им. И. И. Мечникова** — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» Федерального агентства научных организаций
- ПГК** — Панкреатический гидролизат казеина
- ПГРМ** — Панкреатический гидролизат рыбной муки
- ПЦР** — Полимеразная цепная реакция
- РД** — Ростовая добавка для Гемофилус агара
- РД-ША** — Ростовая добавка для Шоколадного агара и ГБМ-агара
- СА** — Сывороточный агар
- СД-Г** — Селективная добавка для выделения гемофильной палочки
- СД-М** — Селективная добавка для выделения менингококка
- СД-П** — Селективная добавка для выделения пневмококка
- СГК** — Солянокислотный гидролизат казеина
- СРГМ** — Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов
- ТУ** — Технические условия

**ФБУН ГНЦ ПМБ** — Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**ФБУН МНИИЭМ** — Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**ФБУН ЦНИИЭ** — Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**ША-БК** — Шоколадный агар с добавлением гретой бараньей крови

**ША-КРС** — Шоколадный агар с добавлением гретой крови крупного рогатого скота

**ША-ВД** — Шоколадный агар на основе гонококкового агара производства Becton Dickinson с добавлением гемоглобина и смеси факторов роста IsoVitalex

**ША-ВМ** — Шоколадный агар готовый к применению производства bioMerieux с добавлением смеси факторов роста PolyViteX

**ША-НМ** — Набор для приготовления шоколадного агара производства HiMedia

**ША-MAST** — Шоколадный агар на основе гонококкового агара производства Mast с добавлением гемоглобина и смеси факторов роста IsoVitalex

**ЭПД** — Экстракт пекарских дрожжей

**АТСС** — Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection, США)

**Нib** — *Haemophilus influenzae* типа b

**НТМ** — *Haemophilus test medium*

**НСТС** — Национальная коллекция типовых культур (National Collection of Type Cultures, Великобритания)

**НТНi** — некапсулированный (нетипируемый) штамм *Haemophilus influenzae*

## ВВЕДЕНИЕ

Гнойные бактериальные менингиты (ГБМ) — тяжёлые инфекционные заболевания, основными этиологическими агентами которых являются *Neisseria meningitidis* (менингококк), *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) и *Haemophilus influenzae* (гемофильная палочка). Заболеваемость менингитом в последнее десятилетие значительно снизилась за счет введения специфической иммунопрофилактики, однако многие больные умирают или остаются нетрудоспособными из-за несвоевременной диагностики болезни. Согласно данным Российского референс-центра по мониторингу за бактериальными менингитами более половины случаев ГБМ остаются нерасшифрованными [1; 2].

Помимо ГБМ, *H. influenzae* и *S. pneumoniae* могут быть причиной и других инвазивных заболеваний: пневмония, артрит, эндокардит, остеомиелит, перикардит, целлюлит [3; 4].

Немаловажное значение *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* занимают и в этиологической структуре респираторных инфекций верхних дыхательных путей. *H. influenzae* и *S. pneumoniae* вызывают бронхит, острый средний отит, острый бактериальный синусит, а *N. meningitidis* — острый менингококковый назофарингит, который может перерасти в генерализованную форму менингококковой инфекции [5; 6; 7]. Несмотря на то, что смертность от этих заболеваний значительно ниже, чем от менингита, они более распространённые. Например, почти две трети детей, достигших трёхлетнего возраста, переносят более одного случая острого среднего отита [4].

Лабораторная диагностика ГБМ и других заболеваний, вызываемых *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, является неотъемлемой составляющей для своевременной и правильной постановки диагноза и назначения адекватного лечения. Лабораторная диагностика, направленная на выявление, идентификацию и определения чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам, сочетает классический культуральный и экспресс методы. При этом культуральный метод с посевом клинического материала на бактериологические питательные среды занимает одно из основных мест в схеме лабораторной диагностики ГБМ, так как позволяет достоверно подтвердить наличие возбудителя [8; 9].

Выделение и культивирование основных возбудителей бактериальных менингитов осложнено особенностями питательных потребностей этих микроорганизмов. Для роста гемофильной палочки необходимо наличие в питательной среде факторов роста — X (гемин или гематин) и V (никотинамидадениндинуклеотид — НАД). Для менингококков и пневмококков требуются среды, содержащие кровь или сыворотку крови животных. Оптимальной питательной средой для выращивания всех трёх основных возбудителей бактериальных менингитов является шоколадный агар (агар с гретой кровью), который содержит все необходимые для их роста питательные вещества и факторы роста [10]. Ростовые свойства шоколадного агара напрямую зависят от соблюдения температурного режима приготовления среды, качества и типа используемой крови. Ряд иностранных фирм-производителей питательных сред выпускают коммерческие шоколадные агары. Эти среды, как сухие, так и готовые к применению, используются для выделения и культивирования всех трёх основных возбудителей бактериальных менингитов.

До последнего времени в России отсутствовало промышленное производство питательных сред данного назначения. Лишь в 2015 г. несколькими фирмами налажено производство готового шоколадного агара на основе сухих питательных сред иностранного производства.

В связи с этим является актуальной разработка питательных сред для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ из отечественных компонентов, а также организация их производства в сухом и готовом к применению виде.

**Целью** данной работы является разработка состава и технологии производства питательных сред для выделения и культивирования основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Разработать и научно обосновать состав питательной среды для выделения и культивирования *H. influenzae*, в том числе *H. influenzae* типа b, готовой к применению, содержащий ростовую и селективную добавки и не требующий дополнительного внесения крови или её элементов.

2. Разработать и научно обосновать состав питательной среды для выделения *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, готовой к применению,



содержащий факторы роста и три селективные добавки для избирательного выделения каждого из возбудителей и не требующий дополнительного внесения крови или её элементов.

3. Разработать и научно обосновать состав сухой питательной среды для выделения *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, не требующий дополнительного внесения крови или её элементов.

4. Изучить диагностическую ценность разработанных питательных сред в ходе лабораторных и клинических испытаний.

5. Разработать технологию промышленного производства разработанных питательных сред.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Состав и технология промышленного производства питательной среды, обеспечивающей культивирование и выделение гемофильной палочки, готовой к применению (Гемофилус агар).

2. Состав и технология промышленного производства питательной среды, обеспечивающей выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовой к применению (Шоколадный агар).

3. Состав и технология промышленного производства питательной среды, обеспечивающей выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухой (ГБМ-агар).

#### **Научная новизна:**

1. Впервые разработана сухая питательная среда для культивирования *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, не требующая добавления крови или гемоглобина. Приоритет питательной среды подтверждён патентом (№ RU 2471865).

2. Впервые в качестве заменителя нативной крови для культивирования *H. influenzae* и в качестве источника фактора X использован стимулятор роста гемофильных микроорганизмов.

3. Впервые установлена возможность использования стимулятора роста гемофильных микроорганизмов в качестве субстрата для придания питательным средам дифференцирующих свойств при культивировании пневмококка.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Выявлено влияние компонентного состава питательных сред на рост *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Установлена зависимость качества

питательных сред для выделения основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов от физико-химических показателей компонентов, что позволило управлять качеством производственных серий питательных сред.

Разработана и утверждена нормативно-техническая документация для промышленного выпуска трех питательных сред: технические условия (ТУ 9398-139-78095326-2011) и промышленный регламент (ПР 78095326-104-2012) на питательную среду для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовую к применению (Шоколадный агар); технические условия (ТУ 9398-121-78095326-2010) и промышленный регламент (ПР 78095326-82-2010) на питательную среду для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовую к применению (Гемофилус агар); технические условия (ТУ 9385-203-78095326-2013) и промышленный регламент (ПР 78095326-130-2013) на питательную среду для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухую (ГБМ-агар); а также инструкции по применению всех трёх питательных сред.

Питательные среды Гемофилус агар, Шоколадный агар и ГБМ-агар зарегистрированы в качестве медицинских изделий (регистрационные удостоверения № ФСР 2011/11118, № ФСР 2012/13081 и № РЗН 2016/4872 от 07.10.2016 г., соответственно) и внедрены в производство на технологической базе ФБУН ГНЦ ПМБ.

Разработаны и утверждены методические рекомендации федерального уровня «Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов» (МР 4.2.0078/1-13) и методические рекомендации учрежденческого уровня «Использование питательной среды для культивирования и выделения гемофильной палочки (Гемофилус агар)».

#### **Методология и методы исследования.**

Методология работы соответствует поставленным целям исследования и включает применение методов научного познания для определения характеристик объектов, необходимых для решения поставленных задач. В качестве теоретической основы исследования использованы методы обобщения и анализа литературных данных и полученных в ходе эмпирических исследований результатов. В качестве эмпирической основы исследования в работе использованы микробиологические (культивирование микроорганизмов, определение стабильности их основных биологических свойств, чувствительности питательных сред и ско-

рости роста микроорганизмов, дифференцирующих и ингибирующих свойств питательных сред); молекулярно-генетические (полимеразная цепная реакция); иммунологические (реакция латекс-агглютинации), кондуктометрический (определение изменения электрического импеданса в среде в процессе роста микроорганизмов), физико-химические (определение рН, массовой доли влаги и сухого остатка, содержания аминного азота, хлоридов, прочности студня, температуры и продолжительности плавления студня сред).

#### **Апробация работы.**

Основные результаты работы докладывались на V Научно-практической междисциплинарной конференции СКФО «Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний микробной этиологии» (г. Железноводск, 5-6 декабря 2013 г.), Всероссийской научно-практической конференции «Воздушно-капельные инфекции: микробиология, биотехнология, иммунология, эпидемиология» (г. Ростов-на-Дону, 26–28 мая 2014 г.), Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология)» (г. Ростов-на-Дону, 13–15 мая 2015 г.), I Национальном конгрессе бактериологов (г. Москва, 23–24 сентября 2015 г.), V Межрегиональной научно-практической конференции «Воздушно-капельные инфекции: микробиология, эпидемиология, биотехнология» (г. Ростов-на-Дону, 10 июня 2016 г.), VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Московская область, 1–3 ноября 2016 г.), Научно-практической конференции «Современные технологии в клинической микробиологии» (г. Москва, 1 марта 2017 г.), Региональной научно-практической конференции «Тенденции развития клинической и санитарной микробиологии» (г. Новосибирск, 15 сентября 2017 г.), а также на семинарах «Актуальные вопросы диагностики инфекционных болезней» в Ростовском государственном медицинском университете (г. Ростов-на-Дону, 26-28 мая 2014 г.), ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» (г. Санкт-Петербург, 23 октября 2014 г.), Омской государственной медицинской академии (г. Омск, 14 ноября 2014 г.) и семинаре «Использование современных средств в микробиологической диагностике» (г. Ростов-на-Дону, 15 мая 2015 г.).

**Личный вклад.**

Автор принимал непосредственное участие в разработке, испытаниях, подготовке нормативно-технической документации и внедрении в производство Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара. Планирование исследования и интерпретация результатов выполнены совместно с к. х. н. Домотенко Л. В.; электронно-микроскопические исследования выполнены совместно с д. б. н. Герасимовым В. Н.; молекулярно-генетические совместно с к. м. н. Асташкиным Е. И; идентификация микроорганизмов с использованием биофизических методов совместно с Детушевым К. В.; исследование клинического материала от больных совместно с к. б. н. Кругловым А. Н. и Рябченко И. В.

**Публикации.**

Основные результаты по теме диссертации изложены в 15 печатных изданиях, из которых 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, 1 патент на изобретение, 1 статья в прочих изданиях, 10 тезисов докладов в сборниках трудов конференций, 1 методические рекомендации.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и двух приложений. Полный объем диссертации составляет 140 страниц с 27 рисунками и 14 таблицами. Список литературы содержит 127 наименований.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Роль основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов (ГБМ) в этиологической структуре инфекционных заболеваний

Гнойные бактериальные менингиты — тяжёлые инфекционные заболевания, при отсутствии лечения которых смертность может достигать 100 %. Даже при оптимальном лечении, в связи с быстротой развития заболевания, смертность от ГБМ остаётся на достаточно высоком уровне, а у людей, переболевших менингитом, могут возникнуть серьёзные неврологические осложнения. Основными этиологическими агентами этих заболеваний являются *N. meningitidis* (менингококк), *S. pneumoniae* (пневмококк) и *H. influenzae* (гемофильная палочка) типа b [8; 11].

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения в мире ежегодно регистрируется около 1,2 миллиона случаев ГБМ. Наиболее частые случаи ГБМ, вызываемые гемофильной палочкой, возникают у детей в возрасте до 5 лет — около 31 случая на 100 000 детей этого возраста. Менингиты, вызываемые пневмококком, преобладают у детей и лиц пожилого возраста. У детей в возрасте до 5 лет уровень заболеваемости пневмококковыми менингитами составляет около 17 случаев на 100 000 детей этого возраста. При этом самым распространённым возбудителем ГБМ остаётся менингококк. Особенно высокие показатели заболеваемости менингококковым менингитом наблюдаются в так называемом «менингитном поясе» — в Африке к югу от Сахары, где в зависимости от сезона количество заболевших в среднем колеблется от 10 до 100 и может превышать 1000 на 100 000 населения [12, с. 3–5; 13].

На территории Российской Федерации мониторинг за менингококковой инфекцией впервые введён лишь в 2008 г., при этом официально учитывается только генерализованная форма менингококковой инфекции [14; 15]. Поэтому оценка заболеваемости ГБМ неменингококковой и неясной этиологии может быть только приблизительная. Согласно данным Российского референс-центра по мониторингу за бактериальными менингитами в 2011 г. суммарное количество ГБМ в России составило 3234 случая, среди которых в этиологии расшифрованных случаев удельная доля *N. meningitidis* составила 55,8 %, *S. pneumoniae* — 18,4 %,

*H. influenzae* — 11 %, а показатель летальности составил в среднем 12,6 %. При этом около 63 % случаев ГБМ остались нерасшифрованными [2; 16], что свидетельствует о недостаточном уровне лабораторной диагностики этих заболеваний.

В последние годы отмечено снижение уровня заболеваемости ГБМ, что обусловлено введением в Национальный календарь профилактических прививок и Календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям специфической иммунопрофилактики против основных возбудителей ГБМ [3; 17; 18]. Например, в России в 2010 и 2011 годах уровень ГБМ менингококковой этиологии составлял 1,16 на 100 000 населения, а в 2015 г. этот показатель снизился до 0,67 [19, с. 124].

Многочисленные исследования подтверждают, что вакцинация является наиболее эффективным способом снижения уровня заболеваемости ГБМ [9]. При этом, многолетнее исследование применения 14-валентной, а затем 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакцины показало, что общая эффективность вакцинации от пневмококкового менингита составляет лишь 57 % [20]. Применение конъюгированных вакцин изменяет фенотипические и генотипические свойства возбудителей, что в свою очередь требует введения новых конъюгированных вакцин [17; 21]. Вакцинирование так же может привести к смене серогруппы возбудителя ГБМ. Например в Бразилии после введения конъюгированной вакцины против *H. influenzae* типа b за один год отмечено снижение на 69 % заболеваемости менингитами, вызываемыми *H. influenzae* типа b, и одновременное восьмикратное увеличение случаев менингитов, вызываемых *H. influenzae* типа a [22].

Особенностью менингококковой инфекции являются периодические подъёмы заболеваемости с длительными межэпидемическими периодами (от 10 до 30 и более лет) [7]. В настоящее время, несмотря на снижение уровня заболеваемости генерализованной формой менингококковой инфекции, исследователи отмечают рост доли взрослого населения среди заболевших менингококковыми менингитами и преобладание наиболее эпидемически значимых штаммов *N. meningitidis* серогруппы A как среди заболевших, так и среди здоровых носителей. На основании этого специалисты делают вывод о возможном начале формирования очередного эпидемического цикла менингококковой инфекции [17; 23].

Помимо ГБМ, *H. influenzae* и *S. pneumoniae* могут быть причиной и других инвазивных заболеваний (пневмония, артрит, эндокардит, остеомиелит, перикардит, целлюлит) [3; 4], наиболее распространённым из которых является пневмония. Например, согласно данным Роспотребнадзора, заболеваемость внебольничными пневмониями бактериальной природы в 2015 г. составила 101,95 случаев на 100 000 населения [19, с. 104]. При этом смертность при тяжёлых случаях внебольничных пневмоний может составлять от 25 до 50 %, а при отсутствии своевременной терапии нетяжёлых пневмоний — 1–10 % [24].

Немаловажное значение *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* занимают и в этиологической структуре респираторных инфекций верхних дыхательных путей. *H. influenzae* и *S. pneumoniae* вызывают бронхит, острый средний отит, острый бактериальный синусит [4–6], а *N. meningitidis* — острый менингококковый назофарингит, который может перерасти в генерализованную форму менингококковой инфекции [7]. Несмотря на то, что эти заболевания менее тяжёлые, чем менингит, они более распространённые. Например, почти две трети детей, достигших трёхлетнего возраста, переносят более одного случая острого среднего отита [4]. При этом государственная статистика по этиологической структуре заболеваний верхних дыхательных путей бактериальной природы в нашей стране не ведётся [19].

Таким образом, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* являются значимыми этиологическими агентами в структуре инфекционных заболеваний.

## 1.2 Характеристики основных возбудителей ГБМ

*N. meningitidis*, *H. influenzae* и *S. pneumoniae* относятся к различным таксономическим группам, в связи с чем отличаются как по морфологическим признакам, так и по питательным потребностям.

### 1.2.1 *Neisseria meningitidis*

*N. meningitidis* представляют собой расположенные попарно кокки диаметром от 0,6 до 1,9 мкм. Клеточное деление происходит в двух плоскостях со второго деления под прямым углом к первому. Поэтому у молодых, растущих культур (возрастом менее 8 ч) можно наблюдать переходные тетрады клеток. Грамотрицательные, но есть тенденция быть устойчивыми к обесцвечиванию. Колонии на шоколадном агаре мелкие круглые гладкие блестящие иногда слизистые и прозрачные, часто радужные. Из-за автолиза с возрастом колонии становятся более маслянистыми и резиноподобными при нажатии микробиологической иглой. Колонии различаются по размеру в зависимости от среды и времени инкубации, через  $(21 \pm 3)$  ч они достигают приблизительно 1,0 мм в диаметре [25, с. 797].

Менингококк, в отличие от других представителей рода *Neisseria*, имеет полисахаридную капсулу. В соответствии с особенностями строения полисахаридной капсулы менингококков подразделяют на 12 серогрупп: А, В, С, X, Y, Z, W-135, 29-Е, К, Н, L, I, среди которых более 90 % случаев генерализованных форм менингококковой инфекции обусловлены серогруппами А, В, С, в остальных случаях в основном серогруппами W-135, X и Y [8; 26].

*N. meningitidis* — строгий аэроб и не растёт в анаэробных условиях, однако при наличии нитрита в питательной среде микроаэрофильные условия усиливают рост за счёт процесса денитрификации (восстановления нитрита до закиси азота через оксид азота) [27]. Для роста *N. meningitidis* требуются минеральные соли и некоторые аминокислоты [25, с. 784]. Для защиты от активных форм кислорода *N. meningitidis* требуется L-глутамин, который микроорганизм метаболизирует в глутатион, необходимый для поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала [28]. Для некоторых штаммов менингококков цистин (или цистеин) является единственным источником серы [29]. Молочная кислота стимулирует рост микроорганизма и выработку специфических факторов патогенности [30].

Оптимальная температура для роста *Neisseria* spp. от  $(36 \pm 1)$  °С, при температуре ниже 30 °С менингококк растёт плохо или вообще не растёт. Высокая относительная влажность воздуха (50 %) благоприятна для роста. После множества пассажей лабораторные штаммы становятся менее прихотливыми по



ростовым потребностям, чем свежие изоляты. Штаммы *N. meningitidis*, как и *N. gonorrhoeae*, на питательных средах быстро снижают жизнеспособность, что вероятно связано с клеточным лизисом (автолизом) [25, с. 784].

### 1.2.2 *Haemophilus influenzae*

*H. influenzae* — граммотрицательные неспорообразующие коккобациллы или небольшие правильные палочки размером  $(0,4\pm 1) \times (0,4\pm 1)$  мкм. В мазках по Граму клетки лежат отдельно, у старых культур могут формироваться нитеподобные цепочки, или филаменты. Колонии на шоколадном агаре гладкие, выпуклые, сероватые полупрозрачные, достигают диаметра от 0,5 до 3,0 мм через 24 ч инкубирования. Колонии капсулированных штаммов обычно крупнее некапсулированных, слизистые и имеют тенденцию к слиянию без видимой линии разграничения. На прозрачной плотной среде колонии капсулированных штаммов радужные при просмотре в косо проходящем свете [31, с. 883, 898].

Штаммы *H. influenzae* могут быть дифференцированы по наличию или отсутствию полисахаридной капсулы. Инкапсулированные, или типизируемые, штаммы *H. influenzae* разделяют на шесть капсульных серотипов (a, b, c, d, e и f), отличающихся по антигенам. Капсула выполняет функцию фактора патогенности, защищая микроорганизм от фагоцитоза. Инкапсуляция обнаруживается агглютинацией с помощью капсульной антисыворотки. Некапсулированные штаммы называются нетипизируемыми. Капсулированные штаммы, как правило, вызывают более инвазивные инфекции. *H. influenzae* типа b (Hib) наиболее часто является причиной ГБМ, а нетипизируемые штаммы — внебольничных пневмоний. Штаммы *H. influenzae* могут быть также отнесены к одному из восьми биоваров (I–VIII), различающихся сочетанием трех биохимических характеристик: продукцией индола, уреазной и орнитиндекарбоксилазной активностью [31, с. 898; 5; 32; 24].

*H. influenzae* — факультативные анаэробы, требуют наличия в питательной среде факторов роста X и V. Фактор X — железосодержащий протопорфирин IX. Потребность в этом факторе роста обусловлена отсутствием ферментов, участвующих в биосинтезе протопорфина из  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты. Фактор X термостабилен и остаётся активным в проавтоклавированных питательных сре-

дах. Кровь, кристаллический гемин или гематин являются полноценными источниками фактора X. Для удовлетворения потребности *H. influenzae* в этом факторе роста достаточно наличия в питательной среде от 2,0 до 10,0 мкг/мл гемина или 5 % крови [31, с. 886; 33; 34]. Отмечается, что потребность в факторе X при аэробном культивировании выше, чем при анаэробном [35].

Фактором V могут служить такие пиридиннуклеотиды, как никотинамид мононуклеотид, никотинамидрибозид, никотинамидгипоксантин динуклеотид (деамино-НАД), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), но чаще всего в питательных средах используют никотинамидадениндинуклеотид (НАД) [36]. Потребность в кристаллическом НАД для *H. influenzae* составляет от 0,2 до 1,0 мкг/мл среды [34]. Этот фактор роста инактивируется под воздействием высокой температуры, поэтому в проавтоклавированных питательных средах отсутствует. Хотя фактор V присутствует в крови, кровяной агар, приготовленный с использованием бараньей крови, а также крови крупного рогатого скота или человека не поддерживает рост гемофильной палочки из-за локализации фактора V внутри эритроцитов и высокой активности ферментов, разрушающих НАД или НАДФ (НАДазы и НАДФазы, соответственно). Прогревание такой крови при температуре  $(80 \pm 10)$  °C в течение нескольких минут высвобождает НАД из эритроцитов и инактивирует НАДазы и НАДФазы. Агар с добавлением гретой крови, называемый за светло-коричневый цвет «шоколадным», поддерживает рост НАД-зависимых представителей рода *Haemophilus* и традиционно используется для выделения и культивирования гемофильной палочки [31, с. 888; 37]. Эритроциты кролика, в отличие от бараньих, обладают низкой осмотической стойкостью, за счёт чего НАД и НАДФ высвобождаются в питательную среду без термической обработки. При нейтральном значении pH из-за высокой активности НАДаз и низкой НАДФаз кроличьей крови НАД разрушается, а НАДФ остаётся в неизменном виде, что позволяет культивировать *H. influenzae* на кровяном агаре с таким типом крови. Кровяные агары, приготовленные с использованием крови крыс и морских свинок, так же поддерживают рост гемофильной палочки [38; 39]. Помимо крови, источником V фактора могут быть не подвергавшиеся воздействию высоких температур экстракты дрожжей, картофеля, моркови, томатов [40].

При посеве на питательные среды, дефицитные по обоим факторам роста или содержащие только фактор X (например, кровяной агар), представители рода

*Haemophilus* могут расти вокруг колоний других бактерий, которые продуцируют факторы роста в избытке. Это явление называется саттелитизм (саттелитный рост) и иногда используется для культивирования и идентификации *Haemophilus* spp. [31, с. 888; 40; 5; 41].

Помимо факторов X и V для роста *H. influenzae* необходимы пантотеновая кислота, тиамин и урацил. Некоторые штаммы нуждаются в пуринах, включая ксантин, гипоксантин и гуанин [42].

Оптимальная температура для роста гемофильной палочки ( $36\pm 1$ ) °C, минимальная температура ( $22,5\pm 2,5$ ) °C. Большинство представителей рода *Haemophilus* погибают при температуре 55 °C в течение 30 мин [31, с. 888].

### 1.2.3 *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* имеет овальные или сферические клетки коккоподобной формы от 0,5 до 1,25 мкм в диаметре, которые как правило располагаются парами. Дальние концы каждой пары стремятся к заострению или ланцетовидной форме. Встречаются также одиночные клетки или короткие цепочки. Длительное культивирование на лабораторных средах способствует формированию длинных цепочек. Строение клеточной стенки типично для грамположительных бактерий, но со старением культуры клетки могут окрашиваться грамотрицательно [43, с. 703; 6]. *S. pneumoniae* растёт на плотных питательных средах в виде мелких не склонных к слиянию полупрозрачных колоний, через 24 ч роста имеют сферическую форму с уплощенным центром [8; 44]. Уплотнение колоний, по видимому, связано с лизисом, вызываемым автолизинем в стационарной фазе роста пневмококка [45; 46].

Для пневмококка характерно наличие полисахаридной капсулы, выполняющей защитную функцию. В настоящее время идентифицировано свыше 90 различных капсульных типов *S. pneumoniae*, из которых наиболее значимыми в этиологической структуре заболеваний являются серогруппы 3, 4, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 18, 19 и 23 [47, с. 169; 19, с. 150].

Из-за особенностей ферментативной системы пневмококка в результате метаболической активности образуется перекись водорода, которая может по-

давливать рост конкурирующих микроорганизмов в верхних дыхательных путях человека [48; 49]. По-видимому, именно перекись водорода при культивировании пневмококка на питательных средах лизирует эритроциты крови и способствует образованию метгемоглобина из гемоглобина, за счёт чего в зоне роста *S. pneumoniae* на кровяном агаре происходит  $\alpha$ -гемолиз, а на шоколадном агаре — позеленение питательной среды [50; 51]. Анаэробное культивирование на средах, содержащих баранью или лошадиную кровь, вызывает  $\beta$ -гемолиз благодаря активности пневмолизина [43, с. 703; 52; 53].

Микроаэрофильные условия культивирования *S. pneumoniae* на плотных питательных средах оказывают стимулирующее действие, но только для 8 % клинических изолятов эти условия являются необходимыми для роста [54—56]. Оптимальная температура культивирования ( $36\pm 1$ ) °C [57, с. 13]

### 1.3 Лабораторная диагностика ГБМ

Лабораторная диагностика ГБМ направлена на обнаружение возбудителя инфекции из клинического материала от больных с клинически выраженной формой заболевания, стёртой формой (например, назофарингит) и с подозрением на менингококковую инфекцию и менингиты иной этиологии с целью назначения адекватной антибактериальной терапии. Вместе с тем, лабораторные исследования могут проводиться не только с диагностической, но и с профилактической целью, а также по эпидемиологическим показаниям. По эпидемиологическим показаниям обследуют лиц, бывших в контакте с больными менингококковой инфекцией, а с профилактической целью — здоровые контингенты с целью слежения за циркуляцией менингококка среди населения [8; 58].

Основным материалом для исследования является ликвор (спинно-мозговая жидкость). Кроме того, из-за возникающей генерализации процесса обязательным объектом исследования является и кровь. Для бактериологического подтверждения менингококкового назофарингита и выявления назофарингеального менингококкового носительства исследуют носоглоточную слизь [8; 59].

Учитывая особенности ГБМ, связанные с полиэтиологичностью возбудителей и тяжелейшим протеканием болезни, лабораторная диагностика требует

сочетания классических и экспресс-методов при идентификации возбудителей. К классическим методам диагностики относится культуральный посев образцов клинического материала на питательные среды. В действующих на территории Российской Федерации нормативных документах по диагностике заболеваний, вызываемых *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, именно этому методу отдаётся предпочтение [8; 24; 59]. Среди экспресс-методов наиболее часто используются микроскопия ликвора или крови, реакция латекс-агглютинации и методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1; 12; 60].

Концентрация микроорганизмов в ликворе при ГБМ может варьироваться от  $\leq 10^3$  до  $10^8$  клеток/мл, а чувствительность микроскопии составляет  $10^4$  клеток/мл [61], поэтому при исследовании клинических образцов этот метод имеет лишь ориентировочное значение и может быть использован только для предварительной постановки диагноза [59].

Сравнительное исследование по выявлению возбудителей бактериальных менингитов показало, что метод латекс-агглютинации уступает по чувствительности методу культурального посева, однако из-за простоты и высокой скорости получения результатов может быть использован в качестве вспомогательного лабораторного теста [62].

В ряде исследований доказана более высокая чувствительность метода ПЦР по сравнению с методом выделения возбудителя на питательных средах из клинических образцов при диагностике ГБМ [63; 64]. При этом отмечается, что метод ПЦР не может полностью заменить бактериологический посев в связи с ограниченным количеством идентифицируемых видов микроорганизмов а также невозможностью выделения чистой культуры возбудителя, необходимой для исследования чувствительности к антибактериальным препаратам, что особенно актуально из-за роста антибиотикоустойчивости микроорганизмов [9; 65].

Таким образом, культуральный метод с посевом клинического материала на бактериологические питательные среды занимает одно из основных мест в схеме лабораторной диагностики ГБМ, поскольку позволяет достоверно подтвердить наличие возбудителя.

## 1.4 Питательные среды для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ

Основные этиологические агенты ГБМ отличаются высокой требовательностью к составу питательных сред, поэтому для их выделения и культивирования необходимо использовать специальные среды, обогащённые ростовыми добавками, кровью или сывороткой крови.

### 1.4.1 Питательные среды лабораторного приготовления

Наиболее распространёнными питательными средами для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ в отечественной клинической практике остаются среды лабораторного приготовления: для *H. influenzae* — шоколадный агар, для *N. meningitidis* — сывороточный агар, а для *S. pneumoniae* — кровяной агар [8; 59; 66]. При этом универсальной питательной средой, на которой успешно культивируют менингококки, пневмококки, гемофильную палочку, а также многие не основные возбудители ГБМ, является шоколадный агар [10; 59].

Для приготовления сывороточного, кровяного и шоколадного агаров в качестве основы может быть использован агар Хоттингера, колумбийский агар, агар для бруцелл, агар Гивенталья-Ведьминой, эритрит-агар, триптиказо-соевый агар, сердечно-мозговой агар, гонококковый агар [8; 12, с. 283–290]. В литературе описаны и другие основы для приготовления питательных сред для возбудителей ГБМ. Так, Casman E. P. разработал основу для приготовления кровяного агара, состоящую из панкреатического перевара казеина, пептического перевара животных тканей, дрожжевого экстракта, мясного экстракта, никотинамида, *p*-аминобензойной кислоты, глюкозы, крахмала и агара. Питательная среда удовлетворяет питательные потребности многих требовательных микроорганизмов, включая *S. pneumoniae*. Входящий в состав питательной среды никотинамид ингибирует ферменты крови, разрушающие фактор роста V, поэтому кровяной агар,

приготовленный с добавлением 5 % лизированной или 5 % дефибринированной и 0,15 % лизированной крови, поддерживает рост *H. influenzae* [67, с. 131; 68].

Marshall J. H. и Kelsey J. C. предложили универсальную питательную среду для общих бактериологических исследований, состоящую из перевара казеина, дрожжевого автолизата, глицерофосфата натрия, лактата калия, глюкозы, солей и агара. Авторы показали возможность использования её в качестве основы кровяного или шоколадного агаров. Обогащение среды гемом и дополнительном внесении содержащего фактор V автолизата дрожжей позволило им культивировать гемофильную палочку без использования нативной крови [69].

Для выделения и культивирования пневмококка и гемофильных палочек Вишняковой и др. был предложен кровяной агар на основе среды, состоящей из гидролизата казеина или гидролизата по Хоттингеру, гидролизата бычьих сердец и экстракта пекарских дрожжей. При этом для роста *H. influenzae* на данной среде использовали диски с сапонином, лизирующие эритроциты и высвобождающие факторы роста [70].

Для выделения гемофильной палочки Борониной и др. был предложен «*H. influenzae*-ЭрДС-агар», состоящий из эритроцитарной массы, дрожжевого экстракта и сыворотки крупного рогатого скота [71].

Костюковой и др. разработан сухой казеиново-дрожжевой агар в качестве основы для приготовления сывороточного агара для выделения и идентификации менингококка [72].

Биологические показатели шоколадного и кровяного агаров напрямую зависят от качества и типа используемой крови. Для приготовления данных сред традиционно используют дефибринированную кровь барана, лошади, крупного рогатого скота [8]. В литературе описан успешный опыт применения свиной и козьей крови. При этом для приготовления с их использованием шоколадного агара необходима более высокая температура и длительное время прогревания, чем при использовании бараньей или лошадиной крови [73–75]. Человеческая кровь не пригодна для приготовления кровяного агара из-за того, что она может содержать антибиотики, антитела и другие антибактериальные агенты [12, с. 40; 76]. Некоторые исследователи в качестве альтернативы дорогостоящей дефибринированной бараньей крови предлагают использовать цитратную кровь [76; 77], однако другие авторы её не рекомендуют [6; 78].

Немаловажное влияние на качество питательных сред с кровью или сывороткой оказывают практические навыки лаборантов при приготовлении сред в лабораториях. Например, при недостаточно точном соблюдении температурного и временного режимов при приготовлении шоколадного агара НАДазы и НАДФазы могут остаться в питательной среде в активном состоянии, и такая среда не сможет обеспечить потребность *H. influenzae* факторе роста V. Во избежание этого рекомендуют дополнительно вносить в шоколадный агар НАД в концентрации до 15 мкг/мл или коммерческие ростовые добавки (PolyVitex, IsoVitaleX и др.) [5].

#### 1.4.2 Полусинтетические и синтетические питательные среды

Существуют питательные среды для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ, которые не требуют внесения сыворотки крови, нативной или гретой крови.

В качестве факторов роста для *H. influenzae* возможно использование пептического гидролизата бараньей крови, так называемую добавку Файлдса (Fildes Enrichment) [79]. Исследования по выделению гемофильной палочки от больных с конъюнктивитом и трахомой показали более низкую диагностическую ценность среды с такой добавкой по сравнению с шоколадным агаром с гретой кровью [80].

В качестве заменителя крови при приготовлении шоколадного агара может быть использована суспензия сухого гемоглобина [12, с. 286–287]. Сухой гемоглобин обладает длительным сроком годности и менее требователен к условиям хранения, чем нативная кровь. Для роста гемофильной палочки в среде с суспензией сухого гемоглобина необходимо добавлять НАД. Иностранные фирмы-производители питательных сред выпускают готовый к применению шоколадный агар, состоящий из гоноккоккового агара, сухого гемоглобина и ростовых добавок [67; 81; 82]. Состав ростовых добавок приведён в таблице 1.1. Ростовая добавка Supplement B содержит дрожжевой автолизат («Hematin Yeast Extract»), в остальных добавках он заменён на другие компоненты. Как видно из таблицы 1.1, состав наиболее распространённых ростовых добавок



IsoVitalex, PolyVitex и CVA Enrichment одинаковый и включает аденин, цианокобаламин, глюкозу, гуанина гидрохлорид, тиамин пиррофосфат, НАД, нитрат железа, тиамин гидрохлорид, L-глутамин, L-цистеина гидрохлорид, L-цистин и *p*-аминобензойную кислоту.

Таблица 1.1 — Состав ростовых добавок для шоколадного агара различных производителей

Название добавки, производитель	Состав на 1 л среды
Supplement B, Difco Laboratories	Глюкоза ..... 1,0 г Тиамин пиррофосфат ..... 0,4 мг НАД ..... 1,2 мг L-глутамин ..... 0,03 г «Nematin Yeast Extract» ..... 10 мл
Supplement VX, Difco Laboratories	Аденин сульфат ..... 0,01 г Цианокобаламин ..... 0,2 мг Глюкоза ..... 1,0 мг Гуанин гидрохлорид ..... 0,3 мг Тиамин пиррофосфат ..... 2,0 мг НАД ..... 3,5 мг Тиамин гидрохлорид ..... 0,06 мг Цитрат железа ..... 0,3 мг L-глутамин ..... 0,2 г L-цистеина гидрохлорид ..... 0,259 г L-цистин ..... 11,0 мг <i>p</i> -аминобензойная кислота ..... 0,25 мг
IsoVitalex, BBL; PolyVitex, bioMerieux	Аденин ..... 0,01 г Цианокобаламин ..... 1,0 мг Глюкоза ..... 1,0 г Гуанин гидрохлорид ..... 0,3 мг Тиамин пиррофосфат ..... 1,0 мг НАД ..... 2,5 мг Нитрат железа ..... 0,2 мг Тиамин гидрохлорид ..... 0,03 мг L-глутамин ..... 0,1 г L-цистеина гидрохлорид ..... 0,259 г L-цистин ..... 11,0 мг <i>p</i> -аминобензойная кислота ..... 0,13 мг

Продолжение таблицы 1.1

Название добавки, производитель	Состав на 1 л среды
CVA Enrichment, GIBCO/BRL	Аденин ..... 0,01 г Цианокобаламин ..... 1,0 мг Глюкоза ..... 1,0 г Гуанина гидрохлорид ..... 0,3 мг Тиамин пиродифосфат ..... 1,0 мг НАД ..... 2,5 мг Нитрат железа ..... 0,2 мг Тиамин гидрохлорид ..... 0,03 мг L-глутамин ..... 0,1 г L-цистеин гидрохлорид ..... 0,29 г L-цистин ..... 11,0 мг p-аминобензойная кислота ..... 0,13 мг

Для выделения патогенных представителей рода *Neisseria* разработана питательная среда New York City Medium, которая состоит из панкреатического пептона, крахмала, фосфатного буфера, крахмала, агара, лизированной суспензии эритроцитов, лошадиной плазмы, дрожжевого диализата, глюкозы, а также ряда антибиотиков для селективного выделения *Neisseria gonorrhoeae* и *N. meningitidis* [83]. Эта питательная среда выпускается иностранными производителями в готовой к употреблению форме в чашках Петри [67; 84].

Мирсковой А. Н. и др. для выделения и культивирования *N. meningitidis* предложена «Питательная среда сухая medium nutritum ad meningococcus siccum». Для стимуляции роста менингококков и в качестве заменителя сыворотки в питательной среде использован йодометилат, получаемый в результате переработки L-треомина — отхода при производстве левомицетина [85].

Гарджиевой А. Г. и Алиевой Р. О. получен патент на изобретение «Питательная среда для выделения *Haemophilus influenzae*». Согласно патенту, питательная среда состоит из казеиново-дрожжевого гидролизата, глюкозы, нитрата железа, агара и 2,3-индолиндиона (изатина). Представляется сомнительным, что питательная среда с таким составом может поддерживать рост *H. influenzae* в монокультуре в связи с отсутствием необходимых факторов роста. Вероятно, рост гемофильной палочки на этой среде обусловлен саттелитизмом, так как в патенте на изобретение есть упоминание о «посеве смеси культур *H. influenzae*, стрептококка и стафилококка» [86].

В Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (НИИВС им. И. И. Мечникова) разработана питательная среда для выделения и культивирования пневмококка на основе ферментативного гидролизата плаценты человека и экстракта кормовых дрожжей [87]. Сотрудниками того же института запатентована питательная среда для выращивания бактерий рода *Haemophilus* и вида *N. meningitidis*. Среда состоит из кислотного гидролизата казеина, препарата «Аминопептид», дрожжевого экстракта, экстракта семян льна, НАД, гемина, глюкозы. Обе эти среды не требуют добавления крови и сыворотки [88; 89].

Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработана питательная среда для культивирования и выделения менингококков, сухая (Менингоагар) [90]. За счёт наличия в питательной среде ферментативного гидролизата сухой крови Менингоагар не требует дополнительного внесения крови или сыворотки.

В литературе описан ряд синтетических питательных сред для культивирования *H. influenzae* [91–93], *N. meningitidis* [94–96] и *S. pneumoniae* [97–101], состоящих из аминокислот, витаминов, солей и факторов роста в заданных концентрациях. Однако применение этих сред ограничено только изучением физиологии микроорганизмов, проведением молекулярно-генетических исследований, а также получением вакцинных препаратов. Кроме того, в связи с различиями в питательных потребностях гемофильной палочки, пневмококка и менингококка, универсальной синтетической питательной среды, предназначенной для культивирования всех трёх видов не существует.

### 1.4.3 Селективные питательные среды

В соответствии с нормативными документами Российской Федерации выявление *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis* осуществляют как из стерильных в норме локусов, так из нестерильного клинического материала [8; 37]. При работе со стерильным в норме материалом (ликвор и кровь) используют неселективные питательные среды. При выделении возбудителей из нестерильного клинического материала дополнительно производят посев на селективные питательные среды [8].

Для селективного выделения гемофильной палочки традиционно используют бацитрацин, который активен в отношении грамположительных микроорганизмов, а также частично подавляет рост нейссерий и некоторых других грамотрицательных микроорганизмов. Концентрация этого антибиотика, рекомендованная различными исследователями, которые занимались выделением *H. influenzae*, варьируется от 750 до 20000 ЕД/л [102; 103]. Chapin K. C. и Doern G. V. использовали для селективного выделения *H. influenzae* добавку, состоящую из ванкомицина (5,0 мг/мл), бацитрацина (300,0 мг/мл) и клиндамицина (1,0 мг/мл) [104].

Для выделения менингококков в отечественной клинической практике рекомендуют среду с линкомицином, активным в отношении грамположительных микроорганизмов [8]. Thayer J. D. и Martin J. E. предложили для выделения *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis* селективную добавку, состоящую из полимиксина В (25 000 единиц/л) и ристоцетина (10 мг/л) [105]. Впоследствии те же авторы разработали другой состав добавки для выделения этих микроорганизмов: колистин (7,5 мг/л), ванкомицин (3 мг/л) и нистатин (12 500 единиц/л) [106]. Среда для выделения гонококков и менингококков New York City Medium в качестве селективных компонентов содержит колистин, триметоприм лактат, ванкомицина гидрохлорид и амфотерицин В [83]. В НИИВС им. И. И. Мечникова разработана селективная питательная среда для выделения менингококков, содержащая ванкомицин (3 мг/л) и колистин (15 мг/л) [107].

Для селективного выделения пневмококка возможно использование сред с добавлением гентамицина в конечной концентрации 5 мг/л [6; 108]. Nichols T. и Freeman R. предложили питательную среду для выделения пневмококков на основе кровяного агара с добавлением гентамицина (2 мг/л), налидиксовой кислоты (50 мг/л) и кристаллического фиолетового (1 : 500 000), которые ингибируют рост представителей рода *Staphylococcus*, а также многих других грамположительных микроорганизмов [109]. В зарубежной лабораторной практике для выделения представителей рода *Streptococcus* используют колумбийский агар с добавлением 5 % бараньей крови, колистина (10 мг/л) и налидиксовой кислоты (10 мг/л) [110; 111].

Таким образом, среди методов лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых основными возбудителями ГБМ, культуральный метод с выделением возбудителей на питательных средах остаётся значимым. В связи с высокими питательными потребностями *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*, возмож-

ность выделения этих микроорганизмов зависит от качества питательных сред. В отечественной лабораторной практике в основном используются нестандартные среды лабораторного приготовления или коммерческие питательные среды иностранного производства.

Несмотря на разнообразие оригинальных прописей отечественных питательных сред для основных возбудителей ГБМ, серийного производства этих сред, за исключением Менингоагара, не было налажено. Разработка и организация промышленного выпуска питательных сред для диагностики основных возбудителей ГБМ, является важной задачей, так как это позволит повысить эффективность лабораторной диагностики, а также снизить долю иностранных питательных сред в отечественной клинической микробиологии.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Микроорганизмы

В работе использовали штаммы микроорганизмов, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»: *H. influenzae* типа b 423, *H. influenzae* типа b ATCC 10211, *H. influenzae* некапсулированный ATCC 49247, *H. influenzae* некапсулированный ATCC 49766, *H. influenzae* типа a ATCC 9006, *N. meningitidis* серотипа a ATCC 13090, *N. meningitidis* серотипа a 208, *N. meningitidis* серотипа b ATCC 13077, *N. meningitidis* серотипа b 0657, *N. meningitidis* серотипа c ATCC 13102, *N. meningitidis* серотипа c 23252, *S. pneumoniae* серотипа 3 ATCC 6303, *S. pneumoniae* серотипа 5 ATCC 6305, *S. pneumoniae* серотипа 19F ATCC 49619, *Alcaligenes faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* ATCC 60193, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiella pneumoniae* 3534, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Listeria monocytogenes* ATCC 11994, *Listeria seeligeri* «ГКПМ-Оболенск» В-4913, *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 43069, *H. parainfluenzae* ATCC 7857, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* Wood-46, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Streptococcus pyogenes* Dick1. Использовали клинические изоляты *S. pneumoniae* серотипов 2 и 4, два клинических изолята *H. influenzae* типа b, два клинических изолята *Haemophilus parainfluenzae*, два клинических изолята *Haemophilus parahaemolyticus*

Дополнительно при проведении медицинских испытаний использовали штаммы *H. influenzae* № 860, *H. influenzae* № 1035, *H. influenzae* № 1058, *H. influenzae* № 1075, *H. influenzae* № 1085, находящиеся в коллекции Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора),

а так же штаммы *H. influenzae* типа b ATCC 10211, *H. influenzae* типа b № 001, *H. influenzae* типа b № 002, *H. influenzae* типа b № 003, *H. influenzae* типа f ATCC 9833, *H. influenzae* некапсулированный NCTC 11315, *N. meningitidis* № B66, клинические изоляты *S. pneumoniae* серотипа 19F и *S. pneumoniae* серотипа 3, находящиеся в коллекции Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора).

## 2.2 Питательные среды

В работе использовали питательные и транспортные среды:

— Набор реагентов для количественного определения микробной загрязненности (Питательная среда № 1 ГРМ, ФБУН ГНЦ ПМБ) по ТУ 9398-001-78095326-2006;

— Питательная среда для выделения и культивирования лактобацилл сухая (Лактобакагар, ФБУН ГНЦ ПМБ) по ТУ 9398-104-78095326-2010;

— агар Мюллера-Хинтон (Mueller Hinton II Agar, Becton Dickinson, кат. № 211438);

— Питательная среда для контроля стерильности сухая (Тиогликолевая среда, ФБУН ГНЦ ПМБ) по ТУ 9398-040-78095326-2008;

— кровяные агары с добавлением 5 % крови бараньей дефибринированной (ТУ 9389-073-70423725-2007, ЭКОлаб) к различным основам: Питательной среды № 1 ГРМ (по ТУ 9398-001-78095326-2006, ФБУН ГНЦ ПМБ), колумбийскому агару (Columbia blood agar base, Oxoid, кат. № CM0331), триптиказо-соевому агару (Trypticase Soy Agar, Becton Dickinson, кат. № 211243) и сердечно-мозговому агару (Brain Heart Infusion agar, Becton Dickinson, кат. № 2011065);

— сывороточный агар с добавлением 15 % сыворотки бычьей (Sterile Adult Bovine Serum, Bovogen, кат. № SABS) на основе Питательной среды № 1 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ);

- шоколадные агары лабораторного приготовления с добавлением 5 % грейковой крови бараньей дефибринированной (ЭКОлаб) или крови крупного рогатого скота (Лейтран) к различным основам: Питательной среде № 1 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ) и колумбийского агара (Columbia blood agar base, Oxoid, кат. № CM0331);
- шоколадный агар на основе гонококкового агара (GC Medium Base, Becton Dickinson, кат. № 211275) с добавлением гемоглобина (Hemoglobin Bovine Freeze-Dried, Becton Dickinson, кат. № 212392) и смеси факторов роста (IsoVitalex Enrichment, Becton Dickinson, кат. № 211875) (далее — ША-BD);
- шоколадный агар на основе гонококкового агара (GC Agar Base, Mast Group Ltd., кат. № DM136D) с добавлением гемоглобина (Hemoglobin Bovine Freeze-Dried, Becton Dickinson, кат. № 212392) и смеси факторов роста (IsoVitalex Enrichment, Becton Dickinson, кат. № 211875) (далее — ША-Mast);
- шоколадный агар готовый к применению во флаконах (CHOCO-F, bioMerieux, кат. № с) с добавлением смеси факторов роста (PolyViteX, bioMerieux, кат. № 55651) (далее — ША-ВМ);
- шоколадный агар готовый к применению в чашках Петри Haemophilus Chocolate 2 Agar (HAE2, bioMerieux, кат. № bioMerieux, кат. № 43681);
- набор для приготовления шоколадного агара (Modified Chocolate Agar Kit, HiMedia, кат. № SM103H);
- Haemophilus test medium (НТМ) на основе Haemophilus test medium base (Oxoid, кат. № CM0898) с добавлением смеси факторов роста (Haemophilus test medium supplement, Oxoid, кат. № SR0158E);
- транспортная среда Эймса с углём (Amies Transport Medium with Charcoal, HiMedia, кат. № M651).

### **2.3 Компоненты питательных сред**

При конструировании питательных сред использовали белковые гидролизаты производства ФБУН ГНЦ ПМБ: панкреатический гидролизат казеина (ПГК) по ТУ 9385-018-78095326-2006, панкреатический гидролизат казеина неглубокой степени расщепления (ГКнсп) по ТУ 9385-020-00479327-2000, солянокислотный



гидролизат казеина (СГК) по ТУ 9385-077-78095326-2007, панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ) по ТУ 9385-017-78095326-2006.

Для обогащения питательных сред использовали пептон по ГОСТ 13805-76 (Порт-Петровск), пептон мясной (Pronadisa, кат. № 1600), дрожжевые экстракты различных производителей (Bio Springer, кат. № 0251/0-PW-L; Sanofi, кат. № 64343).

В качестве источника фактора X использовали стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ, по ТУ 9385-016-78095326-2007, ФБУН ГНЦ ПМБ), черный пищевой альбумин (по ТУ ВУ 100098867.254-2010, Берёзовский мясоконсервный комбинат), гемоглобины сухие растворимые различных производителей (Haemoglobin Powder, HiMedia, кат. № FD022; Hemoglobin Bovine Freeze-Dried, Becton Dickinson, кат. № 212392; гемоглобин бычий порошкообразный «Гемоглобин-80» по ТУ 9358-004-35305730-02, Мобитек-М).

При приготовлении плотных вариантов питательных сред использовали агар микробиологический европейского типа (Conda Pronadisa, кат. № 1814), агар пищевой (CERO Agar Agar powder Type 8925, С.Е. Roepert).

При приготовлении ростовых добавок использовали никотинамидадениндинуклеотид (НАД, Sigma, кат. № 43410), L-цистеина гидрохлорид различных производителей (Panreac, кат. № 152055; Sigma, кат. № C1276), L-глутамин (Sigma, кат. № G3126), аденин (Sigma, кат. № A2786), цианокобаламин (Sigma, кат. № V2876), тиамин пиррофосфат (Sigma, кат. № C8754), мальтодекстрин глюкоидекс с декстрозным эквивалентом 19 (Glucidex, Roquette), декстраны с молекулярной массой 5 000 (Fluka, кат. № 31388), 40 000 (Fluka, кат. № 31389), 60 000 (Fluka, кат. № 31397), 500 000 (Fluka, кат. № 31392), поливинилпирролидон (Sigma, кат. № PVP10).

Для получения автолизата дрожжей использовали дрожжи производства Сотницынского дрожжевого завода, Комбината пищевых продуктов (Санкт-Петербург), предприятия «Воронежские дрожжи».

При приготовлении селективных добавок использовали амфотерицин В (Синтез, рег. № Р N003065/01), бацитрацин (Sigma, кат. № 11702), ванкомицин (Sigma, кат. № 94747), полимиксин В (Sigma, кат. № P-1004; Applichem, кат. № A08900010), налидиксовую кислоту (Chinoïn, регистрационный № П N012374/01), налидиксовой кислоты натриевую соль (Sigma, кат. № N4382).

## 2.4 Приготовление питательных сред

Коммерческие питательные среды готовили в соответствии с инструкциями производителей.

Кровяные, сывороточные и шоколадные агары лабораторного приготовления готовили по стандартным методикам [8].

Экспериментальные варианты питательных сред готовили путём взвешивания компонентов и растворения их в дистиллированной воде с последующей стерилизацией в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. Ростовые добавки, содержащие НАД, готовили путём взвешивания компонентов, растворения их в дистиллированной воде с последующей фильтрационной стерилизацией через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм. Ростовые и селективные добавки вносили в стерильные охлаждённые до температуры  $(47,5 \pm 2,5)$  °С питательные среды.

## 2.5 Микробиологические методы исследования

### 2.5.1 Посев и инкубирование микроорганизмов

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 (исходное разведение). Для получения рабочих разведений (от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ ) 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 от 18 до 72 ч при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в «свечном сосуде» или  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в условиях повышенного содержания  $\text{CO}_2$  (от 5 до 10 %).

## 2.5.2 Определение биологических показателей качества питательных сред

Качество питательных сред оценивали по биологическим и физико-химическим показателям. Биологические (ростовые) свойства определяли по следующим характеристикам:

- стабильность основных биологических свойств микроорганизмов;
- чувствительность питательных сред и скорости роста микроорганизмов;
- дифференцирующие свойства питательных сред;
- ингибирующие свойства питательных сред.

Определение стабильности основных биологических свойств микроорганизмов проводили по характеру роста культуры визуально (форма, структура, диаметр колоний), по морфологии клеток микроорганизмов методом световой микроскопии (форма клеток, их расположение, наличие капсулы), по серологическим свойствам в реакции агглютинации на стекле [112, с. 32–33]. Морфологию клеток культур микроорганизмов, выросших на исследуемых питательных средах, изучали в мазках, окрашенных по Граму [113, с. 16–19]. Наличие капсулы у капсульных форм культур изучали в мазках, окрашенных по Гинсу [114, с. 34]. Световую микроскопию проводили на световом микроскопе Leica DM1000 с цифровой камерой Leica DFC295 (Leica Microsystems). Серологические свойства микроорганизмов изучали в реакции латекс-агглютинации с использованием Wellcogen Bacterial Antigen Rapid Latex Agglutination Test (Thermo Scientific, кат. № R30859602) и «Диагностического набора реагентов для быстрой идентификации возбудителей гнойных бактериальных менингитов — *Haemophilus influenzae* тип b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* тип A, *Neisseria meningitidis* тип B, *Neisseria meningitidis* тип C и *Neisseria meningitidis* тип W 135 в реакции латекс-агглютинации, жидкого» (Латексная тест-система ГБМ, ФБУН ГНЦ ПМБ) по инструкциям производителей.

Чувствительность питательных сред определяли как максимальное разведение культуры, обеспечивающее визуально обнаруживаемый рост колоний искомого штамма в течение  $(21 \pm 3)$  ч при температуре  $(37 \pm 1)$  °C на всех засеянных чашках с испытуемыми питательными средами. Скорость роста определяли по минимальному времени инкубации посевов, за которое при соответствующем разведении обеспечивалось видимое невооруженным глазом формирование

типичных, легко дифференцируемых колоний на чашках Петри с питательной средой [112, с. 33–38].

Дифференцирующие свойства сред определяли по изменению цвета питательной среды в зоне роста культур микроорганизмов [112, с. 33–34].

Ингибирующие свойства селективных вариантов сред определяли как минимальное разведение культуры, при посеве из которого полностью отсутствовал рост при его наличии на неселективных вариантах сред [112, с. 34].

### **2.5.3 Определение стерильности**

Определение стерильности готовых питательных сред проводили визуально путём просмотра от 3 до 5 % каждой партии после инкубации в термостате при температуре 37 °С в течение 7 сут.

Определение стерильности ростовых добавок проводили методом прямого посева. Для этого растворяли содержимое каждого из исследуемых флаконов с добавками в 2,0 мл стерильной дистиллированной воды и засеивали по 1,0 мл в две пробирки, содержащие тиогликолевую среду, одну из которых инкубировали при температуре  $(32,5 \pm 2,5)$  °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, а другую при температуре  $(22,5 \pm 2,5)$  °С для выявления грибов и бактерий с оптимумом роста в данном температурном режиме. Продолжительность инкубации посевов 7 сут [112, с. 18].

### **2.5.4 Кондуктометрический метод исследования**

Кондуктометрический метод использовали для изучения динамики метаболической активности микроорганизмов, растущих на питательных средах, определяя изменение электрического импеданса в среде с помощью микробиологического анализатора «Бак Трак 4100» (SY-LAB Gerate) и программного обеспечения BacMonitor (версия Y1.39Er, SY-LAB) и BacEval (версия Y1.17Er, SY-LAB).

В процессе каждого отдельного измерения на «Бак Трак 4100» в автоматическом режиме регистрировались и отображались в виде отдельных графиков два значения импеданса: М-параметр (импеданс среды) и Е-параметр (импеданс вблизи электродов, или электродный импеданс) [115, с. 11].

Суспензии микроорганизмов для измерения готовили по п. 2.5.1 и засеивали из рабочих разведений ( $10^{-5}$  и  $10^{-6}$ ) в предварительно простерилизованные многоразовые измерительные ячейки, содержащие экспериментальные варианты питательных сред без агара. Инкубировали в микробиологическом анализаторе при температуре  $(37 \pm 1)$  °С от 24 до 48 ч с периодом предварительного нагрева 60 мин и интервалом измерения значений импеданса 10 мин.

### 2.5.5 Метод электронной микроскопии

**Метод ультратонких срезов.** Биомассу микробных клеток, выращенную на плотной питательной среде суспендировали в физиологическом растворе, обрабатывали 4,0 % раствором глутарового альдегида в 0,2 М Na-какодилатном буфере со значением рН 7,2. Фиксацию проводили в течение 12 ч при температуре 4 °С. Дополнительную фиксацию проводили в 4,0 % водном растворе четырехоксида осмия в буфере Райтер-Келленбергера в течение 12 ч при температуре 4 °С. После фиксации и отмывки в буфере микробные клетки дегидратировали в растворе этилового спирта возрастающей концентрации: по 10 мин в 30,0 %, 50,0 %, 70,0 %, 95,0 % спирте и 20 мин в абсолютном спирте при его трехкратной смене. Далее образцы пропитывали смесями абсолютного этанола и аралдита (соотношения 3:1, 1:1, 1:3) при температуре 37 °С в течение суток, затем переносили в чистый аралдит и выдерживали в вакууме ( $10^{-2}$  торр) 1,5 ч при температуре 37 °С. Заливали образцы аралдитом и полимеризовали при температуре 40 °С в течение ночи, затем при температуре 60 °С в течение 1 сут и при температуре 90 °С в течение 2 сут. Срезы фиксированной биомассы получали стеклянным ножом на ультрамикротоме Ultracut (Reichert Jung, Австрия). Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе Н-500 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении от 15000 до 30000 крат.

**Метод негативного контрастирования.** Суспензию клеток после фиксации в глutarовом альдегиде наносили на медную сеточку, покрытую формварой плёнкой, контрастировали  $(1,5 \pm 0,5)$  % раствором уранилацетата и просматривали с помощью электронного микроскопа H-500 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении от 15000 до 45000 крат.

### 2.5.6 Клинические испытания

Исследования питательных сред с использованием образцов клинического материала проводили в следующих организациях:

– Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора);

– Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора);

– Открытом акционерном обществе «Национальном агентстве клинической фармакологии и фармации» (НАКФФ).

В качестве образцов клинического материала использовали образцы спинно-мозговой жидкости (ликвора) от больных детей в возрасте до 5 лет с диагнозом гнойный бактериальный менингит, а так же мазки из зева, взятые от больных и здоровых людей. Все клинические образцы для исследования были предоставлены вышеуказанными организациями.

Взятие образцов ликвора и мазков из зева проводили в соответствии с Приказом Министерства Здравоохранения СССР «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [37].

Клинические образцы мазков из зева от больных поступали на тампонах, помещённых в транспортную среду Эймса с углём. Посев производили путём

втирания тампона, содержащего клинический материал, в поверхность 1/16 части чашки Петри с испытуемыми и контрольной питательными средами с последующим рассевом по оставшейся поверхности микробиологической петлёй методом трёхсегментного истощающего штриха.

Для взятия мазков из зева от здоровых людей использовали стерильные одноразовые ватные тампоны. Тампоны с мазками сразу после взятия помещали в 1,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и суспендировали на встряхивателе для пробирок Vortex со скоростью 1500 об/мин в течение 15 с и высевали по 0,1 мл из каждой полученной суспензии на чашки Петри с исследуемыми и контрольными средами.

Посевы инкубировали от 24 до 48 ч при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  и повышенном содержании  $\text{CO}_2$  (от 5 до 10 %). Первичную дифференциацию выросших колоний микроорганизмов проводили по морфологическим признакам. Для дальнейшей идентификации выделенные культуры рассевали микробиологической петлёй до единичных колоний методом истощающего штриха и через  $(21 \pm 3)$  ч инкубирования исследовали методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) на MALDI Biotyper 3.0 Microflex (Bruker).

### **2.5.7 Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам**

Чувствительность микроорганизмов к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтон с использованием дисков индикаторных производства НИЦФ по стандартной методике [116].

Определение чувствительности *L. brevis* ATCC 367 диско-диффузионным методом проводили на среде Лактобакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ) – аналоге MRS агара, который успешно применяют для определения антибиотикочувствительности лактобактерий [117].

## 2.6 Молекулярно-биологические методы

**Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).** При исследовании культур микроорганизмов методом ПЦР использовали следующие праймеры: G1 (5' GAAGTCGTAACAAGG 3'), специфичного к 3'-концу гена 16S рРНК, и L1 (5' CAAGGCATCCACCGT 3'), специфичного к 5'-концу гена 23S рРНК.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала ПЦР-буфер (20 ммоль Трис-НСl рН 8,4, 50 ммоль КСl, 2,0 ммоль MgCl<sub>2</sub>), по 10 пмоль каждого праймера, 0,2 ммоль каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1 единица фермента Taq ДНК полимеразы (Ферментас) и 10–20 нг ДНК или 1–2 мкл термолизатов бактериальных культур. Условия проведения реакции: начальная денатурация 94 °С (две минуты), затем 30 циклов, включающих: денатурацию при 94 °С 30 с, отжиг при 55 °С 30 с, элонгацию при 72 °С 40 с и заключительное достраивание при 72 °С 10 мин. В исследовании использовали термоциклер Терцик МС 2 (ДНК технология). ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Окрашивание гелей осуществляли раствором этидиум бромид (0,5 мкг/мл).

**Метод со случайными короткими (до 10 нуклеотидных оснований) праймерами (Amplified Polymorphic DNA Assay, RAPD-PCR.** В методе RAPD-PCR использовали случайный праймер ОРА 11 (СААТСГССГТ).

Объем реакционной смеси составлял 30 мкл. Реакционная смесь содержала ПЦР-буфер (20 ммоль Трис-НСl рН 8,4, 50 ммоль КСl, 2,0 ммоль MgCl<sub>2</sub>), праймеры вносились в количестве 10 пмоль, концентрация каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов составляла 0,2 ммоль, количество фермента — 1 единица Таq ДНК-полимеразы (Ферментас), в качестве матрицы использовали 1–2 мкл термолизатов бактериальных культур).

Начальную денатурацию проводили при 95,5 °С три минуты, затем следовали 5 циклов, состоящих из: денатурации при 94 °С 1 мин, отжига при 35 °С — 1 мин и элонгации при 73 °С 2 мин, далее проводили 40 циклов, включающих: денатурацию при 94 °С 30 с, отжиг при 35 °С 30 с и элонгацию при 72 °С 2 мин. Заключительное достраивание осуществляли при 72 °С в течение 10 мин. Продукты амплификации анализировали методом электрофоретического фракци-



онирования в агарозном 1,5 % геле. Окрашивание гелей осуществляли раствором этидиум бромид (0,5 мкг/мл).

**Метод ПЦР с праймерами ERIC 1 и ERIC 2.** Метод проведения полимеразной реакции с праймерами ERIC 1 и ERIC 2 аналогичен методу RAPD-PCR.

## **2.7 Физико-химические методы исследования питательных сред**

### **2.7.1 Определение pH**

Определение pH для сухих препаратов производили потенциометрическим методом с использованием стеклянного электрода ЭС–10603 и электрода сравнения ЭСП–10103 на иономере лабораторном И–160МИ. Измерение проводили в 2 %-м растворе, приготовленном добавлением к 2,0 г сухого препарата 100 мл дистиллированной воды, перемешиванием и последующим фильтрованием через бумажный фильтр [112, с. 10–11].

Определение pH для готовых плотных агаровых сред производили потенциометрическим методом с использованием комбинированного прокалывающего микроэлектрода InLab 427 (Mettler Toledo), предназначенного для измерения pH в полутвёрдых веществах и пищевых продуктах, с помощью измерителя Seven Easy pH (Mettler Toledo). Измерение проводили путём погружения электрода на глубину от 0,5 до 1,0 см в гель, предварительно разлитый по 15–20 мл в мерные стаканчики объёмом 20 мл с последующим застудневанием в течение 1 ч.

### **2.7.2 Определение массовой доли влаги и сухого остатка**

Расчет массовой доли влаги в процентах в сухих препаратах проводили по разности масс до и после высушивания препарата [112, с. 17].

Определение сухого остатка проводили методом удаления влаги путем выпаривания исследуемого раствора и последующем высушивании остатка до по-

стоянного веса [112, с. 18]. Содержание сухого остатка в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(A - D) \times 100}{B}, \quad (2.1)$$

где:

A — вес чашки с исследуемым образцом после высушивания, г;

D — вес чашки, г;

100 — коэффициент пересчета в проценты;

B — объем анализируемого образца, мл.

### 2.7.3 Определение содержания аминного азота

Определение содержания аминного азота проводили методом формольного титрования. Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при значении рН 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяли потенциометрически [112, с. 14–15]. Содержание аминного азота в сухом препарате в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V \times K \times 1,4 \times 100}{C}, \quad (2.2)$$

где:

V — количество раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л) в миллилитрах, пошедшее на титрование испытуемой пробы от рН 7,0 до 9,1;

K — поправка к титру раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л);

1,4 — количество аминного азота в миллиграммах, эквивалентное 1,0 мл раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л);

C — анализируемая навеска сухого препарата, мг;

100 — коэффициент пересчета миллиграммов в проценты.

Содержание аминного азота в жидком препарате в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V \times K \times 1,4 \times 100}{A \times 1000}, \quad (2.3)$$

где:

$V$  — количество раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л) в миллилитрах, пошедшее на титрование испытуемой пробы от рН 7,0 до 9,1;

$K$  — поправка к титру раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л);

1,4 — количество аминного азота в миллиграммах, эквивалентное 1,0 мл раствора натрия гидроксида (0,1 моль/л);

$A$  — анализируемая навеска жидкого препарата, мл;

100 — коэффициент пересчета миллиграммов в проценты;

1000 — коэффициент пересчета миллиграммов в граммы.

#### 2.7.4 Определение содержания хлоридов

Определение содержания хлоридов (в пересчёте на натрия хлорид) проводили аргентометрическим методом. Метод основан на определении ионов хлора после окисления белков перманганатом калия в кислой среде в присутствии нитрата серебра, избыток которого оттитровывают раствором роданида аммония [112, с. 15–17]. Содержание натрия хлорида в препаратах в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(A - D) \times K \times 0,000585 \times 100}{B}, \quad (2.4)$$

где:

$A$  — количество раствора аммония роданида (0,01 моль/л), пошедшего на титрование в контрольном опыте, мл;

$D$  — количество раствора аммония роданида (0,01 моль/л), пошедшего на титрование испытуемого раствора, мл;

$K$  — поправка к титру раствора аммония роданида;

$B$  — количество испытуемого раствора, мл (для жидкого препарата) или навеска образца, мг (для сухого препарата);

0,000585 — количество натрия хлорида, соответствующее 1 мл раствора роданида аммония (0,01 моль/л), г;

100 — коэффициент пересчета в проценты.

### 2.7.5 Определение прочности студня, температуры и продолжительности плавления студня

Определение прочности студня агаровых сред осуществляли методом определения массы нагрузки, необходимой для разрушения структуры образца. Определение проводили с помощью прибора Валента [112, с. 19–21; 118].

Температуру застудневания определяли визуально, фиксируя по термометру, погружённому во флакон с расплавленной средой, температуру перехода содержимого флакона в студень.

Температуру плавления студня среды определяли визуально, фиксируя температуру, при которой агаровый студень полностью перейдет в жидкое состояние.

Определение продолжительности плавления студня среды учитывали визуально. Два флакона с готовой питательной средой выдерживали в кипящей водяной бане, периодически осторожно перемешивая содержимое. Показатель определяли от момента закипания воды до полного расплавления агара [112, с. 20–21].

### 2.7.6 Определение срока годности

Определение срока годности готовых питательных сред проводили методом выемки проб, а сухой среды — методом «ускоренного старения». Метод выемки проб заключается в изучении стабильности показателей качества препарата при хранении его в течение определённого срока при определённой температуре. Метод «ускоренного старения» заключается в выдерживании испытуемого препарата при температурах, превышающих среднюю температуру хранения для ускорения протекающих в них физико-химических процессов [112, с. 22–24; 119]. Срок годности вычисляли по следующей формуле:

$$C = K \times C_3 = 2^{\frac{t_3 - t_{xp}}{10}} \times C_3, \quad (2.5)$$

где:

$C$  — срок хранения (годности) при стандартных условиях

$K$  — коэффициент соответствия срока экспериментального хранения при повышенной температуре сроку хранения при стандартной температуре;

$C_3$  — срок экспериментального хранения;

2 — принятое значение температурного коэффициента скорости химических реакций [112, с. 23];

$t_3$  — температура экспериментального хранения;

$t_{xp}$  — температура стандартного хранения.

При определении срока годности питательных сред обоими методами изучали изменение биологических показателей и следующих физико-химических показателей: внешний вид, значение рН, содержание аминного азота, сухого остатка, хлоридов, прочность студня. Для сухой основы среды, ростовых и селективных добавок определяли время растворения. Для готовых основ питательных сред определяли время расплавления в кипящей водяной бане, температуры плавления и застудневания.

Срок годности среды вычисляли как время хранения препарата, при котором все показатели его качества не изменяются или находятся в пределах допустимых значений, минус 3 месяца [112, с. 22].

## **2.8 Прочие методы, использованные при проведении исследования**

### **2.8.1 Получение дрожжевого автолизата**

Для получения дрожжевой автолизата готовили 30 % суспензию пекарских дрожжей в дистиллированной воде. Помещали полученную суспензию в термостат с температурой 45 °С. Через 48 ч суспензию центрифугировали в течение 3 мин со скоростью 3000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость. Надосадочную жидкость поэтапно фильтровали через картонный фильтр и мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Конечный продукт стерилизовали методом фильтрации через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

### 2.8.2 Лиофильное высушивание

Лиофильное высушивание ростовых и селективных добавок проводили на лиофильном сушильном устройстве АЛЬФА 1-2 LD plus (Martin Christ, кат. № 101521) с предварительным замораживанием препаратов при температуре минус 50 °С в низкотемпературной морозильной камере (MDF-U33V, Sanyo). Продолжительность высушивания составляла  $(22 \pm 2)$  ч до конечного содержания влаги в продукте  $(5 \pm 2)$  %.

### 2.8.3 Математическая обработка данных

Математическую обработку данных и статистический анализ проводили, используя программную среду вычислений R (версия 3.0.2) [120]. Рассчитывали среднее арифметическое взвешенное и среднее квадратичное отклонение диаметров колоний микроорганизмов, а также среднее арифметическое и среднее квадратичное отклонение количества колоний.

### Глава 3. РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Перед началом исследования были определены требования к разрабатываемым питательным средам для культивирования и выделения основных возбудителей ГБМ. Питательные среды должны:

- обеспечивать рост искомым микроорганизмов, в связи с чем должны содержать богатую белковую основу и факторы роста, в частности факторы X и V, необходимые для роста *H. influenzae*;
- обеспечивать стабильность основных биологических свойств выращенных на них микроорганизмов, в том числе по морфологическим, серологическим и молекулярно-генетическим признакам;
- обладать ингибирующими свойствами, позволяющими избирательно выделять *H. influenzae*, *N. meningitidis* или *S. pneumoniae* из контаминированного клинического материала;
- содержать компоненты, позволяющие наладить серийное производство разработанных сред.

#### 3.1 Конструирование основы питательной среды для культивирования основных возбудителей ГБМ

##### 3.1.1 Выбор белкового гидролизата

В известных коммерческих питательных средах для выделения и культивирования таких прихотливых микроорганизмов, как *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*, наиболее часто используются белковые гидролизаты со степенью расщепления около 30 %: панкреатический перевара казеина (Pancreatic digest of casein) и протеозный пептон № 3 (Proteose pepton № 3), которые содержат около 3,7 % амминого азота и 12,7–13,4 % общего азота [67; 121]. Анализ производственных серий выпускаемых во ФБУН ГНЦ ПМБ гидролизатов показал, что по содержанию аминного и общего азота наиболее близкими являются ПГК и ПГРМ (таблица 3.1).

Таблица 3.1 — Физико-химические показатели белковых гидролизатов производства ФБУН ГНЦ ПМБ

Гидролизат	pH	Аминный азот, %	Общий азот, %
ПГК	от 7,2 до 7,5	от 3,5 до 3,9	от 11,0 до 11,4
СГК	от 6,3 до 6,5	от 5,8 до 6,5	от 7,7 до 8,5
ГКнсп	от 6,3 до 6,45	от 2,2 до 2,6	от 9,7 до 10,4
ПГРМ	от 7,3 до 7,5	от 3,4 до 3,8	от 10,1 до 10,6

В связи с этим, для дальнейших исследований выбрали два гидролизата: ПГК и ПГРМ. Ростовые свойства питательных сред, приготовленных на их основе, изучали на модели среды следующего состава: гидролизат — 15 г/л, натрия хлорид — 1 г/л, глюкоза — 1 г/л, НАД — 10 мг/л, гемин — 10 мг/л, агар в количестве, обеспечивающем прочность готовой среды ( $380 \pm 20$ ) г. В варианты питательной среды, предназначенные для посева штаммов *N. meningitidis*, добавляли сыворотку крови (15 мл/л). Для всех вариантов питательной среды устанавливали pH в диапазоне от 7,2 до 7,4.

Результаты посева штаммов гемофильной палочки, менингококка и пневмококка на экспериментальные среды представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 — Наличие роста *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* на экспериментальных вариантах питательных сред с различными гидролизатами через 24 ч и 48 ч культивирования

Штамм	Гидролизат	Разведение					
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	ПГК	+	+	±	±	±	—
	ПГРМ	+	+	+	+	+	±
<i>H. influenzae</i> ATCC 9006	ПГК	+	±	±	±	±	—
	ПГРМ	±	±	±	—	—	—
<i>H. influenzae</i> 423	ПГК	+	+	+	±	±	±
	ПГРМ	+	+	+	±	±	±
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	ПГК	+	+	±	±	±	—
	ПГРМ	±	±	±	—	—	—
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	ПГК	+	+	+	±	±	—
	ПГРМ	+	±	±	±	—	—
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13102	ПГК	+	+	+	+	+	+
	ПГРМ	+	+	+	+	+	±



Продолжение таблицы 3.2

Штамм	Гидролизат	Разведение					
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13090	ПГК	+	+	+	+	+	+
	ПГРМ	+	+	+	+	+	+
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13077	ПГК	+	+	+	+	+	+
	ПГРМ	+	+	+	+	±	±

Примечания: «+» — рост через 24 ч; «±» — рост через 48 ч, отсутствие роста через 24 ч;  
«—» — через 48 ч рост отсутствует

Как видно из таблицы 3.2, питательная среда, приготовленная с использованием ПГК, обеспечивала рост штамма *H. influenzae* ATCC 49247 через 24 ч инкубирования из разведения 10<sup>-2</sup> и через 48 ч из разведения 10<sup>-5</sup>. При этом на среде с ПГРМ видимый рост колоний этого штамма наблюдали из разведения 10<sup>-5</sup> уже через 24 ч инкубирования. В то же время питательная среда с ПГК обеспечивала рост штамма *H. influenzae* ATCC 9006 через 48 ч из разведения 10<sup>-5</sup>, а с ПГРМ только из разведения 10<sup>-3</sup>. Чувствительность вариантов сред с ПГК и ПГРМ в отношении штамма *H. influenzae* 423 оказалась одинаковой: видимый рост культуры из разведения 10<sup>-3</sup> наблюдали через 24 ч инкубирования, а из разведения 10<sup>-6</sup> — через 48 ч.

Для обоих исследованных штаммов пневмококка чувствительность варианта среды, содержащего ПГК, оказалась выше, чем содержащего ПГРМ: через 48 ч инкубирования рост штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 на среде с ПГК наблюдали из разведения 10<sup>-5</sup>, а на среде с ПГРМ только из разведения 10<sup>-3</sup>, штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619 — из разведений 10<sup>-5</sup> и 10<sup>-4</sup>, соответственно.

На варианте среды, содержащей ПГК, все три исследованных штамма менингококков росли через 24 ч инкубирования из разведения 10<sup>-6</sup>. На варианте, содержащем ПГРМ, аналогичные показатели наблюдали только у штамма *N. meningitidis* ATCC 13102. Через 24 ч отсутствовал рост штамма *N. meningitidis* ATCC 13090, посеянного из разведения 10<sup>-6</sup>, а *N. meningitidis* ATCC 13077 — из разведений 10<sup>-5</sup> и 10<sup>-6</sup>.

Более интенсивный рост менингококков по сравнению с другими микроорганизмами на всех экспериментальных вариантах сред обусловлен добавлением сыворотки крови.

Таким образом, среди исследованных гидролизатов для дальнейшего конструирования питательных сред выбрали ПГК, как наиболее оптимальный для

культивирования всех трёх основных возбудителей ГБМ. Однако, чувствительность и скорость роста исследованных штаммов микроорганизмов на экспериментальных вариантах питательной среды были не высокими. Исследованные штаммы *H. influenzae* и *N. meningitidis* на экспериментальных вариантах среды формировали мелкие колонии диаметром от 0,2 до 0,6 мм, а *S. pneumoniae* от 0,2 до 0,4 мм. С целью повышения скорости роста микроорганизмов и чувствительности питательной среды исследовали влияние добавления в среду пептона, дрожжевого экстракта и увеличения концентрации ПГК.

### 3.1.2 Обогащение питательной среды

Исследования по обогащению питательной среды проводили не традиционным методом посева на плотные питательные среды и подсчёта выросших колоний, а кондуктометрическим методом с использованием микробиологического анализатора «Бак Трак 4100», регистрируя динамику метаболической активности микроорганизмов.

Принцип метода основан на том, что в процессе обмена веществ микроорганизмы расщепляют высокомолекулярные соединения (белки, пептиды, полисахариды) с образованием низкомолекулярных заряженных молекул, которые увеличивают проводимость жидких питательных сред, снижая их сопротивление. Сопротивление потоку переменного тока через проводящий материал измеряется как электрический импеданс. Экспоненциальное изменение импедансного сигнала может наблюдаться, когда количество микроорганизмов достигнет порога от  $10^6$  до  $10^7$  клеток/мл. Уменьшение количества питательных веществ или накопление токсических продуктов приводит к замедлению активности микроорганизмов, в результате чего наступает так называемая стационарная фаза. Количество низкомолекулярных метаболитов больше не возрастает, и кривая идет практически параллельно оси абсцисс. Регистрация изменения импеданса происходит относительно исходного уровня сигнала, поэтому ход кривых изменения импеданса во времени отражает кривую роста микроорганизмов в питательной среде [122, с. 6; 115, с. 5–7; 123].

Кондуктометрический метод в микробиологии в настоящее время нашел применение в санитарно-эпидемиологических исследованиях воды, пищевых продуктов и других объектов среды обитания человека с целью ускоренного выявления бактериологического загрязнения. При этом метод позволяет оценить отличия в метаболической активности микроорганизмов при их культивировании в питательных средах с различным составом, а также при их инкубировании в различных условиях, что подтверждено рядом исследований [124; 125; 123].

В наших исследованиях при измерении импеданса среды (М-параметр) и импеданса вблизи электродов (Е-параметр) воспроизводимые результаты получили только по М-параметру для *H. influenzae*, для *S. pneumoniae* — только по Е-параметру; для *N. meningitidis* изменений сигнала по обоим параметрам не происходило при видимом невооруженным глазом росте микроорганизмов в измерительных ячейках. Полученные для *H. influenzae* и *S. pneumoniae* графики изменения импеданса во времени имели вид S-кривых и напоминали кривые роста микроорганизмов.

На рисунке 3.1 показано, что добавление пептона, а также изменение концентрации ПГК в среде с 15 до 25 г/л сокращало время начала экспоненциальной фазы роста кривых при культивировании *H. influenzae* ATCC 49247. Рост кривой импедансного сигнала в варианте среды, содержащей пептон, был интенсивнее, чем в вариантах, содержащих только ПГК. Это может говорить о более высокой метаболической активности *H. influenzae* при культивировании в питательной среде, содержащей пептон.

На рисунке 3.2 показано влияние концентрации дрожжевого экстракта в питательной среде на изменение импедансного сигнала при культивировании *H. influenzae* ATCC 49247. Добавление ЭПД в среду в концентрации 1,0 г/л не приводило к значительному изменению роста кривой импедансного сигнала по сравнению с базовой средой, не содержащей ЭПД. Повышение концентрации дрожжевого экстракта до 2,5 г/л сокращало время начала экспоненциального роста кривой с  $(13,5 \pm 0,5)$  ч до 11 ч, а повышение концентрации до 5,0 г/л сокращало этот период до 8 ч. При этом рост кривой изменения импеданса в среде с добавлением 5,0 г/л ЭПД имел наиболее интенсивный характер и наибольшее значение в процентах по М-параметру по сравнению со остальными средами.

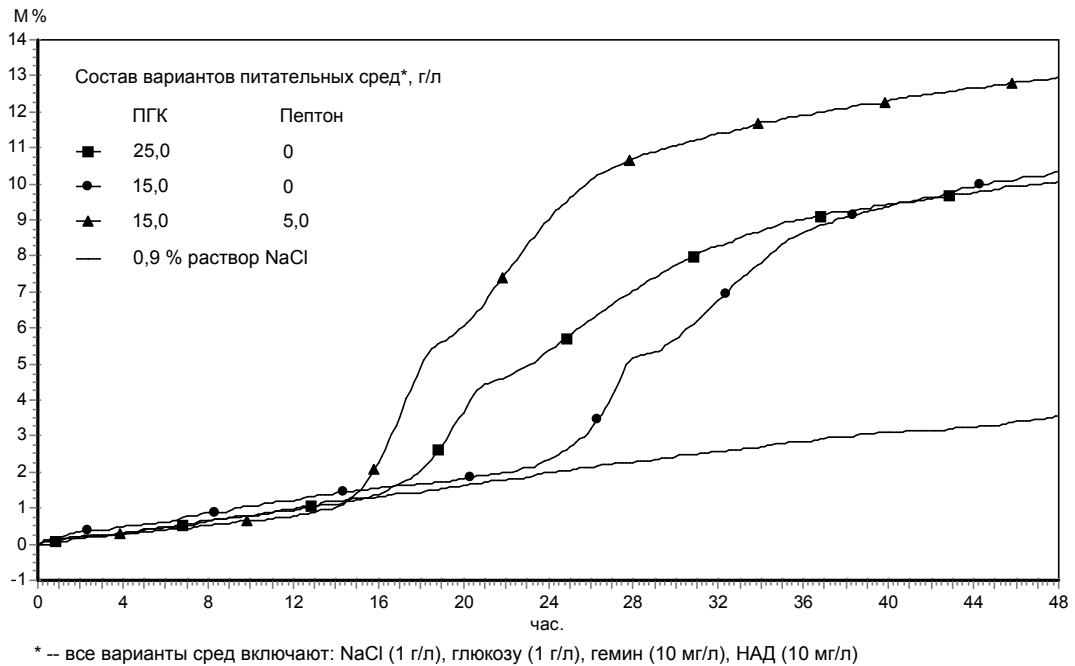


Рисунок 3.1 — Кривые изменения импеданса при культивировании *H. influenzae* ATCC 49247 на экспериментальных вариантах питательных сред

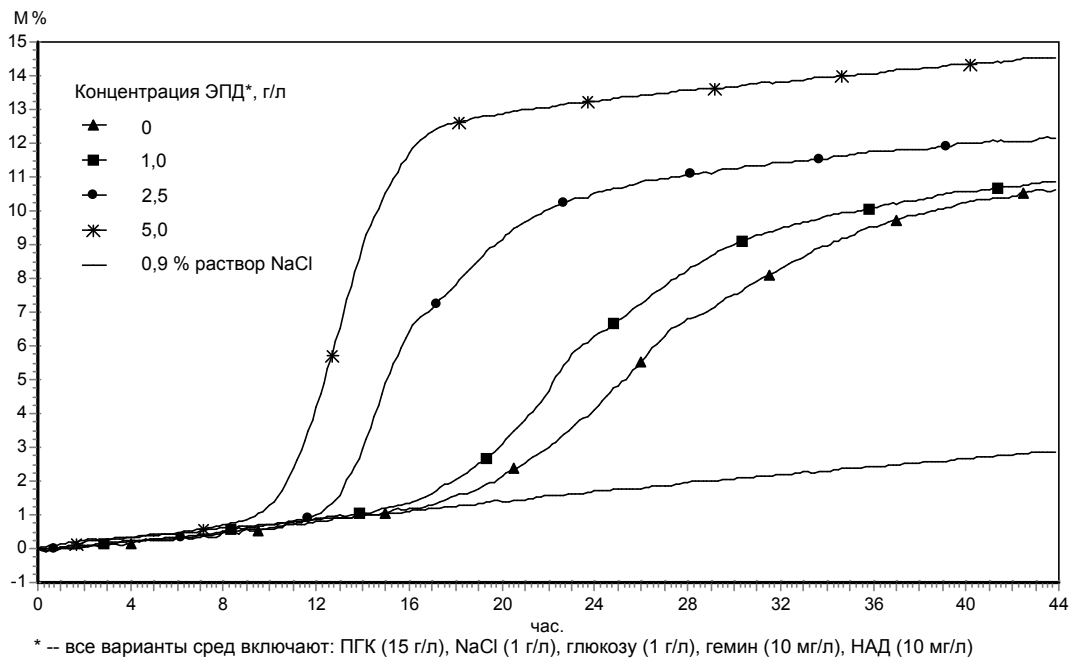


Рисунок 3.2 — Кривые изменения импеданса при культивировании *H. influenzae* ATCC 49247 на средах с различной концентрацией ЭПД

Обогащение питательной среды пептоном или дополнительным количеством ПГК не приводило к существенному изменению времени начала экспоненциального роста кривых при культивировании *S. pneumoniae* ATCC 6305 (рисунок 3.3). При этом как и в случае с *H. influenzae* интенсивность импедансного

сигнала во время роста пневмококка в среде, содержащей пептон, была выше, чем в вариантах, содержащих только ПГК.

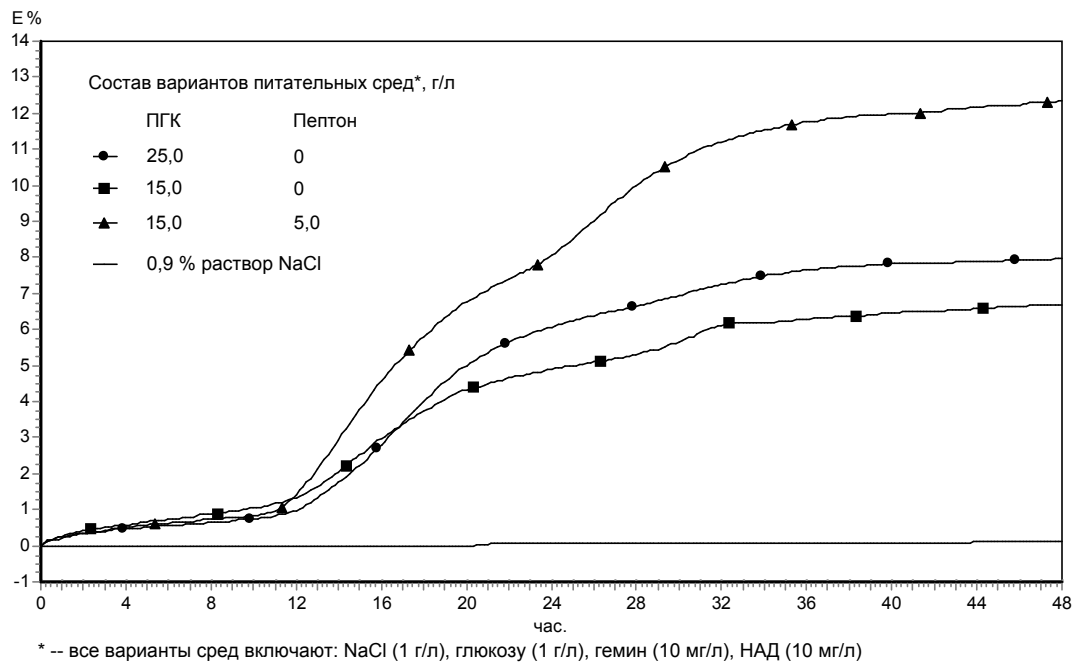


Рисунок 3.3 — Кривые изменения импеданса при культивировании *S. pneumoniae* ATCC 6305 на экспериментальных вариантах питательных сред

Как видно из рисунка 3.4, добавление в питательную среду дрожжевого экстракта в концентрациях 1,0, 2,5 и 5,0 г/л практически не влияло на изменение импедансного сигнала при культивировании *S. pneumoniae* ATCC 6305.

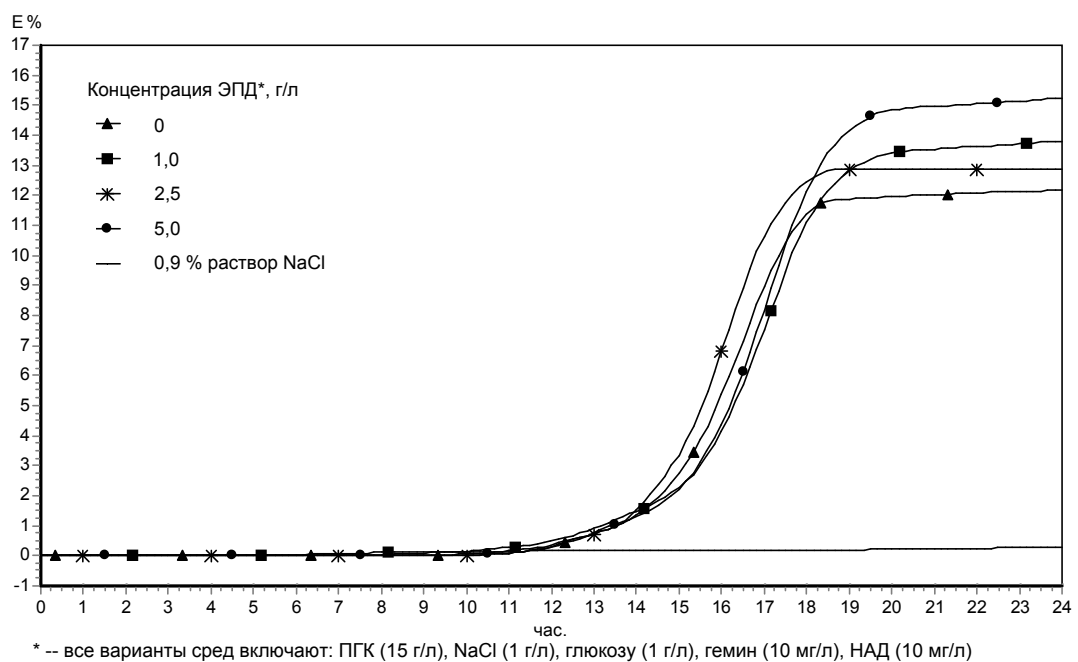
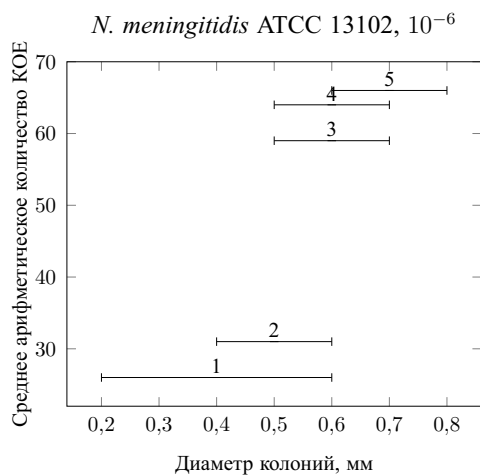
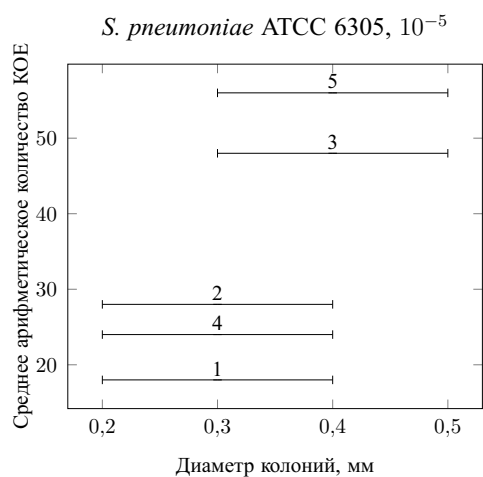
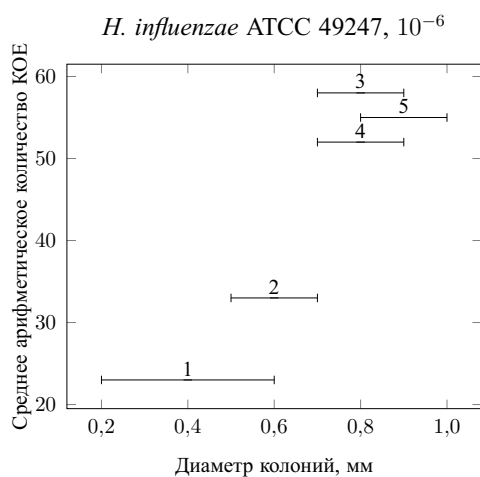


Рисунок 3.4 — Кривые изменения импеданса при культивировании *S. pneumoniae* ATCC 6305 на средах с различной концентрацией ЭПД

Для подтверждения достоверности результатов, полученных кондуктометрическим методом, для плотных сред, а также влияния изученных добавок на рост *N. meningitidis*, провели исследование методом бактериологического посева на плотные питательные среды.

На рисунке 3.5 показано, что дополнительное внесение в среду ПГК до конечной концентрации 25 г/л приводило к незначительному увеличению размеров колоний *H. influenzae* с  $(0,4 \pm 0,2)$  до  $(0,6 \pm 0,1)$  мм в диаметре и практически не влияло на рост *S. pneumoniae*. Более значительное влияние на рост микроорганизмов оказало добавление в среду пептона: размеры колоний *H. influenzae* увеличились до  $(0,8 \pm 0,1)$  мм, а колоний *S. pneumoniae* до  $(0,4 \pm 0,1)$  мм в диаметре. Добавление дрожжевого экстракта в среду приводило к такому же, как и при добавлении пептона, увеличению размеров колоний *H. influenzae* и не влияло на рост *S. pneumoniae*.



Примечания:

- 1 — ПГК 15 г/л;
  - 2 — ПГК 25 г/л;
  - 3 — ПГК 15 г/л, пептон 5 г/л;
  - 4 — ПГК 15 г/л, ЭПД 5 г/л;
  - 5 — ПГК 15 г/л, пептон 5 г/л, ЭПД 5 г/л;
- Все варианты сред включают натрия хлорид — 1 г/л, глюкозу — 1 г/л, НАД — 10 мг/л, гемин — 10 мг/л. В варианты питательной среды, предназначенные для посева штаммов *N. meningitidis*, добавляли сыворотку крови (15 мл/л).

Рисунок 3.5 — Графики зависимости количества и размеров колоний основных возбудителей ГБМ на различных плотных питательных средах через 18 ч

При одновременном добавлении ЭПД и пептона диаметр колоний *H. influenzae* увеличивался до  $(0,9 \pm 0,1)$  мм. Кроме того, добавление в среды пептона увеличивало количество выросших колоний пневмококка, а добавление пептона и ЭПД — количество выросших колоний гемофильной палочки приблизительно в два раза по сравнению со средой, содержащей только ПГК.

Увеличение концентрации ПГК, а также добавление пептона и ЭПД оказывало такое же влияние на рост *N. meningitidis*, как и на рост *H. influenzae*. При повышении концентрации ПГК в среде до 25,0 г/л размер колоний менингококков увеличивался с 0,2–0,6 до 0,4–0,6 мм в диаметре. При добавлении пептона и ЭПД, как по отдельности, так и совместно, диаметр колоний *N. meningitidis* увеличивался до 0,5–0,8 мм, а количество выросших колоний, по сравнению со средой, содержащей только ПГК, повышалось приблизительно в 2,5 раза.

Таким образом, результаты исследования по обогащению питательной среды, полученные кондуктометрическим методом, коррелировали с результатами, полученными методом посева на плотные питательные среды. На основании исследований, проведённых с использованием метода культурального посева и кондуктометрическим методом, в качестве основы питательных сред для культивирования и выделения основных возбудителей ГБМ выбрали смесь ПГК, пептона и дрожжевого экстракта.

### **3.2 Конструирование питательной среды для выделения и культивирования *H. influenzae***

Обязательными условиями для роста *H. influenzae* являются наличие в питательной среде факторов V и X в доступной для микроорганизма форме.

В качестве источника фактора X при разработке питательной среды был предложен СРГМ — ферментативный гидролизат черного альбумина. Этот гидролизат используют в качестве заменителя нативной крови в питательных средах для культивирования возбудителей туляремии, легионеллеза и дифтерии [121, с. 35; 126; 127], а также в менингоагаре.

На рисунке 3.6 приведены графики зависимости диаметра колоний трёх штаммов *H. influenzae* от концентрации СРГМ и гемина в питательной среде.

Как видно из рисунка 3.6, при добавлении в питательные среды кристаллического гемина в концентрациях от 1 до 15 мг/л наибольших размеров, 0,8 мм в диаметре, колонии исследованных штаммов *H. influenzae* через 24 ч инкубирования достигали на средах с концентрацией гемина от 7 до 10 мг/л. Дальнейшее увеличение концентрации гемина не влияло на размер колоний. Полученные экспериментальные данные о влиянии концентрации гемина на рост гемофильной палочки коррелировали с литературными данными [34].

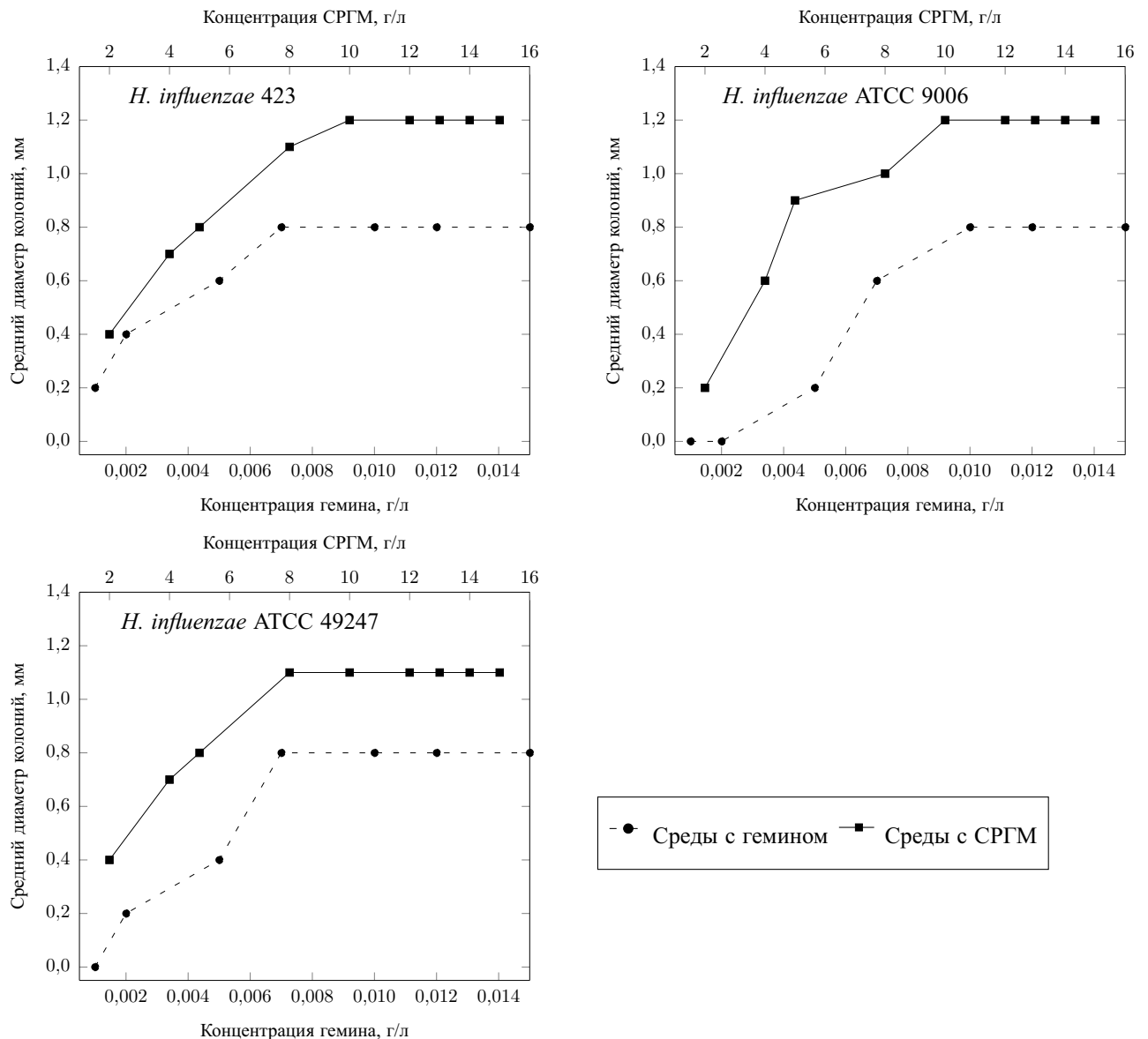


Рисунок 3.6 — Графики зависимости диаметра колоний *H. influenzae* от концентрации гемина и SRGM в экспериментальных вариантах питательной среды через 24 ч

На питательных средах, содержащих SRGM в концентрациях от 2 до 15 г/л, колонии исследованных штаммов *H. influenzae* достигали аналогичных размеров



при концентрации СРГМ в среде 5 г/л. Повышение концентрации СРГМ в средах до 15 г/л приводило к увеличению размеров колоний в среднем от 1,1 до 1,2 мм. Таким образом, в качестве источника фактора X в среде выбрали СРГМ, концентрация которого 12 г/л была признана оптимальной.

В качестве источника фактора V испытывали кристаллический НАД и автолизат пекарских дрожжей (АПД) лабораторного приготовления.

В исследовании анализировали питательные среды, содержащие НАД в концентрациях от 0,5 до 20 мг/л. Установлено, что содержание НАД в среде в концентрации 0,5 мг/л полностью удовлетворяет потребность в факторе V всех исследованных штаммов *H. influenzae*, и дальнейшее увеличение не оказывает влияние на характер роста микроорганизмов. Для дальнейших исследований выбрали концентрацию НАД, равную 1,0 мг/л.

Физико-химические показатели трёх серий дрожжевых автолизатов, приготовленных из дрожжей трёх различных производителей, представлены в таблице 3.3. Видно, что АПД серий 1 и 3 не имели существенных различий по количеству аминного азота (441 и 455 мг%, соответственно), значению рН (5,3 и 5,25, соответственно) и содержанию сухих веществ (6,0 %). АПД серии 2 имел более низкие значения этих показателей: аминный азот — 325 мг%, рН — 4,8, сухой остаток — 4,9 %.

Таблица 3.3 — Физико-химические показатели серий автолизатов пекарских дрожжей, использованных в исследовании

Серия	Производитель дрожжей	Показатель		
		рН	Аминный азот, мг%	Сухой остаток, %
1	Сотницинский дрожжевой завод	5,3	441	6,0
2	Комбинат пищевых продуктов	4,9	325	5,8
3	Воронежские дрожжи	5,25	455	6,0

Питательные среды, содержащие от 100 до 200 мл/л АПД, в зависимости от серии автолизата, обладали сходными ростовыми свойствами со средой, содержащей НАД. На рисунке 3.7 показано, что колонии штамма *H. influenzae* 423 через 24 ч культивирования достигали диаметра 1,2 мм только на средах, содержащих 1 мг/л НАД, 100 мл/л АПД серии 3, 150 мл/л АПД серии 1 и 200 мл/л АПД серии 2. Аналогичные результаты были получены при культивировании штаммов *H. influenzae* ATCC 49247 и *H. influenzae* ATCC 9006. Отличия в значениях

концентраций дрожжевых автолизатов, необходимых для роста гемофильной палочки, вероятно, обусловлены различным содержанием пиридиннуклеотидов в каждой из серий АПД.

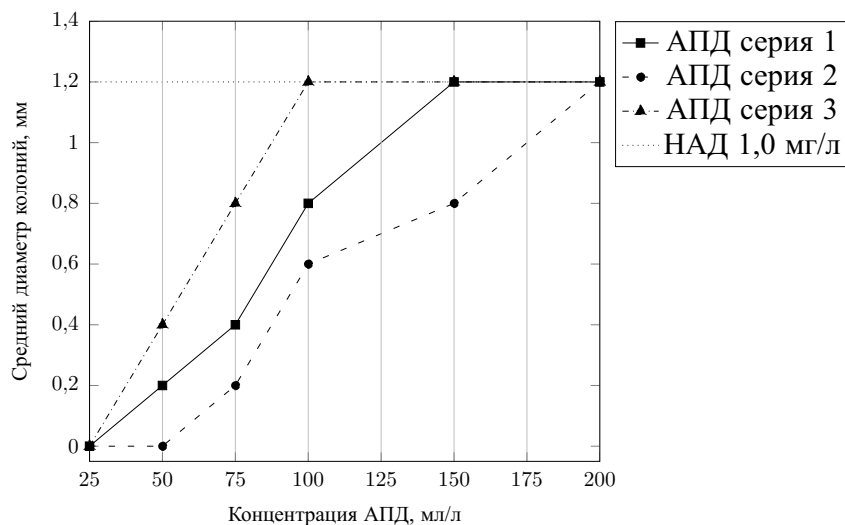


Рисунок 3.7 — График зависимости диаметра колоний *H. influenzae* 423 от концентрации в питательной среде различных серий АПД через 24 ч

Таким образом, показано, что в качестве источника фактора V в питательной среде может быть использован как НАД, так и АПД.

Исследования, проведённые с использованием различных серий ПГК, ЭПД, пептона и агара, отличающихся между собой по физико-химическим показателям, позволили установить, что значения рН питательной среды до стерилизации могут колебаться от 7,4 до 7,7, после стерилизации значение рН практически не изменяется. Наибольшее влияние на этот показатель оказывают ПГК и СРГМ. В таблице 3.4 приведены значения рН питательной среды при использовании ПГК и СРГМ различных серий.

Таблица 3.4 — Влияние рН ПГК и СРГМ на рН питательной среды

	Значения	СРГМ		
	рН	7,95	8,15	8,25
ПГК	7,15	7,40	7,47	7,52
	7,30	7,45	7,50	7,55
	7,45	7,50	7,52	7,60

В ходе исследования отмечено незначительное уменьшение размеров колоний *H. influenzae* при повышении рН готовой среды до 7,65–7,70. Введение в

состав питательной среды калия фосфорнокислого однозамещенного в концентрации 0,5–0,8 мг/л позволило стабилизировать значение рН.

Для придания питательной среде селективных свойств в отношении *H. influenzae* испытывали бацитрацин в концентрациях от 100 до 750 мг/л. При исследовании селективных свойств среды использовали расширенный набор музейных штаммов как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, являющихся представителями нормофлоры или патогенами верхних дыхательных путей человека. Результаты исследования приведены в таблице 3.5. Установлено, что бацитрацин ни в одной из испытанных концентраций не влиял на рост исследованных штаммов рода *Haemophilus*. Бацитрацин в концентрации 300 мг/л и выше полностью подавлял рост *S. pyogenes* Dick-1, *S. pneumoniae* ATCC 6305, *S. pneumoniae* ATCC 49619 при посеве из всех разведений и полностью подавлял рост *N. meningitidis* ATCC 13102, *N. meningitidis* 208, *M. catarrhalis* ATCC 25238 и *S. aureus* Wood-46 при посеве из разведений  $10^{-3}$  и ниже.

Таблица 3.5 — Селективные свойства питательной среды с различными концентрациями бацитрацина

Тест-штамм	bac, мг/л	Рост тест-штаммов из разведений					
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247, <i>H. influenzae</i> 423, <i>H. influenzae</i> ATCC 9006 и <i>H. parainfluenzae</i> NCTC 7857	0–750	+	+	+	+	+	+
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13102	0	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	–	–
	200	+	+	+	±	–	–
	300	+	±	–	–	–	–
	400	±	±	–	–	–	–
	500–750	±	–	–	–	–	–
<i>N. meningitidis</i> 208	0	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	±	±	–	–
	200	+	+	±	–	–	–
	300	±	–	–	–	–	–
	400–750	–	–	–	–	–	–
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	0	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	–	–	–	–
	200–750	–	–	–	–	–	–
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0	+	+	+	+	+	+
	100	+	–	–	–	–	–
	200–750	–	–	–	–	–	–

Продолжение таблицы 3.5

Тест-штамм	bac, мг/л	Рост тест-штаммов из разведений					
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	0	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	±
	200	+	+	+	±	±	—
	300	+	±	—	—	—	—
	400	+	±	—	—	—	—
	500–750	±	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i> Wood-46	0	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	±	—	—
	200	+	+	±	—	—	—
	300	±	±	—	—	—	—
	400–50	—	—	—	—	—	—
<i>S. pyogenes</i> Dick-1	0	+	+	+	+	+	+
	100	+	±	—	—	—	—
	200	+	—	—	—	—	—
	300–750	—	—	—	—	—	—

Примечания: «bac» — концентрация бацитрацина; «+» — рост через 24 ч; «±» — рост через 48 ч, отсутствие роста через 24 ч; «—» — через 72 ч рост отсутствует

Для подтверждения возможности использования разработанной питательной среды для выделения *H. influenzae* из контаминированного материала провели бактериологический посев трёх образцов, содержащих смесь культур *S. aureus* Wood-46, *S. pneumoniae* ATCC 6305, *N. meningitidis* 208 в концентрациях 10<sup>6</sup> клеток/мл и *H. influenzae* 423 в концентрации 10<sup>3</sup> клеток/мл. Первый образец готовили на основе 0,9 % раствора натрия хлорида, второй — на основе бычьей сыворотки, третий — на основе бараньей крови. Каждый из образцов засеивали по 0,1 мл на чашки Петри с испытуемой средой с бацитрацином, с испытуемой средой без бацитрацина и с контрольной средой — шоколадным агаром Veston Dickinson с добавлением IsoVitalex (ША-BD). Через 24 ч инкубирования посевов всех трёх образцов на разработанной питательной среде с бацитрацином обнаружили рост монокультуры, идентифицированной с помощью реакции латекс-агглютинации как *H. influenzae* тип b. На всех чашках Петри с ША-BD и неселективном варианте разработанной среды выросла смесь культур, содержащих четыре типа колоний, три из которых идентифицированы с помощью реакции латекс-агглютинации как *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* серотип A и *H. influenzae* тип b. Четвёртый тип колоний, по-видимому, принадлежал *S. aureus*. Таким образом, показана возможность выделения гемофильной палочки на разработанной питательной среде из контаминированного микробами-ассоциантами материала.

Разработанная питательная среда получила название Гемофилус агар и имеет следующий состав:

ПГК .....	15,0 г
СРГМ .....	12,0 г
ЭПД .....	5,0 г
Пептон .....	5,0 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный .....	0,8 г
Натрий хлористый .....	1,0 г
Крахмал растворимый .....	1,0 г
Агар микробиологический .....	12,0±2,0 г
Бацитрацин .....	300 мг
НАД .....	1,0 мг
или АПД .....	150–200 мл
Вода дистиллированная .....	до 1,0 л

Для оценки биологических показателей разработанной питательной среды провели исследование с использованием штаммов *H. influenzae* типа b 423, *H. influenzae* типа b ATCC 10211, *H. influenzae* некапсулированный ATCC 49247, *H. influenzae* некапсулированный ATCC 49766, *H. influenzae* типа a ATCC 9006. В качестве контрольной использовали среду ША-BD. Результаты исследования представлены в таблице 3.6. Через 24 ч культивирования штаммы *H. influenzae* формировали на Гемофилус агаре круглые слизистые полупрозрачные колонии сероватого цвета, не отличавшиеся от колоний, выросших на среде ША-BD. В мазках по Граму культур, выращенных на исследуемой и контрольной среде, наблюдали мелкие короткие грамотрицательные палочки или грамотрицательные коккобациллы, а также нитеподобные цепочки. В мазках по Гинсу у капсульных штаммов *H. influenzae* 423, *H. influenzae* ATCC 10211 и *H. influenzae* ATCC 9006, выращенных на испытываемой и контрольной средах, хорошо просматривалась капсула. Реакция латекс-агглютинации с типоспецифической сывороткой *H. influenzae* типа b у штаммов, принадлежащих к данному типу, дала положительный результат.

Таблица 3.6 — Исследование стабильности основных биологических свойств штаммов *H. influenzae*, выращенных на Гемофилус агаре через 24 ч

<i>H. influenzae</i> штамм, тип	Питательная среда	Морфология колоний	Диаметр колоний, мм	Окраска по Граму	Капсула по Гинсу	Реакция агглютинации
423, тип b	Гемофилус агар ША-BD	Типичная	(1,3±0,1)	Типичная	+	+
		Типичная	(1,3±0,1)	Типичная	+	+
ATCC 10211, тип b	Гемофилус агар ША-BD	Типичная	(1,2±0,1)	Типичная	+	+
		Типичная	(1,3±0,1)	Типичная	+	+
ATCC 9006, тип a	Гемофилус агар ША-BD	Типичная	(1,3±0,1)	Типичная	+	—
		Типичная	(1,3±0,1)	Типичная	+	—
ATCC 49247, NTНi	Гемофилус агар ША-BD	Типичная	(1,1±0,1)	Типичная	—	—
		Типичная	(1,1±0,1)	Типичная	—	—
ATCC 49766, NTНi	Гемофилус агар ША-BD	Типичная	(1,1±0,1)	Типичная	—	—
		Типичная	(1,0±0,1)	Типичная	—	—

Примечание: «NTНi» — некапсулированный (нетипируемый) штамм; «Капсула по Гинсу» — наличие («+») или отсутствие («—») капсулы в мазках по Гинсу; «Реакция агглютинации» — положительная («+») или отрицательная («—») реакция латекс-агглютинации с типоспецифической сывороткой *H. influenzae* типа b

Таким образом, разработан состав питательной среды для культивирования и выделения гемофильной палочки (Гемофилус агар). Питательная среда содержит панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракта, пептон, стимулятор роста гемофильных микроорганизмов, натрия хлорид, крахмал растворимый, калий фосфорнокислый однозамещенный, агар, бацитрацин, никотиनाмидадениндинуклеотид или автолизат пекарских дрожжей. Гемофилус агар обеспечивает рост гемофильной палочки, образование капсулы у капсульных форм *H. influenzae* и ингибирование микробов-ассоциантов.

### 3.3 Конструирование питательных сред для выделения *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*

Разработанная питательная среда для выделения и культивирования *H. influenzae* (Гемофилус агар) без добавления бацитрацина, помимо гемофильной палочки, поддерживает рост *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*. При одинаковом количестве колоний их скорость роста были заметно ниже, чем на контрольной среде (ША-BD). Диаметр колоний *S. pneumoniae* на Гемофилус агаре через 18 ч культивирования составлял (0,3±0,1) мм, на среде ША-BD — (0,5±0,1) мм. Ко-

лонии менингококков на Гемофилус агаре вырастали до  $(0,7 \pm 0,1)$  мм, тогда как на контрольной среде достигали диаметра  $(1,1 \pm 0,1)$  мм.

Для улучшения биологических свойств питательной среды провели эксперимент по полной или частичной замене в среде СРГМ на сухой гемоглобин или чёрный альбумин. Испытывали варианты питательных сред, содержащих ПГК, пептон, ЭПД, натрия хлорид, крахмал, агар, никотинамидадениндинуклеотид, со следующими добавками:

- гемоглобин 5 г/л;
- гемоглобин 10 г/л;
- гемоглобин 15 г/л;
- чёрный альбумин 5 г/л;
- чёрный альбумин 10 г/л;
- чёрный альбумин 15 г/л;
- СРГМ 12 г/л (Гемофилус агар);
- СРГМ 5 г/л, гемоглобин 10 г/л;
- СРГМ 5 г/л, чёрный альбумин 10 г/л.

При посеве на вышеуказанные варианты сред трёх штаммов *H. influenzae*, трёх штаммов *N. meningitidis* и двух штаммов *S. pneumoniae* отличия в характере роста между разными штаммами одного вида на одинаковых вариантах сред были несущественные и заключались в незначительном варьировании размеров колоний. Диапазоны размеров колоний на средах с различными добавками через 18 ч культивирования штаммов *H. influenzae* 423, *N. meningitidis* ATCC 13102 и *S. pneumoniae* ATCC 6305 представлены на рисунке 3.8. Установлено, что характер роста исследованных штаммов на средах с гемоглобином и чёрным альбумином не отличается между собой. На питательных средах с концентрацией гемоглобина или чёрного альбумина, равной 5 г/л, культуры *H. influenzae* и *N. meningitidis* формировали колонии значительно мельче, чем на средах с более высоким содержанием этих компонентов. Колонии исследованных штаммов *N. meningitidis*, а также *H. influenzae*, выросшие на вариантах среды с 10 и 15 г/л гемоглобина или чёрного альбумина, не отличались между собой по размерам и были сходны с колониями, выросшими на среде с 12 г/л СРГМ (Гемофилус агаре). Незначительное увеличение диаметров колоний менингококков и гемофильной палочки по сравнению с другими вариантами сред через 18 ч наблюдали на средах, содержащих смесь СРГМ и гемоглобина или чёрного аль-

бумина, однако через 24 ч роста колонии *H. influenzae* на среде, содержащей только СРГМ, достигали таких же размеров. Увеличение размеров колоний на вариантах сред со смесью СРГМ и гемоглобина или чёрного альбумина отмечено и при культивировании *S. pneumoniae*.

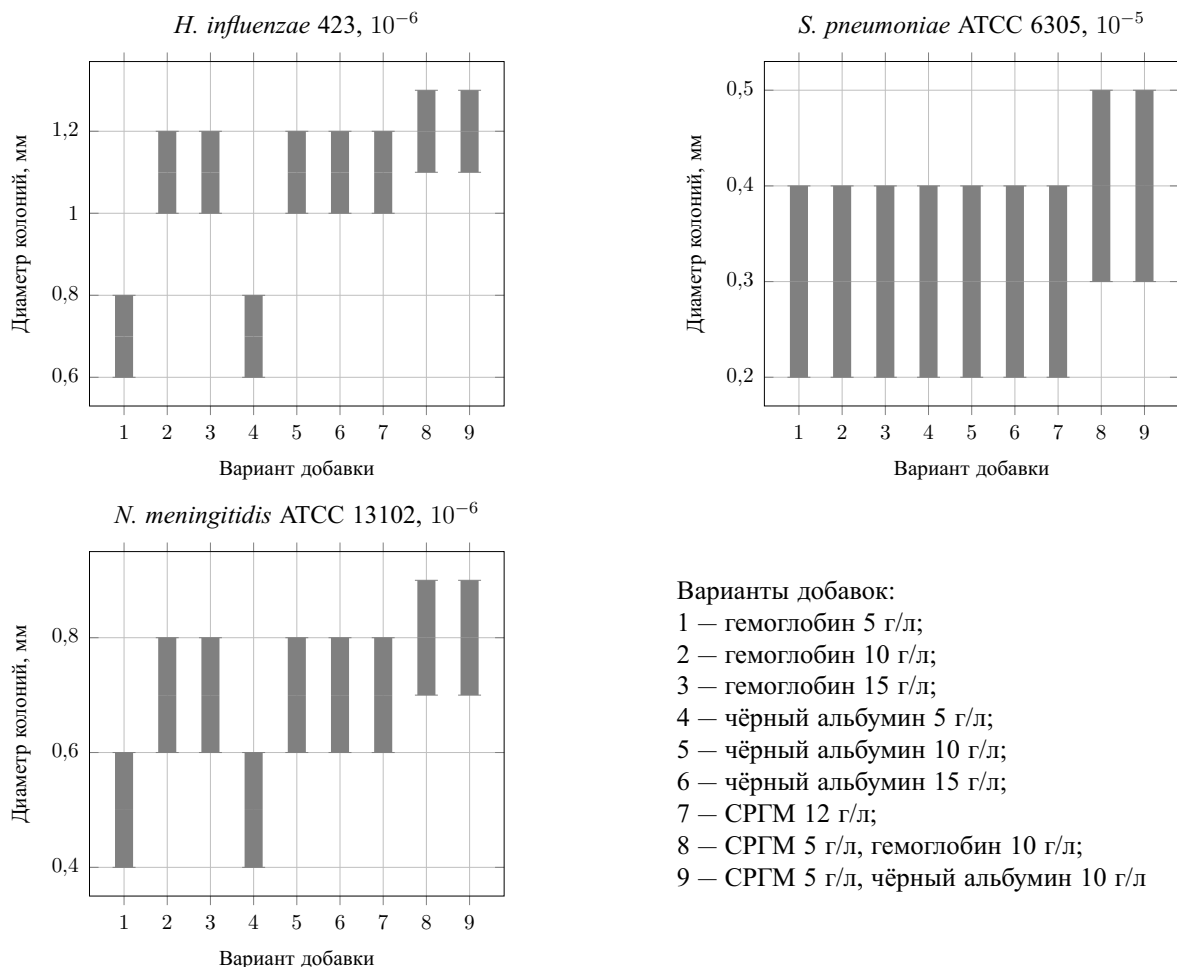
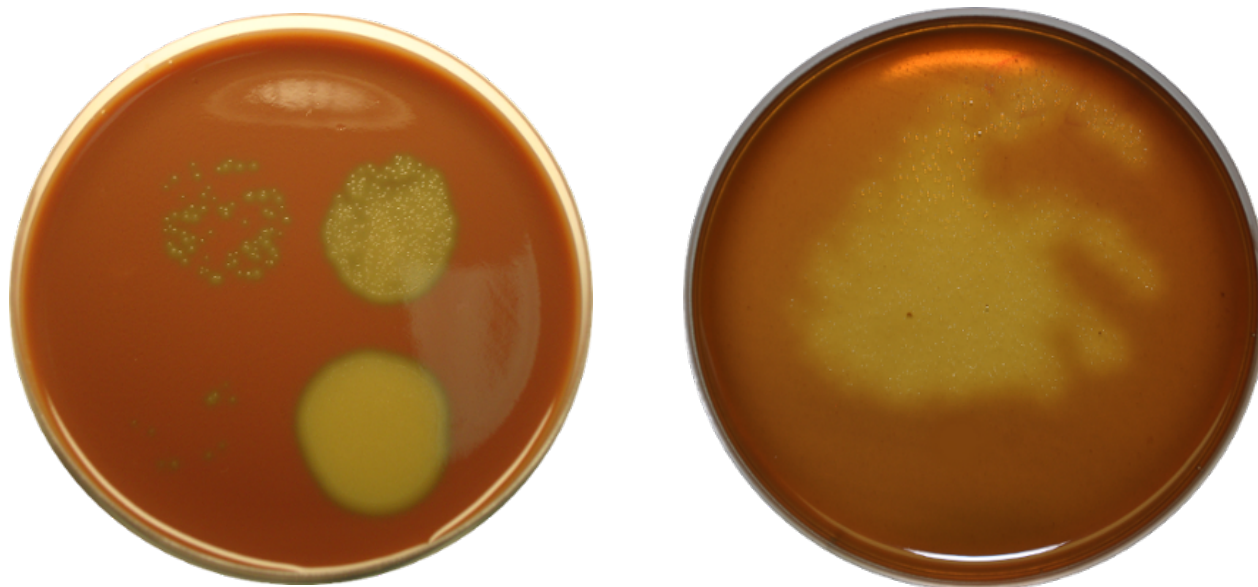


Рисунок 3.8 — Диапазоны размеров колоний на средах с различными добавками через 18 ч

Дифференцирующие свойства исследованных вариантов питательной среды в отношении пневмококка проявлялись в различной степени. На вариантах содержащих гемоглобин и чёрный альбумин в концентрациях 10 и 12 г/л, а также на вариантах со смесью СРГМ и гемоглобина или чёрного альбумина, наблюдали изменение цвета среды в зоне роста исследованных штаммов *S. pneumoniae* с коричневого на желтовато-зелёный. Такое изменение цвета характерно для шоколадного агара с нативной кровью, а также для коммерческих сред ША-ВД, ША-ВМ и ША-MAST. Наиболее интенсивное изменение цвета наблюдали на среде, содержащей 5 г/л СРГМ и 10 г/л гемоглобина. Наименее выраженное изменение цвета было на вариантах сред с чёрным альбумином. На вариантах,



содержащих гемоглобин или чёрный альбумин в концентрациях 5 г/л изменение цвета питательной среды не происходило. На среде, содержащей только СРГМ, в зоне роста пневмококка происходило обесцвечивание питательной среды, что также является дифференцирующим свойством в отношении этого микроорганизма (рисунок 3.9).



а)

б)

Рисунок 3.9 — Изменение цвета среды в зоне роста *S. pneumoniae* при культивировании: а) на среде, содержащей смесь СРГМ и гемоглобина; б) на среде, содержащей 12 г/л СРГМ

В связи с менее выраженными дифференцирующими свойствами сред, содержащих чёрный альбумин, от дальнейшего использования в питательной среде этого компонента отказались. Введение в состав среды, содержащей 12 г/л СРГМ, глюкозы в концентрации 1 г/л нивелировало различие в размерах колоний *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* с вариантом среды, содержащем смесь гемоглобина и СРГМ, поэтому дальнейшие исследования параллельно проводили на моделях этих двух сред.

Анализ состава ростовых добавок, приведённых в таблице 1.1, и внесение в питательные среды их компонентов, показали, что гуанина гидрохлорид, нитрат железа, тиамин гидрохлорид, L-цистин и *p*-аминобензойная кислота не влияли на рост исследованных штаммов микроорганизмов. Введение в состав питательных сред цианокобаламина — 1 мг/л, тиамин пирофосфата — 1 мг/л, аденина — 10 мг/л, L-глутамин — 100 мг/л и L-цистеин гидрохлорида — 250 мг/л позволило улучшить биологические свойства питательных сред. Колонии *H. influenzae*,

*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, выращенные на этих средах, были крупнее, чем на Гемофилус агаре, практически не отличались ни по размеру, ни по количеству от выросших на ША-ВД и ША-ВМ.

Внесение в питательные среды L-цистеина гидрохлорида сместило значение рН в среднем на 0,25 в кислую сторону до уровня от 7,15 до 7,40, в зависимости от серий компонентов сред. Снижение значения рН не повлияло на характер роста исследованных штаммов. Однако, при культивировании *S. pneumoniae* было отмечено снижение интенсивности изменения цвета среды, содержащей гемоглобин, при значении рН ниже 7,2. А при культивировании пневмококка на питательной среде, содержащей только СРГМ со значением рН ниже 7,3, уменьшалась зона просветления среды. Замена калия фосфорнокислого однозамещенного на калий фосфорнокислый двузамещенный или натрий фосфорнокислый двузамещенный позволила скорректировать значение рН вариантов питательных сред и поднять нижний уровень его диапазона до 7,3.

В результате проведенных исследований разработаны прописи двух питательных сред для выделения основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов. Первая питательная среда получила название ГБМ-агар, а вторая — Шоколадный агар, из-за сходства по внешнему виду с агаром с гретой кровью. ГБМ-агар состоит из следующих компонентов:

ПГК .....	15,0 г
СРГМ .....	12,0 г/л
ЭПД .....	5,0 г/л
Пептон .....	5,0 г/л
Глюкоза .....	1,0 г/л
Натрий хлористый .....	1,0 г/л
Крахмал растворимый .....	1,0 г/л
Натрий фосфорнокислый двузамещенный .....	0,5 г/л
L-цистеина гидрохлорид .....	0,25 г
L-глутамин .....	0,1 г
Аденин .....	10 мг
НАД .....	1,5 мг
Цианокобаламин .....	1 мг
Тиамин пиродифосфат .....	1 мг
Агар микробиологический .....	(12,0±2,0) г/л

Вода дистиллированная .....	до 1,0 л
Состав Шоколадного агара:	
ПГК .....	15,0 г
СРГМ .....	5,0 г
Гемоглобин .....	10,0 г
ЭПД .....	5,0 г
Пептон .....	5,0 г
Калий фосфорнокислый двузамещённый .....	2,0 г
Натрий хлористый .....	1,0 г
Крахмал растворимый .....	1,0 г
L-цистеина гидрохлорид .....	0,25 г
L-глутамин .....	0,1 г
Аденин .....	10 мг
НАД .....	1,5 мг
Цианокобаламин .....	1 мг
Тиамин пиродифосфат .....	1 мг
Агар микробиологический .....	(12,0±2,0) г
Вода дистиллированная .....	до 1,0 л

Для придания Шоколадному агару и ГБМ-агару селективных свойств в отношении основных возбудителей ГБМ разработаны три селективные добавки, которые позволяют избирательно выделять каждый из искомым микроорганизмов: для выделения гемофильной палочки (СД-Г), для выделения пневмококков (СД-П) и для выделения менингококков (СД-М). СД-Г состоит из бацитрацина, амфотерицина В, ванкомицина; СД-П — из амфотерицина В, полимиксина В, налидиксовой кислоты; СД-М — из амфотерицина В, полимиксина В, ванкомицина.

Для изучения возможности селективного выделения основных возбудителей ГБМ из материала, содержащего микробов-ассоциантов, на разработанных средах провели опыты по имитации выделения искомым микроорганизмов из искусственно контаминированного образца. В качестве такого образца служила бычья сыворотка, содержащая смесь культур *H. influenzae* 423, *N. meningitidis* 208, *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *C. albicans* ATCC 60193 в концентрациях  $10^6$  клеток/мл. По 0,1 мл суспензии из образца высевали на чашки Петри с вариантами Шоколадного агара и ГБМ-агара, содержащими СД-Г, СД-М, СД-П, а также без селективных добавок. Идентификацию выросших микроорганизмов

проводили в реакции латекс-агглютинации с использованием типоспецифических сывороток для *H. influenzae* типа b и *N. meningitidis* серотипа А и видоспецифической для *S. pneumoniae*. Через 24 ч инкубирования посевов на всех селективных вариантах сред обнаружили рост монокультур, а на неселективных — смеси культур, состоявшей из четырёх типов колоний. Выросшую на Шоколадном агаре и ГБМ агаре с СД-Г культуру идентифицировали как *H. influenzae* тип b, с СД-М — как *N. meningitidis* серотип А, с СД-П — как *S. pneumoniae*. На всех чашках Петри с ША-ВД выросла смесь культур, содержащих четыре типа колоний, три из которых идентифицировали с помощью реакции латекс-агглютинации как *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* серотип А и *H. influenzae* тип b. Четвёртый тип колоний, по видимому, принадлежал *C. albicans*. Таким образом, показана возможность выделения гемофильной палочки, менингококков и пневмококка на разработанной питательной среде из материала, содержащего микробов-ассоциантов.

В результате исследования разработаны две питательные среды: Шоколадный агар и ГБМ-агар, которые обеспечивают рост основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов, не уступают по биологическим показателям средам сравнения, а также не требуют дополнительного внесения крови. Для селективного выделения *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* из контаминированного материала разработаны селективные добавки СД-Г, СД-П и СД-М.

### **3.4 Изучение биологических показателей качества разработанных питательных сред**

Изучение биологических показателей качества Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агар проводили с использованием культурального метода, электронной микроскопии и методов ПЦР.

### 3.4.1 Исследование культуральным методом

Оценку биологических показателей качества питательных сред культуральным методом проводили в два этапа. На первом этапе изучали биологические показатели выросших колоний микроорганизмов на разработанных питательных средах и контрольной питательной среде (ША-ВД). На втором этапе изучали ингибирующие свойства разработанных питательных сред с использованием расширенного набора музейных штаммов и клинических изолятов микроорганизмов.

В таблице 3.7 приведены значения диаметра и среднего арифметического количества колоний *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* через 18 ч культивирования на трёх разработанных питательных средах и среде ША-ВД.

Как видно из таблицы 3.7, морфология колоний *H. influenzae* на всех средах была 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  $(23 \pm 1)$  ч культивирования размер колоний всех исследованных штаммов гемофильной палочки был примерно равным на всех средах. Среднее количество колоний было практически одинаково на всех исследованных средах. Так как Гемофилус агар предназначен только для выделения гемофильной палочки, данные по поведению менингококков и пневмококков на этой среде не приводим.

Все исследованные штаммы менингококка росли в виде полупрозрачных блестящих сероватого цвета колоний с ровными краями. Размеры колоний *N. meningitidis* на Шоколадном агаре, ГБМ-агаре и ША-ВД не отличались друг от друга. Различия в КОЕ на всех исследованных средах были несущественны.

Штаммы *S. pneumoniae* росли на всех средах в виде мелких полупрозрачных чётко очерченных, не склонных к слиянию колоний. Через  $(21 \pm 3)$  ч культивирования колонии были полусферическими, уплощаясь на вторые сутки роста. Вокруг колоний пневмококков на Шоколадном агаре и ША-ВД наблюдали изменение цвета питательной среды со светло-коричневого на желтовато-зелёный, а на ГБМ-агаре — обесцвечивание среды. Колонии, выросшие на Шоколадном агаре и ША-ВД при одинаковой прочности агара, были незначительно мельче, чем на ГБМ-агаре.

Таблица 3.7 — Размер и среднее количество колоний штаммов *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* через 18 ч культивирования на различных средах

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

Примечания:

\* — средневзвешенный диаметр колоний и его среднее квадратичное отклонение, мм

\*\* — среднее арифметическое количество колоний и его среднее квадратичное отклонение

\*\*\* — нет данных или данные не приводим

При исследовании стабильности основных биологических свойств пяти штаммов *H. influenzae*, шести штаммов *N. meningitidis* и четырёх штаммов *S. pneumoniae*, выращенных на ГБМ-агаре, Шоколадном агаре, а также среде сравнения (ША-ВД), реакция латекс-агглютинации с соответствующими типоспецифическими сыворотками у всех штаммов давала положительный результат не зависимо от среды культивирования. В мазках по Граму клетки всех исследованных штаммов *H. influenzae* имели вид мелких коротких грамотрицательных палочек или коккобацилл с редким включением нитеподобных цепочек, у штаммов *N. meningitidis* — расположенных попарно грамотрицательных кокков, напо-

минающих кофейные зёрна, у штаммов *S. pneumoniae* — расположенных попарно грамположительных кокков с ланцетовидными дальними концами каждой пары. В мазках по Гинсу у всех капсульных штаммов наблюдали наличие капсулы.

Результаты изучения ингибирующих свойств питательных сред при применении селективных добавок представлены в таблице 3.8.

Использование селективной добавки СД-Г в Шоколадном агаре и ГБМ-агаре не оказывало отрицательного влияния на рост штаммов *H. influenzae*, полностью подавляло рост штаммов грамположительных микроорганизмов, включая *S. pneumoniae*. Селективная добавка практически не ингибировала рост грамотрицательных микроорганизмов, за исключением исследованных штаммов *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* ATCC 25238 и *N. gonorrhoeae* ATCC 43069, при этом рост менингококков и *M. catarrhalis* отсутствовал через 24 ч культивирования при посеве из разведения  $10^{-1}$ , но наблюдался через 48 или 72 ч в виде единичных колоний. Подобное поведение микроорганизмов отмечено при использовании СД в Гемофилус агаре.

Таблица 3.8 — Ингибирующие 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	+* / $10^{-7}$ **	+ / $10^{-7}$	— / исходное	— / исходное
<i>H. influenzae</i> 423	+ / $10^{-7}$	+ / $10^{-7}$	— / исходное	— / исходное
<i>H. influenzae</i> ATCC 9006	+ / $10^{-7}$	+ / $10^{-7}$	— / исходное	— / исходное
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13102	— / $10^{-2}$	— / $10^{-2}$	+ / $10^{-7}$	— / исходное
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13077	— / $10^{-2}$	— / $10^{-2}$	+ / $10^{-7}$	— / исходное
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13090	— / $10^{-2}$	— / $10^{-2}$	+ / $10^{-7}$	— / исходное
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / $10^{-6}$
<i>S. pneumoniae</i> серотип 2	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / $10^{-6}$
<i>S. pneumoniae</i> серотип 4	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / $10^{-6}$
<i>A. faecalis</i> ATCC 27853	+ / $10^{-6}$	$\pm$ / $10^{-6}$	— / исходное	— / исходное
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+ / $10^{-6}$	$\pm$ / $10^{-6}$	— / исходное	— / исходное
<i>E. coli</i> ATCC 35218	+ / $10^{-6}$	$\pm$ / $10^{-6}$	— / исходное	— / исходное
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	+ / $10^{-6}$	+ / $10^{-6}$	— / $10^{-2}$	— / исходное
<i>K. pneumoniae</i> 3534	+ / $10^{-6}$	+ / $10^{-6}$	— / $10^{-2}$	— / исходное
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	— / $10^{-2}$	— / $10^{-2}$	— / $10^{-3}$	— / исходное
<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 43069	— / исходное	— / исходное	+ / $10^{-6}$	— / исходное
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+ / $10^{-6}$	$\pm$ / $10^{-6}$	— / исходное	— / исходное

Продолжение таблицы 3.8

Штамм	Гемофилус агар с СД	Шоколадный агар и ГБМ-агар селективными добавками		
		СД-Г	СД-М	СД-П
<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. seeligeri</i> В-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

Примечания:

\* – 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

Добавление СД-М в Шоколадный агар и ГБМ-агар не влияло на рост *N. meningitidis* и подавляло рост большинства грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, включая *H. influenzae*, *S. pneumoniae*. У некоторых из исследованных микроорганизмов наблюдали частичное подавление роста. Исследованные штаммы *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, и не росли при посеве из последующих разведений. Подобный характер подавления роста наблюдали для *S. aureus*. СД-М не подавляла рост *N. gonorrhoeae* ATCC 43069 и *L. brevis* ATCC 367; оказывала неодинаковое воздействие на рост штаммов *E. faecalis*. Селективная добавка 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 этих штаммов к ванкомицину, входящему в состав СД-М, показали, что *L. brevis* ATCC 367, *E. faecalis* ATCC 51299 являются устойчивыми, а *E. faecalis* ATCC 29212 – чувствительным к ванкомицину. Для подавления



роста *E. faecalis* ATCC 29212 требуется увеличение концентрации ванкомицина с 3,0 до 4,0 мг/л.

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

В связи с тем, что 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 подавление *C. albicans* не происходило.

### 3.4.2 Электронно-микроскопическое исследование

Для оценки влияния состава разработанных питательных сред на структуру клеток и качество биомассы выращенных на них микроорганизмов по сравнению с контрольными средами провели исследование с помощью электронной микроскопии. С использованием метода ультратонких срезов изучали структурные характеристики бактерий, а с использованием метода негативного контрастирования определяли размеры бактерий.

В исследовании использовали культуры микроорганизмов *H. influenzae* ATCC 9006, выращенные на следующих питательных средах:

- Гемофилус агаре,
- ГБМ-агаре,
- Шоколадном агаре,
- среде ША-BD;

*N. meningitidis* ATCC 13102, выращенные на следующих питательных средах:

- ГБМ-агаре,
- Шоколадном агаре,
- Менингоагаре,
- среде ША-BD;

*S. pneumoniae* ATCC 6305, выращенные на следующих питательных средах:

- ГБМ-агаре,
- Шоколадном агаре,
- среде ША-BD;
- кровяном агаре на основе триптиказо-соевого агара.

Полученные в результате исследования фотографии негативно контрастированных клеток *H. influenzae* ATCC 9006 и *S. pneumoniae* ATCC 6305 представлены на рисунке А.1, фотографии ультратонких срезов *H. influenzae* ATCC 9006 — на рисунке А.2, *N. meningitidis* ATCC 13102 — на рисунке А.3, *S. pneumoniae* ATCC 6305 — на рисунке А.4 (приложение А).

При изучении клеток *H. influenzae* ATCC 9006 и *S. pneumoniae* ATCC 6305 методом негативного контрастирования с помощью электронного микроскопа различий в морфо-популяционных характеристиках одних и тех же штаммов, выращенных на различных средах, не выявили. Микробные клетки *H. influenzae* имели палочковидную форму или форму коккобацилл, средние размеры которых составляли  $0,3 \times 0,8$  мкм. Клетки *S. pneumoniae* имели овальную форму со слегка заострёнными концами, в основном располагались попарно. Средние размеры клеток исследованного штамма пневмококка составляли  $1,3 \times 0,5$  мкм. Аналогичное исследование клеток *N. meningitidis* ATCC 13102 не проводили.

Изучение ультратонких срезов клеток *H. influenzae* и *N. meningitidis* показало, что бактерии имели тонкую структуру, типичную для грамотрицательных бактерий. На электронно-микроскопических изображениях выявили следующие структурные элементы клетки: клеточная оболочка, состоящая из тонкой, слегка извилистой внешней мембраны, тонкого пептидогликанового слоя и сравнительно гладкой цитоплазматической мембраной, цитоплазмы, упакованной различными глобулярными и фибриллярными компонентами. Внутриклеточный мембранный аппарат слабо развит. На внешней поверхности клеток *H. influenzae* отчетливо просматриваются пили. Изучение ультратонких срезов клеток *S. pneumoniae* показало, что бактерии имели массивную однослойную клеточную оболочку, типичную для грамположительных бактерий. Заметных различий между образцами клеток всех исследованных штаммов, выращенных на различных питательных средах, не обнаружили.

Соотношение интактных (целых) клеток и клеток, находящихся на различных стадиях естественного старения, повреждения и гибели, у одних и тех же штаммов микроорганизмов, выращенных на различных питательных средах,

было приблизительно одинаковым. Наименьшее количество интактных клеток, от 53 до 83 %, выявили в образцах *N. meningitidis*. Образцы *H. influenzae* содержали от 84 до 88 % интактных клеток, а *S. pneumoniae* — от 81,0 до 84,0 %.

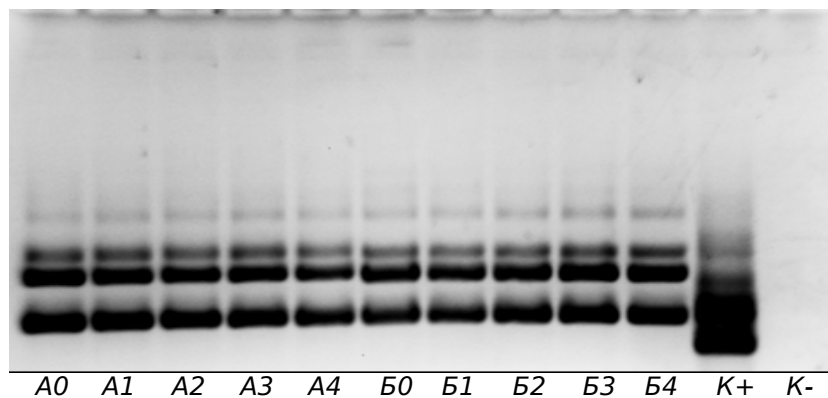
Таким образом, установлено, что культивирование исследованных штаммов *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* на разработанных питательных средах не влияет на структурные характеристики их клеток и не изменяет морфологию клеток исследованных штаммов гемофильной палочки и пневмококка.

### 3.4.3 Исследование методом ПЦР

Для оценки влияния состава разработанных питательных сред на молекулярно-генетические характеристики выращенных на них микроорганизмов провели исследование методом ПЦР.

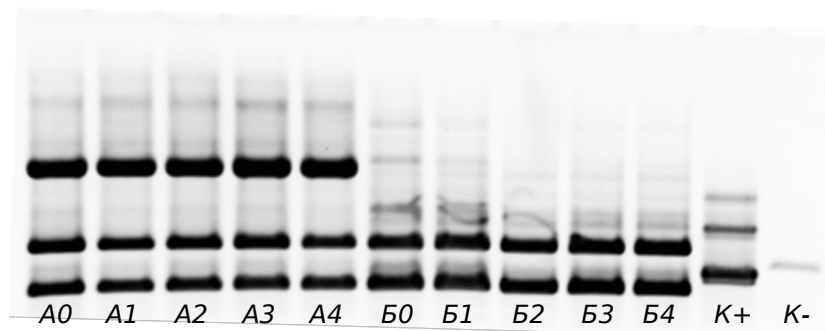
В исследовании использовали 18-часовые культуры штаммов *H. influenzae* ATCC 49247 и *H. influenzae* ATCC 49760, полученные в результате двух последовательных пассажей микроорганизмов на плотных питательных. Культивирование микроорганизмов во время первого пассажа проводили на шоколадном агаре с гретой бараньей кровью на основе колумбийского агара (контрольная среда № 1), а второго — на Гемофилус агаре, Шоколадном агаре, ГБМ-агаре и среде ША-ВД (контрольная среда № 2). В связи с отсутствием в наличии видоспецифических праймеров для *H. influenzae* исследование методом ПЦР проводили с праймерами G1 и L1, с праймерами ERIC 1 и ERIC 2, а методом RAPD-PCR с праймером OPA 11. Для контроля работы праймеров использовали положительный контроль (*K. pneumoniae*) и отрицательный контроль (дистиллированную воду).

Результаты ПЦР с праймерами G1 и L1 представлены на рисунке 3.10, с праймерами ERIC 1 и ERIC 2 — на рисунке 3.11, реакции RAPD-PCR со случайным праймером OPA 11 — на рисунке 3.12.



Примечания: Буквами «А» и «Б» обозначены штаммы исследованных микроорганизмов, цифрами — питательные среды, на которых проводили культивирование. «А» — *H. influenzae* ATCC 49247, «Б» — *H. influenzae* ATCC 49760, «0» — шоколадный агар с гретой кровью (первый пассаж), «1» — Гемофилус агар, «2» — Шоколадный агар, «3» — ГБМ-агар, «4» — среда ША-ВД. «К+» — положительный контроль (*K. pneumoniae*), «К-» — отрицательный контроль (дистиллированная вода)

Рисунок 3.10 — Реакция ПЦР с праймерами G1 и L1

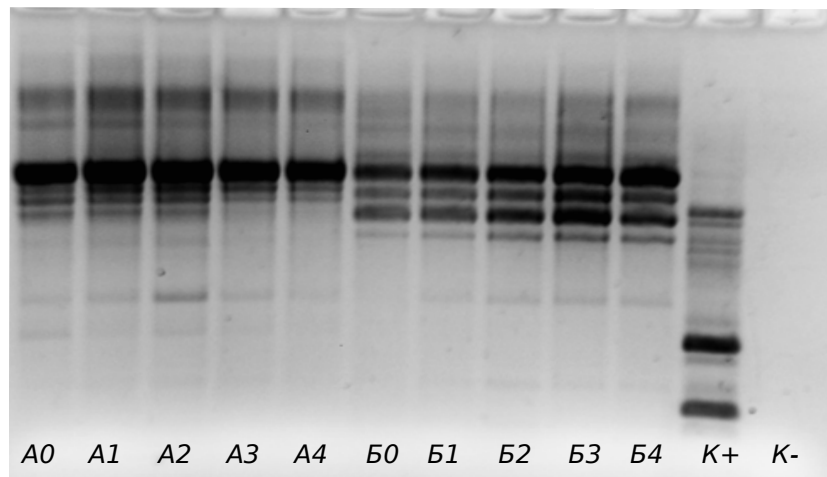


Примечания: Буквами «А» и «Б» обозначены штаммы исследованных микроорганизмов, цифрами — питательные среды, на которых проводили культивирование. «А» — *H. influenzae* ATCC 49247, «Б» — *H. influenzae* ATCC 49760, «0» — шоколадный агар с гретой кровью (первый пассаж), «1» — Гемофилус агар, «2» — Шоколадный агар, «3» — ГБМ-агар, «4» — среда ША-ВД. «К+» — положительный контроль (*K. pneumoniae*), «К-» — отрицательный контроль (РС-ДНК)

Рисунок 3.11 — Реакция ПЦР с праймерами ERIC 1 и ERIC 2

В результате исследования выявлено, что штаммы *H. influenzae* ATCC 49247 и *H. influenzae* ATCC 49760 имеют как видовое молекулярно-генетическое сходство, так и внутривидовые различия. Исследования методами ПЦР и RAPD-PCR штаммов *H. influenzae*, выращенных на двух контрольных питательных средах и на всех трёх разработанных средах, с исследованными праймерами показали идентичный результат.

Таким образом, установлено, что оптимальной основой для культивирования всех трёх основных возбудителей ГБМ является смесь ПГК, пептона и



Примечания: Буквами «А» и «Б» обозначены штаммы исследованных микроорганизмов, цифрами — питательные среды, на которых проводили культивирование. «А» — *H. influenzae* ATCC 49247, «Б» — *H. influenzae* ATCC 49760, «0» — шоколадный агар с гретой кровью (первый пассаж), «1» — Гемофилус агар, «2» — Шоколадный агар, «3» — ГБМ-агар, «4» — среда ША-ВД. «К+» — положительный контроль (*K. pneumoniae*), «К-» — отрицательный контроль (дистиллированная вода)

Рисунок 3.12 — Реакция RAPD-PCR со случайным праймером ОРА 11

ЭПД. Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов может служить полноценной заменой кристаллическому гемину, а также придаёт питательным средам дифференцирующие свойства при культивировании *S. pneumoniae*. Показана возможность применения кондуктометрического метода при конструировании питательных сред.

В результате проведённых исследований разработаны прописи трёх питательных сред:

- для выделения и культивирования *H. influenzae* — Гемофилус агар;
- для выделения *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* — Шоколадный агар;
- для выделения *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* — ГБМ-агар.

Разработанные питательные среды содержат богатую белковую основу и факторы роста, необходимые для роста основных возбудителей ГБМ, обладают ингибирующими свойствами. Шоколадный агар и ГБМ-агар обладают дифференцирующими свойствами в отношении *S. pneumoniae*. Все три разработанные среды обеспечивают стабильность основных биологических свойств микроорганизмов по морфологическим, серологическим и молекулярно-генетическим признакам. Гемофилус агар, Шоколадный агар и ГБМ-агар не требуют добавления нативной крови.

Компонентный состав разработанных сред позволяет наладить их серийное производство. В связи с этим, следующий этап исследования был посвящён разработке технологии серийного производства Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара.

## Глава 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Для серийного производства для ГБМ-агара выбрали форму выпуска в виде сухой питательной среды, а для Гемофилус агара и Шоколадного агара — готовых к применению питательных сред во флаконах для последующего расплавления и розлива в чашки Петри.

В связи с наличием в питательных средах термолабильных компонентов, а также селективных добавок, применение которых опционально, каждая из сред была сконструирована в виде наборов реагентов, включающих основу питательной среды, ростовые и селективные добавки. В связи с этим, разработку технологии производства питательных сред разделили на два этапа: разработка технологии серийного производства основ питательных сред и разработка технологии серийного производства ростовых и селективных добавок. В ходе исследования провели определение сроков годности питательных сред, а также требования к биологическим показателям производственных серий питательных сред.

Контроль биологических показателей экспериментально-производственных серий всех трёх питательных сред осуществляли с использованием штаммов *H. influenzae* 423, *H. influenzae* ATCC 9006, *H. influenzae* ATCC 49247, *N. meningitidis* 208, *N. meningitidis* ATCC 13102 и *S. pneumoniae* ATCC 6305. Для контроля биологических показателей селективных вариантов экспериментально-производственных серий питательных сред дополнительно использовали штаммы *S. pyogenes* Dick-1 и *C. albicans* ATCC 60193.

### 4.1 Разработка технологии серийного производства основ питательных сред

#### 4.1.1 Разработка технологии серийного производства основы ГБМ-агара

В состав основы ГБМ-агара включили следующие компоненты:

ПГК ..... 15,0 г

СРГМ ..... 12,0 г/л

ЭПД .....	5,0 г/л
Пептон .....	5,0 г/л
Глюкоза .....	1,0 г/л
Натрий хлористый .....	1,0 г/л
Крахмал растворимый .....	1,0 г/л
Натрий фосфорнокислый двузамещённый .....	0,5 г/л
Агар микробиологический .....	(12,0±2,0) г/л

Для производства сухой основы ГБМ-агара определили следующие стадии:

- взвешивание компонентов сухой основы и загрузка их в лопастной смеситель;
- смешивание компонентов основы в смесителе;
- выгрузка сухой основы;
- фасовка сухой основы в полимерные банки и герметизация банок с сухой основой крышками.

Вышеуказанным способом приготовили 10 экспериментально-производственных серий сухой основы из серий компонентов, различающихся по физико-химическим показателям. Исследование биологических показателей питательных сред, приготовленных из экспериментально-производственных серий основы, не выявил существенных различий в характере роста *H. influenzae* 423, *H. influenzae* ATCC 9006, *H. influenzae* ATCC 49247, *N. meningitidis* 208, *N. meningitidis* ATCC 13102 и *S. pneumoniae* ATCC 6305 ни на одной из сред.

Во всех изготовленных сериях сухая основа имела вид гигроскопичного мелкодисперсного порошка от светло-коричневого до темно-коричневого цвета. После растворения и стерилизации пластины геля сухой основы, разлитые в чашки Петри, прозрачные от светло-коричневого до темно-коричневого цвета. В пяти сериях готовой питательной среды, разлитой в чашки Петри, обнаружено наличие небольшого осадка от тёмно-коричневого до чёрного цвета, что не влияло на биологические показатели среды. В таблице 4.1 приведены физико-химических показатели экспериментально-производственных серий сухой основы ГБМ-агара. На основании этих данных, а также теоретических расчётов, разработали требования к показателям сухой основы среды при серийном производстве. В зависимости от физико-химических показателей сырья, использованного при приготовлении, сухая основа может иметь рН от 7,4 до 7,7, содержание аминного азота от 2,0 до 3,5 %, содержание хлоридов в пересчёте на натрия



хлорид от 6,0 до 10,0 %, содержание влаги (потеря в массе при высушивании) не более 7,0 %, прочность студня от 340 до 440 г.

Таблица 4.1 – Физико-химические показатели экспериментально-производственных серий сухой основы ГБМ-агара

Показатель	Серия									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
рН	7,45	7,45	7,50	7,40	7,55	7,50	7,55	7,65	7,50	7,60
Аминный азот, %	2,4	2,6	3,2	2,8	3,3	2,2	2,9	3,1	3,2	2,6
Влага, %	4,3	4,6	5,1	4,5	5,0	4,7	5,3	4,8	4,2	4,8
Хлориды (NaCl), %	9,1	8,9	9,3	8,6	9,2	9,4	8,8	9,5	9,1	9,3
Прочность студня, г	415	392	364	425	345	371	432	359	406	411

#### 4.1.2 Разработка технологии серийного производства основы Гемофилус агара

В состав основы Гемофилус агара включили следующие компоненты:

ПГК .....	15,0 г
СРГМ .....	12,0 г
ЭПД .....	5,0 г
Пептон .....	5,0 г
Натрий хлористый .....	1,0 г
Крахмал растворимый .....	1,0 г
Калий фосфорнокислый однозамещённый .....	0,8 г
Агар микробиологический .....	(12,0±2,0) г
Вода дистиллированная .....	1,0 л

Для разработки технологии производства основы Гемофилус агара проводили исследования по повторному расплавлению стерильной основы после застудневания. При неизменности других физико-химических показателей (рН, содержание аминного азота и хлоридов, сухой остаток) после повторного расплавления основы отмечено снижение прочности студня на 10–15 %, в зависимости от использованной при приготовлении серии агара, однако это не приводило к ухудшению биологических свойств среды и не влияло на удобство бакте-

риологического посева. Различий в характере роста штаммов *H. influenzae* 423, *H. influenzae* ATCC 10211, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766 и *H. influenzae* ATCC 9006, выросших на вариантах Гемофилус агара с основой, не подвергшейся повторному расплавлению, и с Основой после повторного расплавления, выявлено не было. Таким образом показано, что основа Гемофилус агара пригодна для выпуска в готовой к применению форме во флаконах.

Технология приготовления основы Гемофилус агара при серийном изготовлении среды включала следующие стадии:

- растворение компонентов основы в дистиллированной воде;
- нагревание при периодическом перемешивании до полного растворения агара;
- розлив основы в стеклянные флаконы вместимостью 100 мл;
- герметизация флаконов с основой резиновыми пробками с последующим завальцовыванием алюминиевыми колпачками;
- стерилизация флаконов с основой в автоклаве водяным насыщенным паром при температуре 121 °С в течение 20 мин;
- охлаждение флаконов с основой при комнатной температуре до полного застудневания агара.

Для отработки технологии производства и определения физико-химических показателей вышеуказанным способом приготовлено 10 экспериментально-производственных серий основы Гемофилус агара из различных серий компонентов. Содержимое флаконов всех серий основы было стерильным. Во всех экспериментальных сериях основа Гемофилус агара имела вид геля темно-коричневого или черного цвета. Время расплавления основы в кипящей водяной бане не превышало 1 ч. Пластины геля основы, разлитые после расплавления в чашки Петри, полупрозрачные коричневого цвета, при этом в трёх сериях обнаружено наличие небольшого количества нерастворимых коричневых включений, которые не влияли на биологические показатели среды. На основании анализа физико-химических показателей экспериментально-производственных серий, представленных в таблице 4.2, разработаны требования к показателям качества основы при серийном производстве.

Таблица 4.2 — Физико-химические показатели экспериментально-производственных серий основы Гемофилус агара

Показатель	Серия									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
рН	7,45	7,50	7,50	7,35	7,25	7,55	7,40	7,45	7,40	7,30
Аминный азот, %	0,15	0,13	0,14	0,12	0,14	0,12	0,15	0,14	0,14	0,13
Сухой остаток, %	5,6	5,7	5,7	5,6	5,8	5,7	5,6	5,8	5,7	5,7
Хлориды (NaCl), %	0,5	0,5	0,45	0,5	0,55	0,5	0,45	0,5	0,5	0,55
Прочность студня, г	371	322	388	315	344	352	374	339	326	382
t °С плавления	96	86	96	86	91	94	92	88	87	94
t °С застудневания	34	32	34	33	35	34	34	35	34	34

Основа Гемофилус агара может иметь рН от 7,2 до 7,6, содержание аминного азота от 0,11 до 0,16 %, содержание хлоридов в пересчёте на натрия хлорид от 0,4 до 0,6 %, сухой остаток от 5,6 до 5,8 %, прочность студня от 310 до 390 г. Температура плавления всех серий основы была выше 80 °С, а температура застудневания выше 30 и ниже 37 °С, что соответствует требованиям МУК 4.2.2316–08 [112, с. 20–21].

#### 4.1.3 Разработка технологии серийного производства основы Шоколадного агара

В состав основы Шоколадного агара включили следующие компоненты:

ПГК .....	15,0 г
СРГМ .....	5,0 г
Гемоглобин .....	10,0 г
ЭПД .....	5,0 г
Пептон .....	5,0 г
Калий фосфорнокислый двузамещённый .....	2,0 г
Натрий хлористый .....	1,0 г
Крахмал растворимый .....	1,0 г
Агар микробиологический .....	(12,0±2,0) г
Вода дистиллированная .....	1,0 л

Гемоглобин, входящий в состав Шоколадного агара, при совместной его стерилизации в автоклаве с другими компонентами коагулирует, образуя нерастворимые комки. В связи с этим, при приготовлении среды возникла необходимость отдельно стерилизовать суспензию гемоглобина и агаровую основу, включающую остальные компоненты основы Шоколадного агара, соединяя их в асептических условиях после автоклавирования. Приготовленная таким способом основа после застудневания и повторного расплавления на водяной бане или в автоклаве в режиме стерилизации текучим паром могла расслаиваться, однако после взбалтывания вновь становилась однородной. По внешнему виду основа Шоколадного агара после повторного расплавления, разлитая в чашки Петри, не отличалась от разлитой в чашки Петри основы без повторного расплавления.

При повторном расплавлении основы Шоколадного агара, как и в случае Гемофилус агара, значение рН, содержание аминного азота, хлоридов и сухого остатка оставались неизменными, но снижалась прочность студня в среднем на 12,5 %, в зависимости от прочности агара. Кроме того, к дополнительному снижению прочности студня приблизительно на 20 % приводило добавление в агаризованную основу суспензии гемоглобина. Для корректировки значения прочности студня среды потребовалось увеличение концентрации агара или использование агара с большей прочностью.

Биологические показатели качества Шоколадного агара, приготовленного с использованием основы после повторного расплавления, не отличались от показателей Шоколадного агара с основой без повторного расплавления. Таким образом, показано, что основа Шоколадного агара пригодна для серийного производства в готовой к применению форме во флаконах.

Технология приготовления основы Шоколадного агара при серийном изготовлении среды включила следующие стадии:

- растворение компонентов агаризованной основы в дистиллированной воде;
- приготовление суспензии сухого гемоглобина в дистиллированной воде;
- отдельная стерилизация гемоглобина и агаризованной основы в автоклаве водяным насыщенным паром при температуре 121 °С в течение 15 мин;
- соединение агаровой основы и суспензии гемоглобина;
- розлив получившейся основы Шоколадного агара в стеклянные флаконы вместимостью 100 мл;

– герметизация флаконов с основой резиновыми пробками с последующим завальцовыванием алюминиевыми колпачками.

– охлаждение флаконов с основой до полного застудневания агара.

Вышеуказанным способом приготовлено 10 экспериментально-производственных серий основы Шоколадного агара из различных серий компонентов. Содержимое флаконов с основы было стерильно. Исследование биологических показателей питательных сред, приготовленных из экспериментально-производственных серий основы, не выявило существенных различий в характере роста *H. influenzae* 423, *H. influenzae* ATCC 9006, *H. influenzae* ATCC 49247, *N. meningitidis* 208, *N. meningitidis* ATCC 13102 и *S. pneumoniae* ATCC 6305 ни на одной из сред.

Во всех сериях основа Шоколадного агара имела вид геля светло-коричневого цвета. Время расплавления основы в кипящей водяной бане не превышало 1 ч, что соответствует требованию МУК 4.2.2316–08 [112, с. 21]. Пластины геля основы, разлитые в чашки Петри после расплавления, однородные непрозрачные светло-коричневого цвета. На основании физико-химических показателей экспериментально-производственных серий, представленных в таблице 4.3, разработали требования к показателям основы Шоколадного агара при серийном производстве.

Таблица 4.3 – Физико-химические показатели экспериментально-производственных серий основы Шоколадного агара

Показатель	Серия									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	7,35	7,30	7,55	7,55	7,50	7,40	7,50	7,55	7,60	7,40
Аминный азот, %	0,13	0,12	0,12	0,14	0,14	0,11	0,12	0,12	0,14	0,14
Сухой остаток, %	5,7	5,6	5,8	5,8	5,7	5,7	5,7	5,6	5,5	5,6
Хлориды (NaCl), %	0,4	0,4	0,4	0,45	0,45	0,35	0,25	0,5	0,4	0,4
Прочность студня, г	382	378	384	355	360	342	372	329	323	366
t °С плавления	95	94	96	88	89	87	92	87	87	90
t °С застудневания	35	35	36	36	36	34	34	36	35	35

Учитывая разнообразие физико-химических показателей сырья, использованного при приготовлении, основа может иметь pH от 7,3 до 7,6, содержание аминного азота от 0,11 до 0,14 %, содержание хлоридов в пересчёте на натрия хлорид от 0,2 до 0,5 %, сухой остаток от 5,4 до 5,9 %, прочность студня от 320

до 390 г. Температура плавления всех серий основы была более 80 °С, а температура застудневания более 30 и менее 37 °С, что соответствует требованиям МУК 4.2.2316–08 [112, с. 20–21].

Таким образом, разработаны технологии серийного производства основ ГБМ-агара, Гемофилус агара и Шоколадного агара, а также определены требования к физико-химическим показателям основ этих сред.

#### **4.2 Разработка технологии серийного производства ростовых и селективных добавок**

В состав Гемофилус агара вошли две добавки: ростовая (далее — РД), содержащая фактор роста V и селективная (далее — СД), содержащая бацитрацин.

Для серийного приготовления СД выбрана форма расфасованного в стеклянные флаконы вместимостью 10 мл препарата, в связи с этим определены следующие стадии приготовления:

- фасовка препарата во флаконы;
- герметизация флаконов с СД резиновыми пробками с последующим завальцовыванием алюминиевыми колпачками.

Для серийного приготовления разработали следующие требования к СД: добавка должна иметь вид порошка белого цвета, содержимое одного флакона с СД должно полностью растворяться в 2,0 мл дистиллированной воды в течение  $(1,5 \pm 0,5)$  мин, полученный раствор должен представлять собой прозрачную бесцветную жидкость или прозрачную жидкость бледно-жёлтого цвета.

При разработке технологии получения РД установлено, что использование АПД в качестве источника фактора V в питательной среде нецелесообразно ввиду технологической сложности получения автолизата с необходимыми свойствами из-за нестандартности сырья, а также ввиду высокой трудоёмкости процесса. Поэтому в качестве источника фактора V выбрали НАД. В связи с малой концентрацией НАД было предложено разработать технологию производства РД в виде лиофильно высушенного раствора НАД с наполнителем, нейтральным в отношении микроорганизмов и компонентов питательной среды. В качестве такого наполнителя испытывали мальтодекстрин глюсидекс с декстрозным эквивален-

том 19 (далее — глюсидекс 19), поливинилпирролидон, декстраны с молекулярной массой 5 000, 40 000, 60 000 и 500 000 Да.

Каждый из испытуемых наполнителей растворяли в дистиллированной воде, стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм и вносили в стерильный охлаждённый до температуры  $(47,5 \pm 2,5)$  °С Гемофилус агар в концентрациях от 0,1 до 5,0 г/л совместно со стерильным раствором НАД. В результате бактериологического посева различий в характере роста штаммов *H. influenzae* 423, *H. influenzae* ATCC 10211, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766 и *H. influenzae* ATCC 9006, выращенных на средах с испытуемыми наполнителями и среде, не содержащей наполнители, выявлено не было. При этом отмечена плохая растворимость в воде декстрана с молекулярной массой 500 000 Да и его исключили из дальнейших исследований.

На следующем этапе разработки технологии получения РД проводили исследования по лиофильному высушиванию НАД с различными наполнителями. Для этого готовили растворы, содержащие 0,1 мг/мл НАД и 100 мг/мл наполнителя. Растворы стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм, разливали по 1,0 мл в стерильные стеклянные флаконы вместимостью 10 мл, закрывали резиновыми пробками для лиофильной сушки на 1/2 часть их высоты, оставляя технологическое отверстие в пробке открытым. Растворы во флаконах замораживали при температуре минус 50 °С и затем лиофильно высушивали. В результате высушивания все полученные препараты имели вид пористой массы белого цвета, содержание влаги в которых составляло от 3,5 до 3,9 %. Содержимое флаконов с вариантами РД, приготовленными на основе мальтодекстрина, поливинилпирролидона и декстрана с молекулярной массой 5 000 Да, полностью растворялось при добавлении 2,0 мл дистиллированной воды и взбалтывании в течение  $(12,5 \pm 2,5)$  с, а на основе декстранов с молекулярной массой 40 000 и 60 000 Да — в течение  $(60 \pm 10)$  с. Питательные среды, приготовленные с использованием повторно растворённых в стерильной дистиллированной воде вариантов РД на основе различных наполнителей, при посеве пяти штаммов *H. influenzae* не отличались по биологическим свойствам от контрольной питательной среды, приготовленной с использованием свежеприготовленного стерильного раствора НАД. В связи с низкой растворимостью декстранов с молекулярной массой 40 000 и 60 000 Да, а также высокой стоимостью декстрана с молекулярной массой 5 000 Да, для использования в качестве

наполнителей при приготовлении РД выбрали глюсидекс 19 и поливинилпирролидон.

Для Шоколадного и ГБМ-агара были разработаны добавки с одинаковым составом:

- ростовая (далее — РД-ША), состоящая из НАД, цианокобаламина, тиамина пирофосфата, аденина, L-глутамина и L-цистеина гидрохлорида;
- селективная для выделения гемофильной палочки (СД-Г), состоящая из бацитрацина, амфотерицина В и ванкомицина;
- селективная для выделения менингококка (СД-М), содержащая амфотерицин В, полимиксин В и ванкомицина;
- селективная для выделения пневмококка (СД-П), содержащая амфотерицин В, полимиксин В и налидиксовую кислоту.

Учитывая опыт, полученный при разработке РД для Гемофилус агара, для РД-ША, СД-Г, СД-П и СД-М выбрали форму лиофильно высушенных растворов.

Все компоненты добавок хорошо растворимы в воде по отдельности или в совокупности с другими компонентами, например для растворения L-глутамина и аденина необходима кислая среда, создаваемая L-цистеина гидрохлоридом. Исключение составляет входящая в состав СД-П налидиксовая кислота, плохо растворимая в воде при нейтральном или кислом значении рН. В качестве растворителя для этого компонента использовали 0,5 % раствор углекислого натрия со значением рН от 11,0 до 11,6, после полного растворения налидиксовой кислоты рН раствора подводили 1 моль и 0,1 моль соляной кислотой до значения  $(7,55 \pm 0,5)$  и добавляли остальные компоненты селективной добавки.

После замораживания и лиофильного высушивания ростовая добавка имела вид пористой массы светло-розового цвета, а СД-Г — пористой массы светло-жёлтого цвета. Добавки СД-М и СД-П из-за малого объёма входящих в них компонентов имели вид рассыпающихся при встряхивании хлопьев от белого до светло-желтого цвета. Для придания объёма в состав этих добавок ввели наполнитель, нейтральный в отношении микроорганизмов и компонентов среды — глюсидекс 19. Проведённые исследования показали, что введение в состав СД-М и СД-П глюсидекса 19 не влияло на биологические показатели питательных сред с их использованием, обе добавки после высушивания имели вид пористой массы светло-жёлтого цвета.



Варианты Шоколадного агара и ГБМ-агара, приготовленные с использованием растворённых после лиофильного высушивания РД-ША, СД-Г, СД-П и СД-М, не отличались по биологическим показателям от вариантов, приготовленных с использованием этих же добавок, не подвергшихся высушиванию.

Таким образом, технология приготовления ростовых добавок Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара, а также СД-Г, СД-М и СД-П при серийном изготовлении среды включила в себя следующие стадии:

- приготовление растворов компонентов;
- стерилизация растворов ростовых добавок мембранной фильтрацией;
- розлив растворов добавок по флаконам вместимостью 10 мл;
- замораживание растворов добавок;
- лиофильное высушивание растворов добавок;
- герметизация флаконов с добавками резиновыми пробками с последующим завальцовыванием алюминиевыми колпачками.

Для отработки технологии производства РД, РД-ША, СД-Г, СД-П и СД-М и определения показателей качества данных компонентов наборов реагентов вышеуказанным способом приготовили 10 экспериментально-производственных серий каждой из добавок. Различий в биологических показателях питательных сред, приготовленных с использованием различных экспериментально-производственных серий одних и тех же добавок, не было выявлено. Исследование стерильности содержимого 5 % флаконов с РД и РД-ША из каждой серии подтвердил отсутствие контаминации препаратов, приготовленных по разработанной технологии.

В результате исследования физико-химических показателей экспериментально производственных серий добавок разработали следующие требования к показателям качества РД при серийном производстве: РД должна иметь вид пористой массы белого цвета, РД-ША — пористой массы светло-розового цвета с возможно неоднородной окраской, СД-Г, СД-М и СД-П — пористой массы от белого до светло-жёлтого цвета. Содержимое одного флакона с РД должно полностью растворяться в 2,0 мл дистиллированной воды в течение  $(1,5 \pm 0,5)$  мин, а РД-ША, СД-Г, СД-М и СД-П — в 2,0 мл дистиллированной воды в течение  $(2,5 \pm 0,5)$  мин. Полученный раствор РД должен представлять собой прозрачную бесцветную жидкость, РД-ША — прозрачную жидкость светло-розового цвета, а растворы СД-Г, СД-М и СД-П — прозрачные жидкости от бесцветного до светло-

желтого цвета. Остаточная влажность содержимого всех флаконов с добавками не должна превышать 7 %.

### 4.3 Определение сроков годности разработанных питательных сред

Определение сроков годности Гемофилус агара и Шоколадного агара проводили методом выемки проб с использованием пяти серий основ питательных сред, ростовых и селективных добавок.

Образцы каждой из серий основ Гемофилус агара и Шоколадного агара хранили комнатной температуре ( $21,5 \pm 3,5$ ) °С. Образцы всех исследованных серий РД, СД, РД-ША, СД-Г, СД-М и СД-П хранили в бытовом холодильнике при температуре ( $5 \pm 3$ ) °С. Образцы основ питательных сред и всех добавок, за исключением РД-ША, хранили в течение 18 месяцев. Образцы РД-ША хранили 30 месяцев, так как параллельно проводили исследование срока годности этой добавки как компонента ГБМ-агара. Выемку проб осуществляли первые 12 месяцев хранения один раз в три месяца, а затем ежемесячно.

В течение всего периода проведения эксперимента ни у одного из образцов не выявлено изменения ни по одному из определяемых физико-химических показателей, за исключением основы Гемофилус агара. Через 15 месяцев хранения в двух из пяти серий основы Гемофилус агара выявлено снижение значения рН на 0,2 и 0,25. Через 16 месяцев хранения аналогичное снижение рН обнаружено в оставшихся трёх сериях основы этой среды.

Биологические показатели основы Шоколадного агара, СД, РД и РД-ША оставались неизменными в течение всего срока хранения. Через 15 месяцев после начала эксперимента образцы одной серии СД-Г, СД-П СД-М при контроле биологических показателей среды отсутствовало подавление роста тест-штамма *C. albicans* ATCC 60193, посеянного из разведения  $10^{-4}$ . Через 16 месяцев после начала хранения образцы оставшихся четырёх серий селективных добавок также перестали подавлять рост этой культуры, что вероятно связано со снижением активности амфотерицина.

В связи со снижением значения рН в основе Гемофилус агара и ухудшением ингибирующих свойств селективных добавок Шоколадного агара, срок годности

для этих питательных сред установили 12 месяцев (15 месяцев минус три месяца) при хранении основ сред при температуре от 2 до 25 °С, а ростовых и селективных добавок при температуре (5±3) °С.

В связи с тем, что сроки годности для большинства сухих питательных сред составляют от 2 до 5 лет [112, с. 22], а срок годности СД-Г, СД-П и СД-М определён только в один год, селективные добавки исключили из состава ГБМ-агара.

Для определения срока годности ГБМ-агара провели исследования с использованием пяти серий сухой основы методом «ускоренного старения» при температуре, превышающей рекомендованную температуру хранения на 20 °С. Основу хранили в термостате при температуре 40 °С. Срок проведения эксперимента составил 9 месяцев с выемкой проб через 3, 6, 7, 8 и 9 месяцев хранения. В течение всего периода проведения эксперимента ни у одного из образцов не выявлено резких изменений ни по одному из определяемых физико-химических показателей. Биологические показатели оставались стабильными в течение 7 месяцев хранения. Через 8 месяцев хранения отметили существенное ухудшение роста *H. influenzae* ATCC 49247 — диаметр колоний, выросших на среде после хранения, был (0,9±0,1) мм, тогда как на контрольной среде (1,3±0,1) мм. Через 9 месяцев хранения были получены аналогичные результаты. Характер роста *N. meningitidis* ATCC 13102 и *S. pneumoniae* ATCC 6305 оставался неизменным на протяжении всего срока проведения эксперимента.

Согласно формуле 2.5 (раздел 2.7.6), срок хранения ГБМ-агара без ухудшения биологических показателей составил:

$$C = 2^2 \times 7 = 28 \text{ месяцев}$$

Исходя из этого сделали вывод, что срок годности ГБМ-агара составил 24 месяца (28 месяцев минус три месяца). Для подтверждения полученных результатов провели исследование методом выемки проб при рекомендованных условиях хранения. Образцы трёх серий сухой основы хранили 30 месяцев, делая выемку проб один раз в три месяца. За весь период проведения эксперимента изменений физико-химических и биологических показателей питательной среды не выявлено, что подтвердило адекватность установленного срока годности.

#### 4.4 Определение требований к биологическим показателям производственных серий питательных сред

Для контроля биологических показателей разработанных производственных серий питательных сред опытным путём выбрали тест-штаммы, наиболее чувствительные к составу сред.

В качестве тест-штаммов для контроля биологических показателей Гемофилус агара выбрали *H. influenzae* 423, *H. influenzae* ATCC 9006, *S. pyogenes* Dick-1 и *N. meningitidis* 208. Согласно разработанным требованиям, через  $(21 \pm 3)$  ч инкубации при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в атмосфере от 5 до 10 % CO<sub>2</sub> питательная среда должна обеспечивать рост тест-штаммов *H. influenzae* 423 и *H. influenzae* ATCC 9006 при посеве по 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения  $10^{-6}$  в виде слизистых, круглых, полупрозрачных, сероватого цвета колоний диаметром до 2,0 мм и полностью подавлять рост тест-штаммов: *S. pyogenes* Dick-1 и *N. meningitidis* 208 при посеве 0,1 мл взвеси из разведения  $10^{-4}$  через 48 ч инкубации в тех же условиях.

Для контроля биологических показателей Шоколадного агара в качестве тест-штаммов выбрали *H. influenzae* 423, *N. meningitidis* 208, *S. pneumoniae* ATCC 6305, *C. albicans* ATCC 60193 и *S. aureus* Wood-46. Согласно разработанным требованиям, без селективных добавок через  $(21 \pm 3)$  ч инкубирования при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в атмосфере от 5 до 10 % CO<sub>2</sub> питательная среда должна обеспечивать рост:

– *H. influenzae* 423 в виде слизистых, круглых, полупрозрачных, сероватого цвета колоний диаметром от 1,0 до 2,0 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения  $10^{-6}$ ;

– *N. meningitidis* 208 в виде полупрозрачных, выпуклых с ровными краями колоний диаметром от 1,0 до 1,5 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения  $10^{-6}$ ;

– *S. pneumoniae* ATCC 6305 в виде нежных полупрозрачных четко очерченных, не склонных к слиянию колоний диаметром 0,5 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения  $10^{-5}$ . Допускается наличие плоских с центральным углублением колоний. В зоне роста культуры должно наблюдаться изменение цвета питательной среды со светло-коричневого на зелёный.

Питательная среда с селективной добавкой СД-Г должна полностью подавлять рост тест-штаммов: *S. pneumoniae* ATCC 6305, *N. meningitidis* 208 и *C. albicans* ATCC 60193 при посеве 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения  $10^{-4}$  через 48 ч инкубации, обеспечивая рост тест-штамма *H. influenzae* 423 без каких-либо признаков подавления роста. Питательная среда с селективной добавкой СД-М должна полностью подавлять рост тест-штаммов: *S. pneumoniae* ATCC 6305, *H. influenzae* 423, *C. albicans* ATCC 60193 и *S. aureus* Wood-46 при посеве 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения  $10^{-4}$  через 48 ч инкубации, обеспечивая рост тест-штамма *N. meningitidis* 208 без каких-либо признаков подавления роста. Питательная среда с селективной добавкой СД-П, должна полностью подавлять рост тест-штаммов: *N. meningitidis* 208, *H. influenzae* 423 и *C. albicans* ATCC 60193 при посеве 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения  $10^{-4}$  через 48 ч инкубации, обеспечивая рост тест-штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 без каких-либо признаков подавления роста.

В качестве тест-штаммов для контроля биологических показателей ГБМ-агара выбрали *N. meningitidis* ATCC 13102, *H. influenzae* ATCC 49247 и *S. pneumoniae* ATCC 6305. Согласно разработанным требованиям, ГБМ-агар через  $(21 \pm 3)$  ч инкубации при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в атмосфере от 5 до 10 %  $\text{CO}_2$  должен обеспечивать рост:

- *N. meningitidis* ATCC 13102 в виде полупрозрачных блестящих сероватого цвета колоний диаметром от 1,0 до 2,0 мм с идеально ровными краями при посеве 0,1 мл взвеси из разведения  $10^{-6}$ ;
- *H. influenzae* ATCC 49247 в виде серых слизистых блестящих колоний диаметром от 1,0 до 2,0 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения  $10^{-6}$ ;
- *S. pneumoniae* ATCC 6305 в виде мелкие полупрозрачных чётко очерченных, не склонных к слиянию колоний диаметром от 0,4 до 0,6 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения  $10^{-5}$ . В зоне роста культуры должно наблюдаться обесцвечивание питательной среды.

Таким образом, разработаны технологии серийного производства трёх питательных сред в виде наборов реагентов:

- для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовой к применению (Гемофилус агар), которая состоит из основы питательной среды, ростовой добавки (РД) и селективной добавки (СД) (рисунок 4.1);

- для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовой к применению (Шоколадный агар), которая состоит из основы питательной среды, ростовой добавки (РД-ША), селективной добавки для выделения гемофильной палочки (СД-Г), селективной добавки для выделения менингококка (СД-М), селективной добавки для выделения пневмококка (СД-П) (рисунок 4.2);
- для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухой (ГБМ-агар), которая состоит из сухой основы питательной среды и ростовой добавки (рисунок 4.3).



Рисунок 4.1 — Питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению (Гемофилус агар)



Рисунок 4.2 — Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению (Шоколадный агар)



Рисунок 4.3 — Питательная среда для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая (ГБМ-агар)

Определили стадии производства всех трёх питательных сред, требования к готовой продукции и сроки их годности. На основании проведённых исследований разработали технические условия (ТУ 9398-121-78095326-2010) и промышленный регламент (ПР 78095326-82-2010) на набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению» (Гемофилус агар), технические условия (ТУ 9398-139-78095326-2011) и промышленный регламент (ПР 78095326-104-2012) на набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению» (Шоколадный агар), технические условия (ТУ 9385-203-78095326-2013) и промышленный регламент (ПР 78095326-130-2013) на набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая» (ГБМ-агар), а также инструкции по применению всех трёх питательных сред.

## **Глава 5. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СЕРИЙ РАЗРАБОТАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД**

Для оценки качества Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара провели сравнительное изучение биологических показателей качества производственных серий разработанных питательных и известных сред для культивирования ГБМ, а также изучили возможность их применения в клинических испытаниях.

### **5.1 Сравнительная оценка биологических показателей качества разработанных питательных и известных сред для культивирования ГБМ**

При оценке биологических показателей качества Гемофилус агара, Шоколадного агара, ГБМ-агара в качестве сред сравнения использовали пять коммерческих и четыре питательных среды лабораторного приготовления для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ. Коммерческие питательные среды представлены следующими препаратами:

- шоколадный агар на основе гонококкового агара производства Becton Dickinson с добавлением гемоглобина и смеси факторов роста IsoVitalex (ША-VD);

- шоколадный агар на основе гонококкового агара производства Mast group с добавлением гемоглобина и смеси факторов роста IsoVitalex (ША-MAST);

- шоколадный агар готовый к применению производства bioMerieux с добавлением смеси факторов роста PolyViteX (ША-VM);

- набор для приготовления шоколадного агара производства HiMedia без селективной добавки (ША-НМ);

- питательную среду Haemophilus test medium (НТМ) производства Oxoid.

В качестве среды лабораторного приготовления использовали:

- шоколадный агар с добавлением 5 % гретой бараньей крови на основе Питательной среды № 1 ГРМ;

- шоколадный агар с добавлением 5 % гретой бараньей крови на основе колумбийского агара;



- шоколадный агар с добавлением 5 % гретой крови крупного рогатого скота (КРС) на основе Питательной среды № 1 ГРМ;
- шоколадный агар с добавлением 5 % гретой крови КРС на основе колумбийского агара.

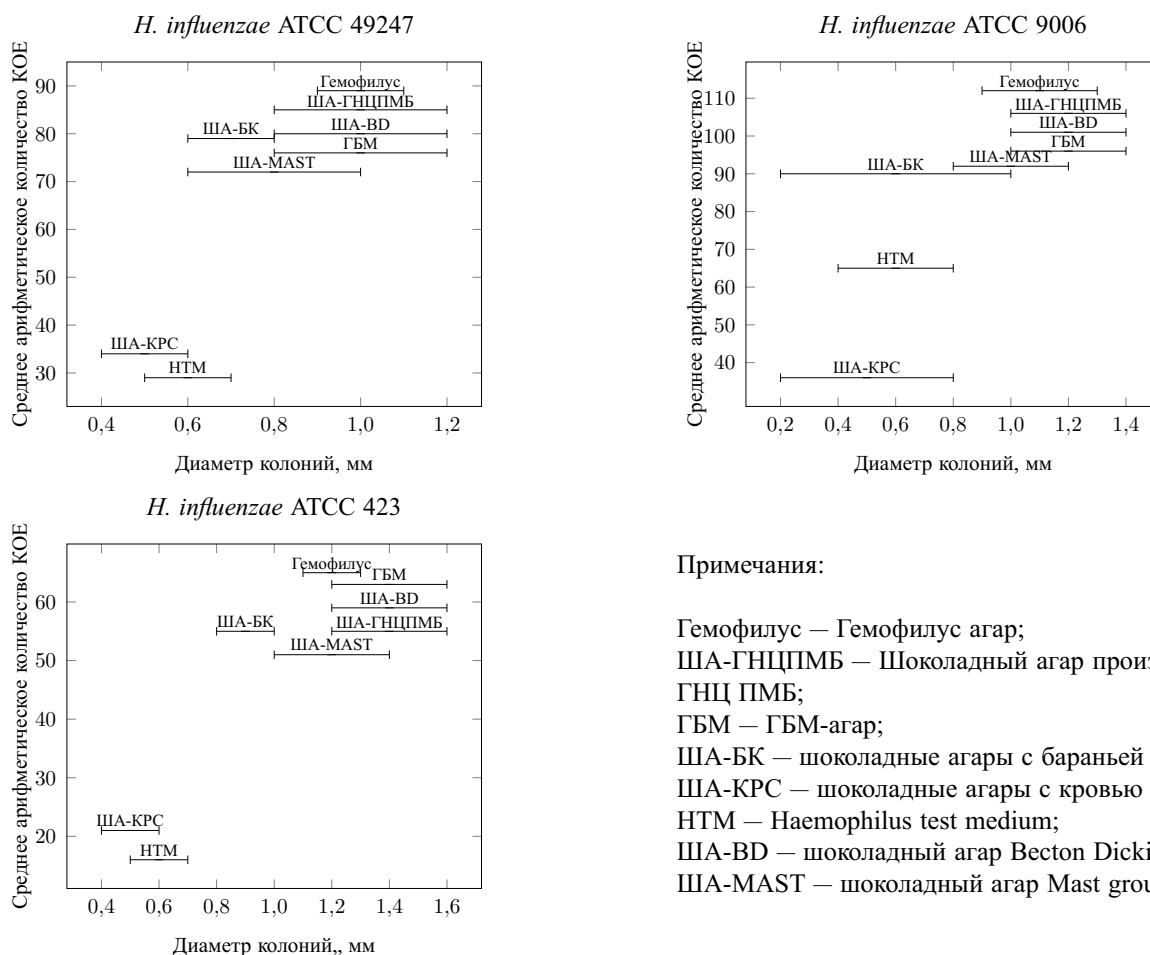
Исследование проводили с использованием музейных штаммов *H. influenzae* 423, *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 9006, *N. meningitidis* ATCC 13090, *N. meningitidis* ATCC 13077, *N. meningitidis* ATCC 13102, *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* ATCC 49619. При этом исследование шоколадных агаров с гретой кровью КРС (ША-КРС) и среды НТМ проводили только с использованием штаммов *H. influenzae*.

При посеве исследованных штаммов микроорганизмов на среды лабораторного приготовления значительные отличия в характере роста отмечены только на вариантах питательных сред, различающихся типом крови. При этом количество и размеры колоний одного и того же штамма на вариантах шоколадного агара с одним и тем же типом крови, приготовленных на основе Питательной среды № 1 ГРМ и колумбийского агара, мало различались между собой.

При использовании вариантов шоколадного агара с бараньей кровью (ША-БК) рост штаммов *H. influenzae* был нестабилен — размеры колоний значительно варьировались от точечных, еле заметных менее 0,2 мм до 0,8 мм в диаметре. На вариантах сред с кровью КРС рост гемофильной палочки отсутствовал. Добавление НАД с конечной концентрацией в среде 1 мг/л позволило получить рост испытуемых штаммов *H. influenzae* на средах с кровью КРС и добиться воспроизводимых результатов для сред с бараньей кровью. На рисунке 5.1 приведены графики зависимости среднего арифметического количества колоний и диапазона разброса диаметров колоний трёх штаммов *H. influenzae* через 18 ч культивирования на различных средах.

Различия в характере роста исследованных штаммов гемофильной палочки на коммерческих средах ША-ВД, ША-ВМ и ША-НМ несущественны, поэтому на рисунке 5.1 приведены данные только для ША-ВД.

Наименьшее количество выросших колоний и одновременно наименьший размер колоний через 18 ч культивирования всех трёх исследованных штаммов *H. influenzae* наблюдали на среде НТМ и вариантах шоколадного агара с кровью КРС. Остальные питательные среды по количеству выросших на них колоний *H. influenzae* различались между собой незначительно, что говорит об



## Примечания:

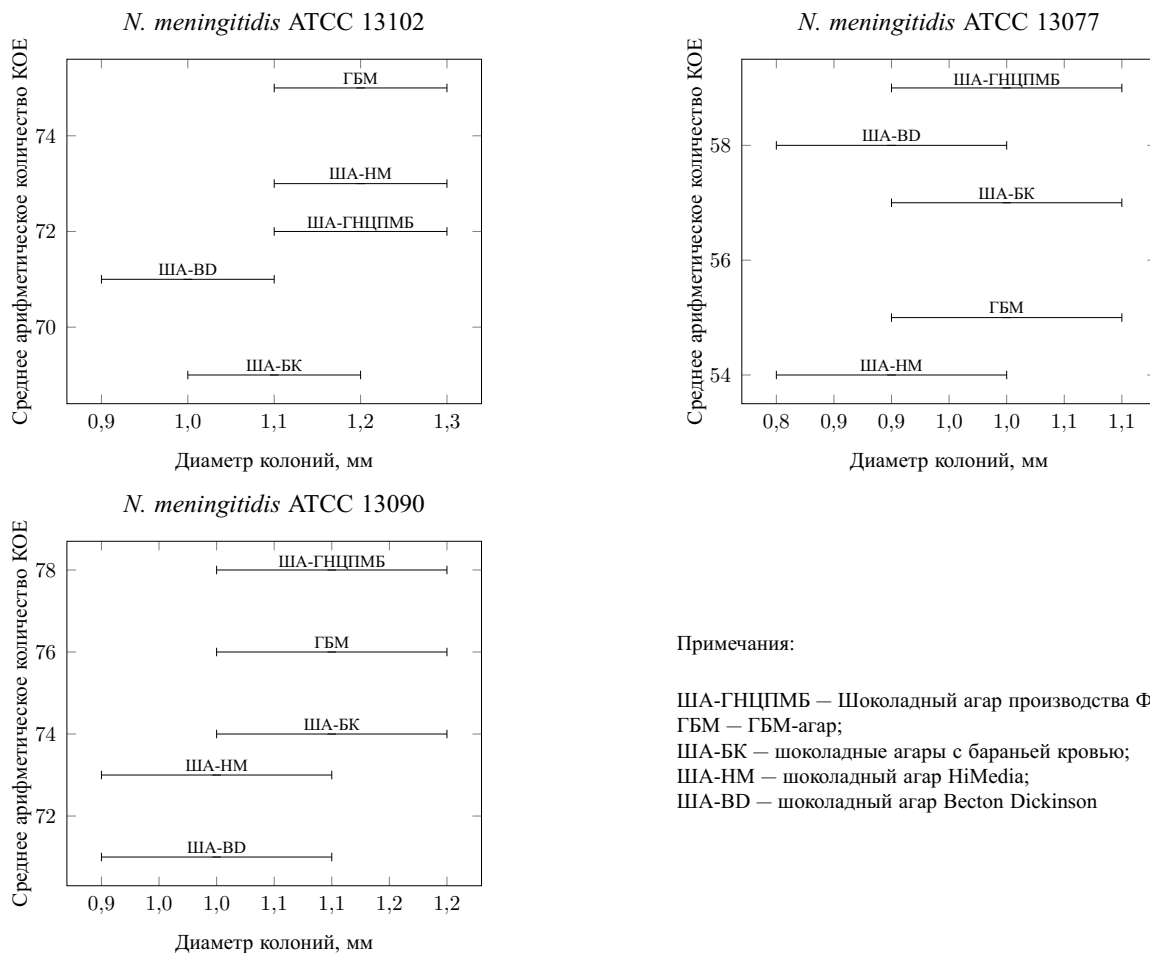
Гемофилус — Гемофилус агар;  
 ША-ГНЦПМБ — Шоколадный агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ;  
 ГБМ — ГБМ-агар;  
 ША-БК — шоколадные агары с бараньей кровью;  
 ША-КРС — шоколадные агары с кровью КРС;  
 НТМ — Haemophilus test medium;  
 ША-ВД — шоколадный агар Vecton Dickinson;  
 ША-МАСТ — шоколадный агар Mast group

Рисунок 5.1 — Графики зависимости количества и размеров колоний *H. influenzae* на различных питательных средах при посеве из разведения  $10^{-6}$  через 18 ч

их сходной чувствительности в отношении исследованных штаммов. Варианты ША-БК уступали иностранным коммерческим средам, а также Гемофилус агару, Шоколадному агару ФБУН ГНЦ ПМБ и ГБМ-агару по размерам выросших колоний. Кроме того, на всех чашках Петри с вариантами ША-БК размеры колоний *H. influenzae* ATCC 9006 отличались гетерогенностью — диаметр колоний варьировался от 0,2 до 1,0 мм. Похожий разброс размеров колоний этого штамма наблюдали и на вариантах ША-КРС, где диаметр колоний варьировался от 0,2 до 0,8 мм. Среда ША-МАСТ при сходном компонентном составе с ША-ВД и ША-ВМ незначительно уступала другим коммерческим средам по скорости роста всех исследованных штаммов *H. influenzae* — в среднем на этой среде колонии были мельче на  $(0,3 \pm 0,1)$  мм, чем на ША-ВД, ША-ВМ и ША-НМ. Шоколадный агар ФБУН ГНЦ ПМБ и ГБМ-агар не отличались от ША-ВД, ША-ВМ и ША-НМ ни по размерам, ни по количеству выросших колоний. При этом, через 18 ч

роста на Гемофилус агаре колонии всех исследованных штаммов *H. influenzae* были незначительно мельче, чем на Шоколадном агаре ФБУН ГНЦ ПМБ и ГБМ-агаре, однако через 24 ч роста диаметр колоний гемофильной палочки на всех трёх разработанных средах был примерно одинаковый.

На рисунке 5.2 приведены графики зависимостей среднего арифметического количества колоний и диапазона разброса диаметров колоний трёх штаммов *N. meningitidis* через 18 ч культивирования на различных средах.



Примечания:

ША-ГНЦПМБ — Шоколадный агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ;  
 ГБМ — ГБМ-агар;  
 ША-БК — шоколадные агары с бараньей кровью;  
 ША-НМ — шоколадный агар HiMedia;  
 ША-ВД — шоколадный агар Becton Dickinson

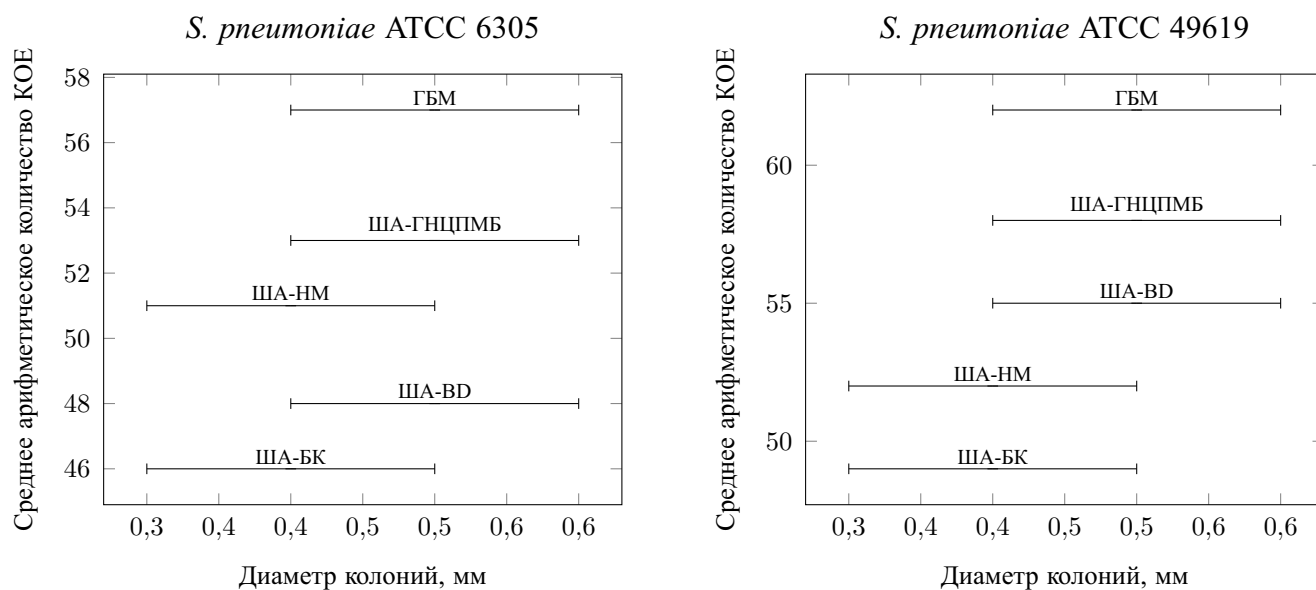
Рисунок 5.2 — Графики зависимости количества и размеров колоний *N. meningitidis* на различных питательных средах при посеве из разведения  $10^{-6}$  через 18 ч

Различия в характере роста исследованных штаммов менингококков на средах ША-ВД, ША-ВМ и ША-MAST несущественны, поэтому на рисунке 5.2 приведены данные только для ША-ВД.

Количество выросших колоний *N. meningitidis* на всех исследованных питательных средах оказалось практически на одном уровне, различие между наибольшим и наименьшим количеством КОЕ на различных средах не превышало

15 %. Размеры колоний менингококков на исследованных питательных средах незначительно варьировались в зависимости от штамма. Наиболее крупные колонии всех исследованных штаммов *N. meningitidis* выросли на ГБМ-агаре и Шоколадном агаре ФБУН ГНЦ ПМБ, а наиболее мелкие — на ША-ВД.

Как и в случае с *N. meningitidis*, рост исследованных штаммов *S. pneumoniae* на средах ША-ВД, ША-ВМ и ША-MAST практически был одинаков. Как показано на рисунке 5.3, количество колоний пневмококков, выросших на всех исследованных средах, практически одинаково.



Примечания: ША-ГНЦПМБ — Шоколадный агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ; ГБМ — ГБМ-агар; ША-БК — шоколадные агары с бараньей кровью; ША-НМ — шоколадный агар HiMedia; ША-ВД — шоколадный агар Becton Dickinson

Рисунок 5.3 — Графики зависимости количества и размеров колоний *S. pneumoniae* на различных питательных средах при посеве из разведения  $10^{-5}$  через 18 ч

На ША-ВД, ГБМ-агаре и Шоколадном агаре ФБУН ГНЦ ПМБ колонии обоих исследованных штаммов *S. pneumoniae* имели диаметр  $(0,5 \pm 0,1)$  мм, а на ША-НМ и ША-БК —  $(0,4 \pm 0,1)$  мм. В ходе исследования отмечены различия в дифференцирующих свойствах питательных сред в отношении пневмококка. На Шоколадном агаре ФБУН ГНЦ ПМБ, ША-ВД, ША-ВМ и ША-MAST в зоне роста культур происходило чёткое изменение цвета питательной среды с коричневого на желтовато-зелёный. На среде ША-БК подобное изменение цвета

также присутствовало, но было менее выражено. Среда ША-НМ имела нетипичный для шоколадного агара чёрный цвет, при этом изменение цвета в зоне роста *S. pneumoniae* происходило, но было менее заметно, чем на других исследованных питательных средах. На ГБМ-агаре вокруг колоний пневмококков происходило обесцвечивание питательной среды.

За исключением размеров колоний, существенных различий в морфологии ни у одного из исследованных микроорганизмов, выращенных на различных питательных средах, не обнаружили. Штаммы *H. influenzae* на всех исследованных средах росли в виде выпуклых серых слизистых блестящих колоний, *N. meningitidis* — в виде полупрозрачных блестящих сероватого цвета колоний с ровными краями, штаммы *S. pneumoniae* — в виде мелких полупрозрачных чётко очерченных, не склонных к слиянию колоний уплощённой формы.

Таким образом, установлено, что Гемофилус агар, Шоколадный агар и ГБМ-агар не уступают по биологическим показателям испытанным коммерческим питательным средам иностранного производства, а также превосходят шоколадные агары лабораторного приготовления.

## **5.2 Изучение диагностической ценности разработанных питательных сред при исследовании клинических образцов**

Для изучения возможности использования разработанных питательных сред в диагностических целях провели ряд исследований по выделению основных возбудителей ГБМ из клинического материала в трёх организациях: ФБУН ЦНИИЭ, ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского и НАКФФ.

Исследование Гемофилус агара во ФБУН ЦНИИЭ проводили в два этапа. На первом этапе определяли специфическую активность среды с использованием коллекционных штаммов и клинических изолятов *H. influenzae* № 860, *H. influenzae* № 1035, *H. influenzae* № 1058, *H. influenzae* № 1075, *H. influenzae* № 1085. На втором этапе проводили посев 5 образцов клинического материала спинно-мозговой жидкости от больных детей в возрасте до 5 лет с диагнозом гнойный бактериальный менингит. В качестве контрольной питательной среды использовали Haemophilus Chocolate 2 Agar.

В результате исследования установлено, что рост исследованных штаммов на Гемофилус агаре не отличался от роста на контрольной среде. Типичный рост *H. influenzae* в виде слизистых, блестящих полупрозрачных колоний наблюдался через  $(21 \pm 3)$  ч инкубирования при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в атмосфере от 5 до 10 % CO<sub>2</sub>. Все выросшие на испытываемой среде культуры сохраняли культурально-морфологические, антигенные свойства и наличие чётко выраженной капсулы.

При посеве пяти клинических образцов спинно-мозговой жидкости на Гемофилус агаре и контрольной среде выявлен рост бактерий *H. influenzae* из двух образцов одновременно на обеих средах.

На первом этапе исследования во ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского определяли биологические показатели Гемофилус агара и Шоколадного агара с использованием коллекционных штаммов *H. influenzae* типа b ATCC 10211, *H. influenzae* типа f ATCC 9833, *H. influenzae* некапсулированного NCTC 11315, а также клинических изолятов *H. influenzae* типа b № 001, *H. influenzae* типа b № 002, *H. influenzae* типа b № 003, *N. meningitidis* № B66, *S. pneumoniae* серотипа 19F и *S. pneumoniae* серотипа 3. На втором этапе проводили испытания с использованием 15 образцов клинического материала спинно-мозговой жидкости от больных детей в возрасте до 5 лет с подозрением на гнойный бактериальный менингит, поступивших на санитарно-микробиологическое обследование. В качестве контрольной среды использовали шоколадный агар лабораторного приготовления на основе колумбийского агара.

В результате исследования установлено, что характер роста исследованных штаммов на Гемофилус агаре и Шоколадном агаре не отличался от роста на контрольной среде. Типичный рост капсулированных штаммов *H. influenzae* наблюдали через  $(21 \pm 3)$  ч инкубирования при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в атмосфере от 5 до 10 % CO<sub>2</sub> в виде слизистых круглых сероватого цвета колоний диаметром до 2 мм. Колонии некапсулированного штамма *H. influenzae* NCTC 11315 на обеих испытываемых и контрольной средах — слизистые, круглые, сероватого цвета, диаметром до 1 мм. Штаммы *S. pneumoniae* вырастали на Шоколадном агаре и контрольной среде в виде мелких полупрозрачных колоний, окруженных зоной позеленения питательной среды. Штаммы *N. meningitidis* формировали полупрозрачные выпуклые колонии с ровными краями диаметром от 0,5 до 1,0 мм. Все выросшие на испытываемых питательных средах культуры сохраняли куль-

турально-морфологические, биохимические и антигенные свойства. При посеве образцов клинического материала не выявили роста искомым микроорганизмов ни на испытуемых, ни на контрольной среде.

В результате исследований во ФБУН ЦНИИЭ и ФБУН МНИИЭМ отмечено, что Шоколадный агар и Гемофилус агар удобны в работе, для их использования не требуется добавления крови, что очень важно при проведении работ в полевых условиях и в передвижных лабораториях. Гемофилус агар рекомендован для культивирования и выделения *H. influenzae*, а Шоколадный агар для культивирования и выделения основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов: *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*.

Исследование в НАКФФ проводили в два этапа. На первом этапе производили бактериологический посев 90 клинических образцов мазков из зева от детей и взрослых в возрасте от 0 до 66 лет с заболеваниями верхних дыхательных путей, поступивших из лечебно-профилактических учреждений города Москвы и Московской области. В исследовании использовали Шоколадный агар и ГБМ-агар без селективных добавок. В качестве контрольной питательной среды использовали кровяной агар на основе колумбийского агара.

При исследовании клинического материала учитывали и отбирали для дальнейшей идентификации только колонии микроорганизмов, подозрительные на колонии этиологических агентов заболевания. В первую очередь колонии, похожие на *H. influenzae* (серые слизистые блестящие колонии), *N. meningitidis* (полупрозрачные блестящие колонии сероватого цвета с идеально ровными краями), *S. pneumoniae* (мелкие полупрозрачные чётко очерченные, не склонные к слиянию колонии, в зоне роста которых на кровяном агаре наблюдался  $\alpha$ -гемолиз, на ГБМ-агаре — обесцвечивание питательной среды, на Шоколадном агаре — изменение цвета среды с коричневого на зелёный).

В ходе выполнения второго этапа исследования в качестве клинического материала использовали 10 образцов мазков из зева, взятых от здоровых людей в возрасте от 30 до 55 лет. Исследование проводили на селективных вариантах Шоколадного агара и ГБМ-агара с использованием СД-Г, СД-П и СД-М. При анализе клинического материала учитывали и отбирали для дальнейшего изучения все выросшие колонии микроорганизмов.

Для выделения гемофильной палочки в качестве контрольной среды использовали среду ША-ВД с добавлением бацитрацина (500 мг/л); для выделения

пневмококка — кровяной агар на основе питательной среды № 1 ГРМ с добавлением гентамицина (5 мг/л); для выделения менингокока — сывороточный агар с добавлением линкомицина (5 мг/л).

Всего из 90 образцов клинического материала от больных было выделено 154 культуры микроорганизмов, представленных 10 родами. Результаты исследования приведены в таблице 5.1. Как видно из таблицы, наибольшее количество выделенных на испытуемых и контрольной средах микроорганизмов принадлежит к роду *Streptococcus*, представители которого в высоких концентрациях обнаружены практически во всех исследованных образцах. При этом искомым видом стрептококков, *S. pneumoniae*, обнаружен в 23 образцах клинического материала, как на обеих испытуемых средах, так и на кровяном агаре.

Таблица 5.1 — Результаты исследования клинических образцов при посеве на питательные среды без селективных добавок

Выделенные микроорганизмы	Шоколадный агар	ГБМ-агар	Кровяной агар
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	3	3
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1	1	1
<i>Acinetobacter junii</i>	1	1	1
<i>Candida albicans</i>	10	10	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3	3
<i>Escherichia coli</i>	3	3	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	9	9	9
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	3	3	3
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3	3	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	2	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	23	23
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	3	3
<i>Streptococcus mitis group</i>	36	36	36
<i>Streptococcus oryzihabitans</i>	1	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	23	23	23
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1	1
<i>Streptococcus salivarius group</i>	27	27	27



Представители рода *Haemophilus* выделены на ГБМ-агаре, Шоколадном и кровяном агарах из 15 образцов, среди них на долю *H. influenzae* приходится 9 случаев обнаружения на каждой из питательных сред.

Колонии *N. meningitidis* обнаружены на испытуемых и контрольной средах при посеве только двух образцов.

Остальные выделенные и идентифицированные микроорганизмы относились к видам *S. aureus*, *C. albicans*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, а также к роду *Acinetobacter*. Практически во всех образцах обнаружен рост сапрофитных нейссерий, но в связи с низкой диагностической значимостью они не включены в результаты исследования и не отражены в таблице.

Таким образом, количество выделенных микроорганизмов на обеих испытуемых средах и контрольной среде было одинаково, причем все они выделены из одних и тех же образцов. Колонии выделенных культур микроорганизмов на каждой испытуемой питательной среде не отличались от выросших на контрольной среде. Исключение составляли такие гемолитические микроорганизмы, как *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. parahaemolyticus* и некоторые виды стрептококков, которые в процессе роста не изменяли цвет ГБМ-агара и Шоколадного агара. Это с одной стороны, затрудняло предварительную дифференциацию данных микроорганизмов, но с другой стороны, облегчало выделение зеленеющих стрептококков, в первую очередь *S. pneumoniae*. Вокруг колоний *S. pneumoniae* на ГБМ-агаре наблюдалось заметное обесцвечивание, а на Шоколадном агаре – появление зелёного окрашивания среды.

В ходе исследования отмечено преимущество испытуемых питательных сред: они способны обеспечивать рост *H. influenzae* в монокультуре, в то время, как выделение гемофильной палочки на кровяном агаре обусловлено способностью к сателлитному росту данного вида в присутствии других микроорганизмов, вызывающих  $\beta$ -гемолиз.

В результате проведения второго этапа исследования, как видно из таблицы 5.2, выделили и идентифицировали 14 видов микроорганизмов, относящихся к 6 родам. Использование селективных вариантов испытуемых питательных сред позволило подавить рост значительного количества микроорганизмов и легко обнаружить колонии искомым микроорганизмов.

Как и на первом этапе, наибольшее количество выделенных культур принадлежало к роду *Streptococcus*, включая *S. pneumoniae* (в 4 образцах), *S. mitis* (в 6 образцах) и *S. salivarius* (в 8 образцах). Все они были выделены на ГБМ-агаре и Шоколадном агаре, как с использованием СД-П, так без селективной добавки. На кровяном агаре не удалось найти культуру *S. salivarius* в двух образцах.

Таблица 5.2 — Результаты исследования клинических образцов при посеве на среды с селективными добавками

Выделенные микроорганизмы	Всего выделено	Количество образцов, из которых выделены микроорганизмы на питательных средах						
		СД-Г	ША-ВД	СД-П	КА	СД-М	СА	БСД
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	1	—	—	—	—	—	—
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	9	9	8	—	—	—	—	7
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	3	3	3	—	—	—	—	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	—	—	—	—	—	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	—	—	1	1	—	—	1
<i>Streptococcus mitis</i>	6	—	—	6	6	—	—	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	—	—	4	4	—	—	4
<i>Streptococcus salivarius</i>	8	—	—	8	6	—	—	8
<i>Kingella denitrificans</i>	2	—	—	—	—	2	—	1
<i>Neisseria flavescens</i>	3	—	—	—	—	—	3	3
<i>Neisseria lactamica</i>	1	—	—	—	—	—	1	1
<i>Neisseria macacae</i>	4	—	—	—	—	—	4	4
<i>Neisseria mucosa</i>	1	—	—	—	—	—	1	—
<i>Neisseria perflava</i>	2	—	—	—	—	2	2	2

В ходе исследования обнаружено 13 культур *Haemophilus* spp., включая, *H. influenzae* (в одном образце), *H. parainfluenzae* (в девяти образцах) и *H. parahaemolyticus* (в трёх образцах). Причем, все идентифицированные штаммы были выделены на селективных вариантах обеих испытываемых средах, содержащих СД-Г. На контрольной среде ША-ВД с бацитрацином найдено только 11 культур гемофил. И, что особенно важно, культура *H. influenzae* выделена только на испытываемых средах. На неселективном варианте испытываемых сред данная культура не была обнаружена среди большого количества колоний сопутствующих микроорганизмов. На ША-ВД рост колоний *H. influenzae* отсутствовал.

Ни в одном из исследованных клинических образцов не был обнаружен менингококк. Его не удалось обнаружить ни на одной питательной среде. Нейс-

серии других видов (*Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria macacae* и *Neisseria mucosa*) обнаружены на испытуемых средах без селективных добавок и на сывороточном агаре. На селективных вариантах испытуемых средах с добавлением СД-М выделена культура *Neisseria perflava*, которая при дополнительном исследовании её антибиотикочувствительности оказалась устойчивой к полимиксину, входящему в состав СД-М. Помимо *Neisseria perflava* на вариантах с СД-М выделена устойчивая к полимиксину культура *Kingella denitrificans*, которая была чувствительной к линкомицину и не росла на сывороточном агаре с линкомицином.

На средах с внесением СД-П помимо стрептококков ожидаемо обнаружен рост колоний *S. aureus*. К тому же ингибирующему эффекту приводит добавление гентамицина к кровяному агару, помимо стрептококков на среде выделена одна культура золотистого стафилококка.

Таким образом, в ходе проведения исследований клинического материала с использованием Шоколадного агара, ГБМ-агара и контрольной питательной среды без селективных добавок выделено одинаковое число культур, представителей 10 родов микроорганизмов. Использование испытуемых сред с селективными добавками позволило без количественных потерь избирательно выделить культуры *H. influenzae* и *S. pneumoniae* и подавить рост значительного числа микроорганизмов. Испытуемые среды не уступали по ростовым свойствам контрольным средам, используемым в клинической практике для выделения основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов.

В результате проведённых исследований установлено, что Гемофилус агар, Шоколадный агар и ГБМ-агар не уступают по биологическим показателям известным питательным средам аналогичного назначения. Разработанные питательные среды успешно прошли испытания в различных организациях и были признаны пригодными для выделения основных возбудителей ГБМ из клинического материала.

По результатам исследований разработаны и утверждены методические рекомендации федерального уровня «Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов» (МР 4.2.0078/1-13) и методические рекомендации учрежденческого уровня «Использование питательной среды для культивирования и выделения гемофильной палочки (Гемофилус агар)».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гнойные бактериальные менингиты — тяжёлые инфекционные заболевания, основными этиологическими агентами которых являются *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Заболеваемость менингитом в последнее десятилетие во всем мире снижается за счет введения специфической иммунопрофилактики. Однако сохраняется высокая смертность, а многие больные остаются нетрудоспособными из-за несвоевременной диагностики болезни. Основные возбудители ГБМ также могут быть причиной и таких тяжелых заболеваний, как пневмония, артрит, эндокардит, остеомиелит, перикардит, целлюлит, бронхит, отит, синусит. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, является неотъемлемой составляющей для своевременной и правильной постановки диагноза и назначения адекватного лечения. Лабораторная диагностика, направленная на выявление, идентификацию и определения чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам, сочетает классический культуральный и экспресс методы. При этом культуральный метод с посевом клинического материала на бактериологические питательные среды занимает одно из основных мест в схеме лабораторной диагностики ГБМ, так как позволяет достоверно подтвердить наличие возбудителя.

В обзоре литературы показано, что для выделения и культивирования таких прихотливых микроорганизмов, как *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, требуются питательные среды сложного состава, содержащие богатую белковую основу и факторы роста. Несмотря на разнообразие оригинальных прописей отечественных питательных сред для основных возбудителей ГБМ, серийного производства этих сред, за исключением Менингоагара, не было организовано. В связи с этим в российской клинической практике используют среды лабораторного приготовления с добавлением крови или коммерческие среды иностранного производства. Разработка и организация промышленного выпуска питательных сред для диагностики основных возбудителей ГБМ, которые не уступают иностранным средам аналогичного назначения и не требуют добавления нативной крови, является важной задачей, так как это позволит повысить эффективность лабораторной диагностики, а так же снизить долю иностранных питательных сред в отечественной клинической микробиологии.

В ходе исследования с использованием кондуктометрического метода и метода культурального посева разработана белковая основа питательной среды, состоящая из смеси ПГК, ЭПД и пептона, которая является оптимальной для всех трех основных возбудителей ГБМ. Использование кондуктометрического метода позволило проследить за динамикой метаболической активности микроорганизмов и сократить время и количество исследований. В качестве источника фактора роста X, необходимого для роста гемофильной палочки, выбран СРГМ, ранее не применявшийся в питательных средах для культивирования данного микроорганизма. На основании литературных данных о методах избирательного выделения и природной устойчивости к антимикробным препаратам основных возбудителей ГБМ сконструированы селективные добавки для выделения каждого из возбудителей: *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. В результате проведенных исследований разработаны прописи трёх питательных сред: для выделения и культивирования *H. influenzae* — Гемофилус агар, и для выделения всех трех основных возбудителей бактериальных менингитов — Шоколадный агар и ГБМ-агар.

Все три разработанные питательные среды содержат богатую белковую основу и факторы роста, необходимые для роста основных возбудителей ГБМ, обладают ингибирующими свойствами и не требуют добавления нативной крови. Шоколадный агар и ГБМ-агар — обладают дифференцирующими свойствами в отношении пневмококка. На Шоколадном агаре в зоне роста *S. pneumoniae* происходит изменение цвета среды с коричневого на желтовато-зелёный, характерное для шоколадных агаров, приготовленных из нативной крови. На ГБМ-агаре, в отличие от Шоколадного агара, в зоне роста пневмококка происходит обесцвечивание питательной среды.

Разработаны технологии производства Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара. В связи с особенностями состава, в частности наличием в питательных средах термолабильных компонентов и селективных добавок, каждая из питательных сред сконструирована в виде наборов реагентов, включающих основу, ростовую и селективные добавки. В ходе проведенных исследований отработаны технологии выпуска основы ГБМ-агара в сухом виде путем смешивания отдельных компонентов в лопастном смесителе, а Гемофилус агара и Шоколадного агара в виде стерильных готовых к применению питательных сред во флаконах для последующего расплавления и розлива в чашки Петри. Для

всех трех питательных сред разработана технология приготовления ростовых и селективных добавок методом лиофильного высушивания растворов компонентов.

Осуществлена оценка стабильности свойств микроорганизмов, выращенных на Гемофилус агаре, Шоколадном агаре и ГБМ-агаре, с использованием различных методов. Культуральные и морфологические свойства музейных штаммов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, относящихся к различным серогруппам, после культивирования на разработанных питательных средах не изменялись и были типичны для этих видов микроорганизмов. В мазках, окрашенных по Гинсу, у всех капсульных штаммов исследованных микроорганизмов наблюдали наличие капсулы. Реакция латекс-агглютинации с соответствующими типоспецифическими сыворотками у всех исследованных штаммов, выращенных на Гемофилус агаре, Шоколадном агаре и ГБМ-агаре, давала положительный результат. В ходе исследований структурных характеристик бактерий методами сканирующей электронной микроскопии выявлено, что культивирование штаммов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* на разработанных питательных средах не влияет на структурные характеристики клеток и не изменяет их морфологию. Исследования методами ПЦР штаммов *H. influenzae* ATCC 49247 и *H. influenzae* ATCC 49760, выращенных на контрольных питательных средах и на всех трёх разработанных средах, показали видовое молекулярно-генетическое сходство и идентичные внутривидовые различия.

Проведены сравнительные испытания разработанных питательных сред, сред аналогичного назначения иностранного производства и сред лабораторного приготовления с использованием музейных штаммов и клинических образцов (спинно-мозговой жидкости от больных с подозрением на гнойный бактериальный менингит и мазков из зева от пациентов с заболеваниями верхних дыхательных путей). Показано, что Гемофилус агар, Шоколадный агар и ГБМ-агар по ростовым свойствам не уступают средам сравнения. В процессе клинических испытаний в различных организациях разработанные препараты были признаны пригодными для выделения основных возбудителей ГБМ из клинического материала. Питательные среды зарегистрированы в Российской Федерации в качестве медицинских изделий.

Таким образом, все три разработанные питательные среды — Гемофилус агар, Шоколадный агар и ГБМ-агар — могут быть внедрены в схему лабораторной

диагностики ГБМ и других инфекций, вызываемых *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, что позволит увеличить долю импортозамещающих питательных сред в отечественной клинической микробиологии и повысить эффективность диагностики инфекционных болезней.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны три питательные среды: для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению (Гемофилус агар), для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению (Шоколадный агар) и для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая (ГБМ-агар).

2. Гемофилус агар, Шоколадный агар и ГБМ-агар не требуют добавления нативной крови или сыворотки.

3. Показана возможность применения кондуктометрического метода при разработке питательных сред.

4. Впервые в качестве заменителя нативной крови для культивирования *H. influenzae* и в качестве источника фактора X использован стимулятор роста гемофильных микроорганизмов.

5. Впервые установлена возможность использования стимулятора роста гемофильных микроорганизмов в качестве субстрата для придания питательным средам дифференцирующих свойств при культивировании пневмококка.

6. Разработаны технологии промышленного производства трёх питательных сред: Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара, оформленные в виде промышленных регламентов. Для каждой из питательных сред разработаны инструкции по применению, а также определены требования к показателям качества, которые были оформлены в виде технических условий.

7. Установлена зависимость качества питательных сред для выделения основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов от физико-химических показателей компонентов, что позволило управлять качеством производственных серий питательных сред.

8. Доказана диагностическая ценность Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара. Разработанные питательные среды не уступают иностранным коммерческим средам аналогичного назначения, а также средам лабораторного приготовления, используемым в клинической практике.

9. Все три разработанные питательные среды зарегистрированы как медицинские изделия в установленном в Российской Федерации порядке.

10. К моменту написания диссертации произведено и реализовано 1417 наборов Шоколадного агара, 1049 наборов Гемофилус агара и две серии ГБМ-агара.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Королева И. С. Принципы лабораторной диагностики генерализованных форм менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов / И. С. Королева, Г. В. Белошицкий, Т. А. Тагаченкова // Медицинский алфавит. — 2009. — Т. 1, № 2. — С. 23—28.
2. Королева, И. С. Результаты эпидемиологического мониторинга бактериальных менингитов на территории Российской Федерации / И. С. Королева, Г. В. Белошицкий, И. М. Закроева, М. А. Королева // Медицинский алфавит. — 2013. — Т. 1, № 5. — С. 8—10.
3. Фролова Е. Я. Эпидемиологический мониторинг и профилактика гемофильной инфекции типа b в Российской Федерации / Е. Я. Фролова, В. Н. Филатов // Журнал инфектологии. — 2012. — Т. 4, № 2. — С. 73—83.
4. Харит С. М. Современные подходы к профилактике пневмококковой инфекции / С. М. Харит, А. Л. Перова // Медицинский совет. — 2015. — № 16. — С. 64—67.
5. Богданович, Т. М. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae* / Т. М. Богданович, О. У. Стецюк, О. И. Кречикова, Л. Г. Боронина, Л. К. Катосова, М. Е. Фаустова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2000. — Т. 2, № 2. — С. 93—109.
6. Кречикова, О. И. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae* / О. И. Кречикова, Р. С. Козлов, Т. М. Богданович, О. У. Стецюк, М. М. Суворов, Л. К. Катосова, Л. А. Вишнякова, М. Е. Фаустова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2000. — Т. 2, № 1. — С. 88—98.
7. Абрамцева М. В. Менингококковая инфекция. Современные представления о возбудителе, эпидемиологии, патогенезе и диагностике. Сообщение 1 / М. В. Абрамцева, А. П. Тарасов, Т. И. Немировская // Биопрепараты. — 2014. — Т. 3. — С. 4—10.

8. МУК 4.2.1887-04. Методические указания. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. — М., 2005. — 48 с.
9. Brouwer M. C. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis / M. C. Brouwer, A. R. Tunkel, D. van de Beek // *Clinical Microbiology Reviews*. — 2010. — Vol. 23, no. 3. — P. 467–492.
10. Королева, И. С. Этиология и лабораторная диагностика гнойных бактериальных менингитов / И. С. Королева, Г. В. Белошицкий, И. Н. Лыткина, Г. Чистякова, В. Л. Заикин, Н. Малышев, Л. Я. Соловьева, Т. Я. Липчанская // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. — 2005. — № 3. — С. 5–9.
11. Kim K. S. Acute bacterial meningitis in infants and children / K. S. Kim // *Lancet Infect Dis*. — 2010. — Vol. 10. — P. 32–42.
12. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*: WHO manual [Электронный ресурс]. — 2-е изд. — Geneva: World Health Organization, 2011. — 311 с. — Режим доступа: <http://www.who.int/iris/handle/10665/70765> (дата обр. 21.03.2016).
13. Менингококковый менингит: Информационный бюллетень № 141 [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. — Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/ru/> (дата обр. 29.11.2016).
14. Приказ № 88 от 17.03.2008 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» [Электронный ресурс]. — Роспотребнадзор, 2008. — Режим доступа: <http://03.rospotrebnadzor.ru/documents/ros/1616/> (дата обр. 13.12.2016).
15. Королева М. А. Эпидемиологический мониторинг за гнойными бактериальными менингитами в Российской Федерации : дис. ... канд. мед. наук : 14.02.02 / М. А. Королева. — М, 2014. — 176 с.
16. Королева, И. С. Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов / И. С. Королева, Г. В. Белошицкий, И. М. Закроева, Т. А. Тагаченкова, М. А. Королева // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. — 2009. — 1(44). — С. 5–8.

17. Королева, И. С. Менингококковая инфекция в Российской Федерации / И. С. Королева, Г. В. Белошицкий, И. М. Закроева, М. А. Королева // Медицинский алфавит. — 2015. — Т. 1, № 6. — С. 27–28.
18. Никитюк, Н. Ф. Пневмококковые инфекции: современное состояние заболеваемости и вакцинопрофилактики / Н. Ф. Никитюк, Т. И. Немировская, Ю. И. Обухов, А. А. Горяев // Биопрепараты. — 2014. — 2(50). — С. 4–12.
19. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году: Государственный доклад [Электронный ресурс]. — М : Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2016. — 200 с. — Режим доступа: [http://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/486/gd\\_2015\\_ds.pdf](http://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/486/gd_2015_ds.pdf) (дата обр. 12.11.2016).
20. Butler, J. C. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy: an evaluation of current recommendations / J. C. Butler, R. F. Breiman, J. F. Campbell, H. B. Lipman, C. V. Broome, R. R. Facklam // *Jama*. — 1993. — Vol. 270, no. 15. — P. 1826–1831.
21. Bottomley, M. J. Future challenges in the elimination of bacterial meningitis / M. J. Bottomley, D. Serruto, M. A. P. Sáfiadi, K. P. Klugman // *Vaccine*. — 2012. — Vol. 30. — B78–B86.
22. Ribeiro, G. S. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil / G. S. Ribeiro [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. — 2003. — Vol. 187, no. 1. — P. 109–116.
23. Никифоров В. А. Актуальные и нерешенные проблемы менингококковой инфекции на современном этапе / В. А. Никифоров, В. В. Кичикова, Е. И. Ефимов // Медицинский альманах. — 2011. — 5(17). — С. 94–99.
24. МУК 4.2.3115–13. Методические указания. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний. — М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. — 39 с.
25. Bergey's manual of systematic bacteriology. The proteobacteria, part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Vol. 2 / ed. by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity. — 2nd ed. — Springer East Lansing, MI, 2005. — 1388 p.

26. Миронов, К. О. Генетическое субтипирование *Neisseria meningitidis* / К. О. Миронов, А. Е. Платонов, Г. А. Шипулин, А. Van Der Ende, И. С. Королева // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2005. — № 3. — С. 23–28.

27. Rock, J. D. The pathogen *Neisseria meningitidis* requires oxygen, but supplements growth by denitrification. Nitrite, nitric oxide and oxygen control respiratory flux at genetic and metabolic levels / J. D. Rock, M. R. Mahnane, M. F. Anjum, J. G. Shaw, R. C. Read, J. W. B. Moir // Molecular Microbiology. — 2005. — Vol. 58, no. 3. — P. 800–809.

28. Talà, A. Glutamate utilization promotes meningococcal survival in vivo through avoidance of the neutrophil oxidative burst / A. Talà, C. Monaco, K. Nagorska, R. M. Exley, A. Corbett, A. Zychlinsky, P. Alifano, C. M. Tang // Molecular Microbiology. — 2011. — Vol. 81, no. 5. — P. 1330–1342.

29. Chen, C. Y. Physiology and metabolism of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: implications for pathogenesis. / C. Y. Chen, C. A. Genco, J. P. Rock, S. A. Morse // Clinical Microbiology Reviews. — 1989. — Vol. 2, Suppl. — S35–S40.

30. Smith H. Effect of host lactate on gonococci and meningococci: new concepts on the role of metabolites in pathogenicity / H. Smith, C. M. Tang, R. M. Exley // Infection and Immunity. — 2007. — Vol. 75, no. 9. — P. 4190–4198.

31. Bergey's manual of systematic bacteriology. The proteobacteria, part B, the gammaproteobacteria. Vol. 2 / ed. by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity. — 2nd ed. — Springer East Lansing, MI, 2005. — 1106 p.

32. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species / M. Kilian // Microbiology. — 1976. — Vol. 93, no. 1. — P. 9–62.

33. White D. C. Hemin biosynthesis in *Haemophilus* / D. C. White, S. Granick // Journal of Bacteriology. — 1963. — Vol. 85, no. 4. — P. 842–850.

34. Evans N. M. Haemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* / N. M. Evans, D. D. Smith, A. J. Wicken // Journal of Medical Microbiology. — 1974. — Vol. 7, no. 3. — P. 359–365.

35. Gilder H. Studies on the hemophilus group of organisms quantitative aspects of growth on various porphin compounds / H. Gilder, S. Granick // *The Journal of General Physiology*. — 1947. — Vol. 31, no. 2. — P. 103–117.
36. O'Reilly T. Defining the metabolic and growth responses of porcine haemophili to exogenous pyridine nucleotides and precursors / T. O'Reilly, D. F. Niven // *Microbiology*. — 1986. — Vol. 132, no. 3. — P. 807–818.
37. Приказ Минздрава СССР от 22.04.85 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». — М., 1985.
38. Artman M. Nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate splitting enzyme(s) of sheep and rabbit erythrocytes: their effect on the growth of *Haemophilus* / M. Artman, G. Frankl // *Canadian Journal of Microbiology*. — 1982. — Vol. 28, no. 6. — P. 696–702.
39. Krumwiede E. A growth inhibitory substance for the influenza group of organisms in the blood of various animal species the use of the blood of various animals as a selective medium for the detection of hemolytic streptococci in throat cultures / E. Krumwiede, A. G. Kuttner // *The Journal of Experimental Medicine*. — 1938. — Vol. 67, no. 3. — P. 429–441.
40. Kent S. S. S. The Nutrition of Bacteria, with Special Reference to *Bacillus Influenzae* (Pfeiffer) / S. S. S. Kent // *Journal of Hygiene*. — 1923. — Vol. 22, no. 1. — P. 52–68.
41. Williams A. W. Growth of *B. Influenzae* without the presence of hemoglobin / A. W. Williams, O. R. Povitzky // *The Journal of Medical Research*. — 1921. — Vol. 42, no. 4. — P. 405–417.
42. Holt L. B. The Growth-factor Requirements of *Haemophilus influenzae* / L. B. Holt // *Journal of General Microbiology*. — 1961. — No. 27. — P. 317–322.
43. Bergey's manual of systematic bacteriology. The Firmicutes. Vol. 3 / ed. by P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. B. Whitman. — 2nd ed. — Springer, 2009. — 1422 p.

44. Костюкова Н. Н. Биологические свойства и распространенность *Streptococcus pneumoniae* / Н. Н. Костюкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1981. — № 12. — С. 9–16.
45. Mellroth, P. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan / P. Mellroth, R. Daniels, A. Eberhardt, D. Rönnlund, H. Blom, J. Widengren, S. Normark, B. Henriques-Normark // Journal of Biological Chemistry. — 2012. — Vol. 287, no. 14. — P. 11018–11029.
46. Kietzman, C. C. Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium / C. C. Kietzman, G. Gao, B. Mann, L. Myers, E. I. Tuomanen // Nature Communications. — 2016. — Vol. 7. — P. 1–9.
47. *Streptococcus pneumoniae*: Molecular Mechanisms of Host-pathogen Interactions / ed. by J. Brown, S. Hammerschmidt, C. Orihuela. — Academic Press, 2015.
48. Pericone, C. D. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract / C. D. Pericone, K. Overweg, P. W. Hermans, J. N. Weiser // Infection and Immunity. — 2000. — Vol. 68, no. 7. — P. 3990–3997.
49. Park B. Role of *Staphylococcus aureus* catalase in niche competition against *Streptococcus pneumoniae* / B. Park, V. Nizet, G. Y. Liu // Journal of Bacteriology. — 2008. — Vol. 190, no. 7. — P. 2275–2278.
50. Johnson M. K. Isolation and characterization of pneumolysin-negative mutants of *Streptococcus pneumoniae* / M. K. Johnson, D. Hamon, G. K. Drew // Infection and Immunity. — 1982. — Vol. 37, no. 2. — P. 837–839.
51. Barnard J. P. The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. / J. P. Barnard, M. W. Stinson // Infection and Immunity. — 1996. — Vol. 64, no. 9. — P. 3853–3857.
52. Kanclerski K. Production and purification of *Streptococcus pneumoniae* hemolysin (pneumolysin) / K. Kanclerski, R. Möllby // Journal of Clinical Microbiology. — 1987. — Vol. 25, no. 2. — P. 222–225.
53. Lorian V. Pneumococci producing beta hemolysis on agar / V. Lorian, B. Popoola // Applied Microbiology. — 1972. — Vol. 24, no. 1. — P. 44–47.

54. Kempner W. Effect of CO<sub>2</sub> on the growth rate of the pneumococcus / W. Kempner, C. Schlayer // *Journal of Bacteriology*. — 1942. — Vol. 43, no. 3. — P. 387–396.
55. Austrian R. Importance of carbon dioxide in the isolation of pneumococci / R. Austrian, P. Collins // *Journal of Bacteriology*. — 1966. — Vol. 92, no. 5. — P. 1281–1284.
56. Burghout, P. *Streptococcus pneumoniae* folate biosynthesis responds to environmental CO<sub>2</sub> levels / P. Burghout, A. Zomer, C. E. van der Gaast-de, E. M. Janssen-Megens, K.-J. Françoijis, H. G. Stunnenberg, P. W. Hermans, [et al.] // *Journal of Bacteriology*. — 2013. — Vol. 195, no. 7. — P. 1573–1582.
57. Козлов Р. С. Пневмококки: уроки прошлого — взгляд в будущее / Р. С. Козлов. — Смоленск : МАКМАХ, 2010. — 128 с.
58. Краева Л. А. Микробиологическая диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов / Л. А. Краева // *Инфекция и иммунитет*. — 2011. — Т. 1, № 1. — С. 51–58.
59. Приказ Минздрава РФ от 23.12.98 г. N 375 «О мерах по усилению эпидемиологического надзора и профилактики менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов». — М., 1998.
60. Bahr N. C. Methods of rapid diagnosis for the etiology of meningitis in adults / N. C. Bahr, D. R. Boulware // *Biomarkers*. — 2014. — Vol. 8, no. 9. — P. 1085–1103.
61. La Scolea L. J. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. / L. J. La Scolea, D. Dryja // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1984. — Vol. 19, no. 2. — P. 187–190.
62. Utility of latex agglutination test (LAT) in detecting acute bacterial meningitis against culture as gold standard / R. Jyothi, J. T. R. Bai, [et al.] // *Journal of The Academy of Clinical Microbiologists*. — 2015. — Vol. 17, no. 2. — P. 84–88.
63. Hmood B. A. Comparison between Gram s stain, culture, Real–time PCR for diagnosis of *Neisseria meningitidis* in CSF Cases / B. A. Hmood, A. N. Hussein, L. F. Manher // *International Journal of Advanced Research*. — 2015. — Vol. 3, no. 5. — P. 658–664.

64. Wu, H. M. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis [Электронный ресурс] / H. M. Wu [и др.] // BMC Infectious Diseases. — 2013. — Т. 13, № 1. — С. 26. — Режим доступа: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-26> (дата обр. 22.11.2016).

65. Hanson K. E. The First Fully Automated Molecular Diagnostic Panel for Meningitis and Encephalitis: How Well Does It Perform, and When Should It Be Used? / K. E. Hanson // Journal of Clinical Microbiology. — 2016. — Vol. 54, no. 9. — P. 2222–2224.

66. МУ 3.1.2.2516-09. Методические указания. Эпидемиологический надзор за менингококковой инфекцией. — М., 2009.

67. Difco & BBL manual: manual of microbiological culture media / ed. by M. J. Zimbro, D. A. Power, S. M. Miller, G. E. Wilson, J. A. Johnson. — 2nd ed. — BD Diagnostic Systems, 2009.

68. Casman E. A noninfusion blood agar base for neisseriae, pneumococci and streptococci / E. Casman // American Journal of Clinical Pathology. — 1947. — Vol. 17, no. 4. — P. 281–289.

69. Marshall J. H. A standard culture medium for general bacteriology / J. H. Marshall, J. C. Kelsey // Journal of Hygiene. — 1960. — Vol. 58, no. 04. — P. 367–372.

70. Вишнякова, Л. А. Питательная среда для выделения и культивирования пневмококка и гемофильных палочек / Л. А. Вишнякова, М. В. Герасимова, М. Е. Фаустова, М. Г. Васильева, О. Т. Джаракьян // Лабораторное дело. — 1981. — № 1. — С. 38–41.

71. Боронина Л. Г. Микробиологические аспекты инфекцией, вызванных *Haemophilus influenzae*, у детей : автореф. дис. ... доктора мед. наук : 03.00.07 / Л. Г. Боронина. — СПб, 2007. — 38 с.

72. Костюкова, Н. Н. Сухой казеиново-дрожжевой агар для выделения и идентификации менингококка / Н. Н. Костюкова, А. Г. Гаджиева, Р. О. Алиева, В. М. Татарников, В. А. Полянин, Б. Г. Хайкина, Т. В. Егорова // Лабораторное дело. — 1980. — № 9. — С. 551–553.



73. Gratten, M. Comparison of goat and horse blood as culture medium supplements for isolation and identification of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* from upper respiratory tract secretions / M. Gratten, D. Battistutta, P. Torzillo, J. Dixon, K. Manning // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1994. — Vol. 32, no. 11. — P. 2871–2872.

74. Anand, C. Pig and goat blood as substitutes for sheep blood in blood-supplemented agar media / C. Anand, R. Gordon, H. Shaw, K. Fonseca, M. Olsen // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2000. — Vol. 38, no. 2. — P. 591–594.

75. Feinsod F. M. Goat blood agar / F. M. Feinsod, C. H. Kim // *Tropical Doctor*. — 1986. — No. 16. — P. 117–119.

76. Russell, F. M. As a bacterial culture medium, citrated sheep blood agar is a practical alternative to citrated human blood agar in laboratories of developing countries / F. M. Russell, S. S. N. Biribo, G. Selvaraj, F. Oppedisano, S. Warren, A. Seduadua, E. K. Mulholland, J. R. Carapetis // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2006. — Vol. 44, no. 9. — P. 3346–3351.

77. Yeh, E. Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests / E. Yeh, B. A. Pinsky, N. Banaei, E. J. Baron // *PloS one*. — 2009. — Vol. 4, no. 7. — e6141.

78. Satzke, C. Comparison of Citrated Human Blood, Citrated Sheep Blood, and Defibrinated Sheep Blood Mueller-Hinton Agar Preparations for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Streptococcus pneumoniae* Isolates / C. Satzke, A. Seduadua, R. Chandra, J. R. Carapetis, E. K. Mulholland, F. M. Russell // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2010. — Vol. 48, no. 10. — P. 3770–3772.

79. Fildes P. A new medium for the growth of *B. influenzae* / P. Fildes // *British Journal of Experimental Pathology*. — 1920. — Vol. 1, no. 2. — P. 129.

80. Vastine, D. W. Comparison of media for the isolation of *Haemophilus* species from cases of seasonal conjunctivitis associated with severe endemic trachoma / D. W. Vastine, C. R. Dawson, I. Hoshiwara, C. Yoneda, T. Daghfous, M. Messadi // *Applied Microbiology*. — 1974. — Vol. 28, no. 4. — P. 688–690.

81. Набор для приготовления шоколадного агара [Электронный ресурс] / HiMedia. — Режим доступа: <http://www.himedialabs.ru/sm103h> (дата обр. 17.11.2016).

82. Chocolate agar [Электронный ресурс] / ThermoFisher scientific. — Режим доступа: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/IFU1300.pdf> (дата обр. 17.11.2016).

83. Faur Y. C. Isolation of *Neisseria meningitidis* from the genito-urinary tract and anal canal / Y. C. Faur, M. H. Weisburd, M. E. Wilson // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1975. — Vol. 2, no. 3. — P. 178–182.

84. NYC medium: Medium for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* [Электронный ресурс] / Life Technologies. — Режим доступа: <http://www.lifetechindia.com/pdf/DD005.pdf> (дата обр. 17.11.2016).

85. Мирскова, А. Н. Стимуляторы роста менингококка для диагностики менингита на основе солей 2-гидроксиалкиламинов / А. Н. Мирскова, С. Н. Адамович, Е. Я. Виноградов, Р. Г. Мирсков // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. — 2012. — Т. 5 (87). — С. 276–280.

86. Питательная среда для выделения *Haemophilus influenzae* : пат. 1333711 СССР : МПК С 12 Q 1/04, С 12 R 1:21 / А. Г. Гаджиева, Р. О. Алиева ; заявитель науч.-ислед. ин-т по производству питательных сред г. Махачкала. — № 3785873/28–13 ; заявл. 05.07.84 ; опубл. 30.08.87, Бюл. № 32.

87. Винник А. Л. Питательная среда для выделения и культивирования пневмококка / А. Л. Винник, А. К. Варгина, З. И. Ершова // *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. — 1985. — № 8. — С. 19–22.

88. Питательная среда для выращивания бактерий рода *Haemophilus* : пат. 2320714 Рос. Федерация : МПК С12N 1/20, С12R 1/21 (2006.01) / Л. С. Черкасова, И. М. Грубер, В. А. Мельникова, Г. П. Адлова ; заявитель и патентообладатель науч.-ислед. ин-т вакцин и сывороток, Биомед им. И.И. Мечникова. — № 2006117419/13 ; заявл. 23.05.2006 ; опубл. 27.03.2008, Бюл. № 9.

89. Черкасова Л. С. Конструирование питательных сред для выделения бактерий рода *Haemophilus* и *Neisseria meningitidis* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Л. С. Черкасова. — М., 2008. — 25 с.

90. Домотенко, Л. В. Питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов / Л. В. Домотенко, Я. В. Подкопаев, Т. П. Морозова, М. В. Храмов // *Мат. 3-й российской науч.-практич. конф.: Актуальные проблемы бактериальных и вирусных менингитов*. — Москва, 2012. — С. 21–22.

91. Herriott, R. M. Defined medium for growth of *Haemophilus influenzae* / R. M. Herriott, E. Y. Meyer, M. Vogt, M. Modan // *Journal of Bacteriology*. — 1970. — Vol. 101, no. 2. — P. 513–516.
92. Klein R. D. Simplified media for the growth of *Haemophilus influenzae* from clinical and normal flora sources / R. D. Klein, G. H. Luginbuhl // *Microbiology*. — 1979. — Vol. 113, no. 2. — P. 409–411.
93. Coleman, H. N. Chemically defined media for growth of *Haemophilus influenzae* strains / H. N. Coleman, D. A. Daines, J. Jarisch, A. L. Smith // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2003. — Vol. 41, no. 9. — P. 4408–4410.
94. Kenny, C. P. A chemically defined protein-free liquid medium for the cultivation of some species of *Neisseria* / C. P. Kenny, F. E. Ashton, B. B. Diena, L. Greenberg // *Bulletin of the World Health Organization*. — 1967. — Vol. 37, no. 4. — P. 569.
95. Catlin B. W. A defined agar medium for genetic transformation of *Neisseria meningitidis* / B. W. Catlin, G. M. Schloer // *Journal of Bacteriology*. — 1962. — Vol. 83, no. 3. — P. 470–474.
96. Archibald F. S. Iron in *Neisseria meningitidis*: minimum requirements, effects of limitation, and characteristics of uptake / F. S. Archibald, I. W. DeVoe // *Journal of Bacteriology*. — 1978. — Vol. 136, no. 1. — P. 35–48.
97. Rane L. Nutritional requirements of the pneumococcus: I. growth factors for types I, II, V, VII, VIII / L. Rane, Y. Subbarow // *Journal of Bacteriology*. — 1940. — Vol. 40, no. 5. — P. 695.
98. Hoeplich P. D. Evaluation of an improved chemically defined medium for the culture of *Diplococcus pneumoniae* / P. D. Hoeplich // *Journal of Bacteriology*. — 1957. — Vol. 74, no. 5. — P. 587.
99. Rappaport H. P. Defined medium for growth of two transformable strains of *Diplococcus pneumoniae* / H. P. Rappaport, W. R. Guild // *Journal of Bacteriology*. — 1959. — Vol. 78, no. 2. — P. 203–205.
100. Sicard A. M. A new synthetic medium for *Diplococcus pneumoniae*, and its use for the study of reciprocal transformations at the *amiA* locus / A. M. Sicard // *Genetics*. — 1964. — Vol. 50, no. 1. — P. 31.

101. Carvalho S. M. Environmental and nutritional factors that affect growth and metabolism of the pneumococcal serotype 2 strain D39 and its nonencapsulated derivative strain R6 / S. M. Carvalho, O. P. Kuipers, A. R. Neves // *PloS one*. — 2013. — Vol. 8, no. 3. — e58492.

102. Hovig B. A selective method for the isolation of *Haemophilus* in material from the respiratory tract / B. Hovig, E. H. Aandahl // *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. — 1969. — Vol. 77, no. 4. — P. 676–684.

103. Nye, K. J. A comparison of the performance of bacitracin-incorporated chocolate blood agar with chocolate blood agar plus a bacitracin disk in the isolation of *Haemophilus influenzae* from sputum / K. J. Nye, D. Fallon, B. Gee, S. Howe, S. Messer, T. Turner, R. E. Warren, N. Andrews // *Journal of Medical Microbiology*. — 2001. — Vol. 50, no. 5. — P. 472–475.

104. Chapin K. Selective media for recovery of *Haemophilus influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. / K. Chapin, G. Doern // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1983. — Vol. 17, no. 6. — P. 1163–1165.

105. Thayer J. D. A selective medium for the cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis* / J. D. Thayer, J. E. Martin Jr // *Public Health Reports*. — 1964. — Vol. 79, no. 1. — P. 49–57.

106. Thayer J. D. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis* / J. D. Thayer, J. E. Martin Jr // *Public Health Reports*. — 1966. — Vol. 81, no. 6. — P. 559–562.

107. Черкасова, Л. С. Питательная среда для выделения *Neisseria meningitidis* / Л. С. Черкасова, И. С. Королева, И. М. Грубер, В. А. Мельникова, О. М. Кузьменко // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2008. — № 1. — С. 69–71.

108. Schmid R. E. Gentamicin-blood agar for isolation of *Streptococcus pneumoniae* from respiratory secretions / R. E. Schmid, J. A. Washington, J. P. Anhalt // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1978. — Vol. 7, no. 5. — P. 426–427.

109. Nichols T. A new selective medium for *Streptococcus pneumoniae* / T. Nichols, R. Freeman // *Journal of Clinical Pathology*. — 1980. — Vol. 33, no. 8. — P. 770–773.

110. Dunne W. M. Comparison of selective broth medium plus neomycin-nalidixic acid agar and selective broth medium plus Columbia colistin-nalidixic acid agar for detection of group B streptococcal colonization in women / W. M. Dunne // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1999. — Vol. 37, no. 11. — P. 3705–3706.

111. Facklam R. R. A review of the microbiological techniques for the isolation and identification of streptococci / R. R. Facklam // *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. — 1976. — Vol. 6, no. 4. — P. 287–317.

112. МУК 4.2.2316–08. Методические указания. Методы контроля бактериологических питательных сред. — М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 67 с.

113. Воробьев А. А. Медицинская и санитарная микробиология: Учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов. — М : Академия, 2003. — 464 с.

114. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. — М : Медицина, 1978. — 394 с.

115. Анализатор БакТрак 4300, версия V1.03: руководство пользователя. — SY-LAB Instruments GmbH, 2002. — 74 с.

116. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации [Электронный ресурс]. — Версия-2015-02. — 2015. — 162 с. — Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf> (дата обр. 26.08.2016).

117. Zdolec, N. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese / N. Zdolec, I. Filipović, Ž. Cvrtila Fleck, A. Marić, D. Jankuloski, L. Kozačinski, B. Njari // *Veterinarski Arhiv*. — 2011. — Vol. 81, no. 1. — P. 133–141.

118. ГОСТ 26185-84. Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа. — М : Стандартинформ, 2010.

119. Сроки годности лекарственных средств: Общая фармакопейная статья ОФС.1.1.0009.15. — М : Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015.

120. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Электронный ресурс] / R Core Team ; R Foundation for Statistical Computing. — Vienna, Austria, 2015. — Режим доступа: <https://www.R-project.org> (дата обр. 26.08.2016).

121. Артюхин В. И. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред: Производство и применение продуктов микробиологических производств: Обзорн. информ. / В. И. Артюхин, А. П. Шепелин, Н. В. Киселева. — М : ВНИИЭСЭНТИ Минмедпрома СССР, 1990. — 52 с.

122. Использование метода измерения электрического сопротивления (импеданса) для санитарно-бактериологического исследования объектов окружающей среды. Методические рекомендации. — М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора минздрава России, 2005. — 59 с.

123. Ur A. Impedance monitoring of bacterial activity / A. Ur, D. F. J. Brown // *Journal of Medical Microbiology*. — 1975. — Vol. 8, no. 1. — P. 19–28.

124. Dziuba M. A study of the nutritional requirements of a selected *Haemophilus ducreyi* strain by impedance and conventional methods / M. Dziuba, P. A. Noble, W. L. Albritton // *Current Microbiology*. — 1993. — Vol. 27, no. 2. — P. 109–113.

125. Morandi, S. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* / S. Morandi, M. Brasca, P. Alfieri, R. Lodi, A. Tamburini // *Le Lait*. — 2005. — Vol. 85, no. 3. — P. 181–192.

126. Шепелин А. П. Отечественная питательная среда — коринебакагар для выделения возбудителя дифтерии / А. П. Шепелин // *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. — 2012. — № 4. — С. 109–111.

127. Шепелин, А. П. Сравнительная характеристика питательных сред для выделения коринебактерий / А. П. Шепелин, О. В. Полосенко, О. Ю. Борисова, А. С. Пименова, Н. Т. Гадуа // *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2016. — № 1. — С. 59–65.

**ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ****В изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. **Подкопаев, Я. В.** Отечественные питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов / Я. В. Подкопаев, Л. В. Домотенко, Т. П. Морозова, М. В. Храмов, А. П. Шепелин // Клиническая лабораторная диагностика. — 2015. — № 5. — С. 59–64.

2. **Подкопаев, Я. В.** Сравнительная оценка питательных сред для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов / Я. В. Подкопаев, Л. В. Домотенко, А. Н. Круглов, И. В. Рябченко, К. В. Детушев, Т. П. Морозова, А. П. Шепелин // Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6, № 4. — С. 389–394.

**Патент на изобретение:**

3. Питательная среда для культивирования и выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая (варианты) : пат. 2471865 Рос. Федерация : МПК С12N 1/20 (2006.01) / **Я. В. Подкопаев**, Т. П. Морозова, Л. В. Домотенко, Н. А. Акимова, М. В. Храмов ; заявитель и патентообладатель гос. нуч. центр прикладной микробиологии и биотехнологии. — № 2011137669/10; заявл. 14.09.2011 ; опубл. 10.01.2013 Бюл. № 1.

**В других изданиях:**

4. Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов. Методические рекомендации / И. А. Дятлов, **Я. В. Подкопаев**, Л. В. Домотенко, Т. П. Морозова, М. В. Храмов, Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова, Н. А. Кошкина. — М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. — 11 с.

5. Дятлов И.А. Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у возбудителя внутрибольничных инфекций / И. А. Дятлов, Е. В. Детушева, И. П. Мицевич, К. В. Детушев, **Я. В. Подкопаев**, Н. К. Фурсова // Бактериология. — 2017. — Т. 2, № 2. — С. 48–58.

### В сборниках трудов конференций:

6. **Подкопаев, Я. В.** Универсальная питательная среда для диагностики гнойных бактериальных менингитов / Я. В. Подкопаев, Т. П. Морозова, Л. В. Домотенко, М. В. Храмов // мат. международной конф.: развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями / под ред. А. Б. Жербун. — ФГУН НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора. Спб., 2010. — С. 70—71.

7. **Подкопаев, Я. В.** Разработка универсальной питательной среды для выявления возбудителей гнойных бактериальных менингитов / Я. В. Подкопаев, Т. П. Морозова, Л. В. Домотенко, М. В. Храмов // мат. науч.-практ. школы-конф. молодых ученых и специалистов науч.-исслед. организаций Роспотребнадзора: современные технологии обеспечения биологической безопасности / под ред. Г. Г. Онищенко, И. А. Дятлов. — Протвино : А-ПРИНТ, 2010. — С. 193—195.

8. **Подкопаев, Я. В.** Гемофилус агар питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки / Я. В. Подкопаев, Л. В. Домотенко, Т. П. Морозова, И. С. Косилова, М. В. Храмов // Мат. III ежегод. всероссийского конгресса по инфекционным болезням. — Москва, 2011. — С. 291.

9. Домотенко, Л. В. Питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов / Л. В. Домотенко, **Я. В. Подкопаев**, Т. П. Морозова, М. В. Храмов // Мат. 3-й российской науч.-практич. конф.: Актуальные проблемы бактериальных и вирусных менингитов. — Москва, 2012. — С. 21—22.

10. **Подкопаев, Я. В.** Сравнение роста гемофильной палочки на различных питательных средах / Я. В. Подкопаев, Л. В. Домотенко, Т. П. Морозова, М. В. Храмов // Мат. 3-й российской науч.-практич. конф.: Актуальные проблемы бактериальных и вирусных менингитов. — Москва, 2012. — С. 39—40.

11. **Подкопаев, Я. В.** Разработка питательной среды для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов / Я. В. Подкопаев, Л. В. Домотенко, Т. П. Морозова, М. В. Храмов, А. П. Шепелин // Мат. IV ежегод. всероссийского конгресса по инфекционным болезням. — Москва, 2012. — С. 302.

12. Морозова, Т. П. Коммерческие питательные среды для лабораторной диагностики гнойных бактериальных менингитов / Т. П. Морозова, **Я. В. Подкопаев**, Л. В. Домотенко, Н. А. Акимова, М. В. Храмов // Журнал инфектологии. Приложение. — 2012. — Т. 4, № 4. — С. 94.

13. Герасимов, В. Н. Оценка качества бактериальных клеток и биомассы *H. influenzae* методом электронной микроскопии / В. Н. Герасимов, **Я. В. Подко-**



**паев**, Е. А. Голов, Ю. В. Герасимова, С. А. Котов, Л. В. Домотенко, М. В. Храмов // Мат. VI ежегод. всероссийского конгресса по инфекционным болезням. — Москва, 2014. — С. 302.

14. Домотенко, Л. В. Проблемы и перспективы использования питательных сред в диагностике бактериальных менингитов / Л. В. Домотенко, **Я. В. Подкопаев**, Т. П. Морозова, Н. А. Акимова, М. В. Храмов, А. П. Шепелин // Проблемы медицинской микологии. — 2014. — Т. 16, № 2. — С. 64.

15. **Подкопаев, Я. В.** Использование кондуктометрического метода в разработке питательных сред / Я. В. Подкопаев, Л. В. Домотенко, М. В. Храмов, А. П. Шепелин // Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6, № 3. — С. 284.

## СПИСОК РИСУНКОВ

3.1	Кривые изменения импеданса при культивировании <i>H. influenzae</i> АТСС 49247 на экспериментальных вариантах питательных сред . . . . .	52
3.2	Кривые изменения импеданса при культивировании <i>H. influenzae</i> АТСС 49247 на средах с различной концентрацией ЭПД . . . . .	52
3.3	Кривые изменения импеданса при культивировании <i>S. pneumoniae</i> АТСС 6305 на экспериментальных вариантах питательных сред . . . . .	53
3.4	Кривые изменения импеданса при культивировании <i>S. pneumoniae</i> АТСС 6305 на средах с различной концентрацией ЭПД . . . . .	53
3.5	Графики зависимости количества и размеров колоний основных возбудителей ГБМ на различных плотных питательных средах через 18 ч . . . . .	54
3.6	Графики зависимости диаметра колоний <i>H. influenzae</i> от концентрации гемина и СРГМ в экспериментальных вариантах питательной среды через 24 ч . . . . .	56
3.7	График зависимости диаметра колоний <i>H. influenzae</i> 423 от концентрации в питательной среде различных серий АПД через 24 ч . . . . .	58
3.8	Диапазоны размеров колоний на средах с различными добавками через 18 ч . . . . .	64
3.9	Изменение цвета среды в зоне роста <i>S. pneumoniae</i> при культивировании: а) на среде, содержащей смесь СРГМ и гемоглобина; б) на среде, содержащей 12 г/л СРГМ . . . . .	65
3.10	Реакция ПЦР с праймерами G1 и L1 . . . . .	76
3.11	Реакция ПЦР с праймерами ERIC 1 и ERIC 2 . . . . .	76
3.12	Реакция RAPD-PCR со случайным праймером ОРА 11 . . . . .	77
4.1	Питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению (Гемофилус агар) . . . . .	94

4.2	Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению (Шоколадный агар) . . . . .	94
4.3	Питательная среда для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая (ГБМ-агар) . . . . .	95
5.1	Графики зависимости количества и размеров колоний <i>N. influenzae</i> на различных питательных средах при посеве из разведения $10^{-6}$ через 18 ч . . . . .	98
5.2	Графики зависимости количества и размеров колоний <i>N. meningitidis</i> на различных питательных средах при посеве из разведения $10^{-6}$ через 18 ч . . . . .	99
5.3	Графики зависимости количества и размеров колоний <i>S. pneumoniae</i> на различных питательных средах при посеве из разведения $10^{-5}$ через 18 ч . . . . .	100
A.1	Электронно-микроскопическое изображение негативно контрастированных клеток при увеличении $\times 15000$ : а) <i>N. influenzae</i> ATCC 9006; б) <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305 . . . . .	134
A.2	Ультратонкие срезы <i>N. influenzae</i> ATCC 9006 при увеличении $\times 22500$ , выращенных на: а) Гемофилус агаре; б) ГБМ-агаре; в) Шоколадном агаре; г) шоколадном агаре Becton Dickinson . . . . .	134
A.3	Ультратонкие срезы <i>N. meningitidis</i> ATCC 13102 при увеличении $\times 22500$ , выращенных на: а) ГБМ-агаре; б) Шоколадном агаре; в) Менингоагаре; г) шоколадном агаре Becton Dickinson . . . . .	135
A.4	Ультратонкие срезы <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305 при увеличении $\times 22500$ , выращенных на: а) ГБМ-агаре; б) Шоколадном агаре; в) шоколадном агаре Becton Dickinson; г) кровяном агаре на основе триптиказо-соевого агара . . . . .	135
B.1	Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/11118 . . . . .	136
B.2	Регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13081 . . . . .	137

Б.3	Приложение к регистрационному удостоверению № ФСР 2012/13081 . . . . .	138
Б.4	Регистрационное удостоверения № РЗН 2016/4872 от 07.10.2016 г.	139
Б.5	Приложение к регистрационному удостоверению № РЗН 2016/4872 от 07.10.2016 г. . . . .	140

## СПИСОК ТАБЛИЦ

1.1	Состав ростовых добавок для шоколадного агара различных производителей . . . . .	25
3.1	Физико-химические показатели белковых гидролизатов производства ФБУН ГНЦ ПМБ . . . . .	48
3.2	Наличие роста <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> и <i>S. pneumoniae</i> на экспериментальных вариантах питательных сред с различными гидролизатами через 24 ч и 48 ч культивирования . . . . .	48
3.3	Физико-химические показатели серий автолизатов пекарских дрожжей, использованных в исследовании . . . . .	57
3.4	Влияние рН ПГК и СРГМ на рН питательной среды . . . . .	58
3.5	Селективные свойства питательной среды с различными концентрациями бацитрацина . . . . .	59
3.6	Исследование стабильности основных биологических свойств штаммов <i>H. influenzae</i> , выращенных на Гемофилус агаре через 24 ч	62
3.7	Размер и среднее количество колоний штаммов <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> и <i>S. pneumoniae</i> через 18 ч культивирования на различных средах . . . . .	70
3.8	Ингибирующие свойства разработанных питательных сред с селективными добавками . . . . .	71
4.1	Физико-химические показатели экспериментально-производственных серий сухой основы ГБМ-агара . . . . .	81
4.2	Физико-химические показатели экспериментально-производственных серий основы Гемофилус агара . . . . .	83
4.3	Физико-химические показатели экспериментально-производственных серий основы Шоколадного агара . . . . .	85
5.1	Результаты исследования клинических образцов при посеве на питательные среды без селективных добавок . . . . .	104
5.2	Результаты исследования клинических образцов при посеве на среды с селективными добавками . . . . .	106

## Приложение А

### Фотографии, полученные в результате электронно-микроскопического исследования

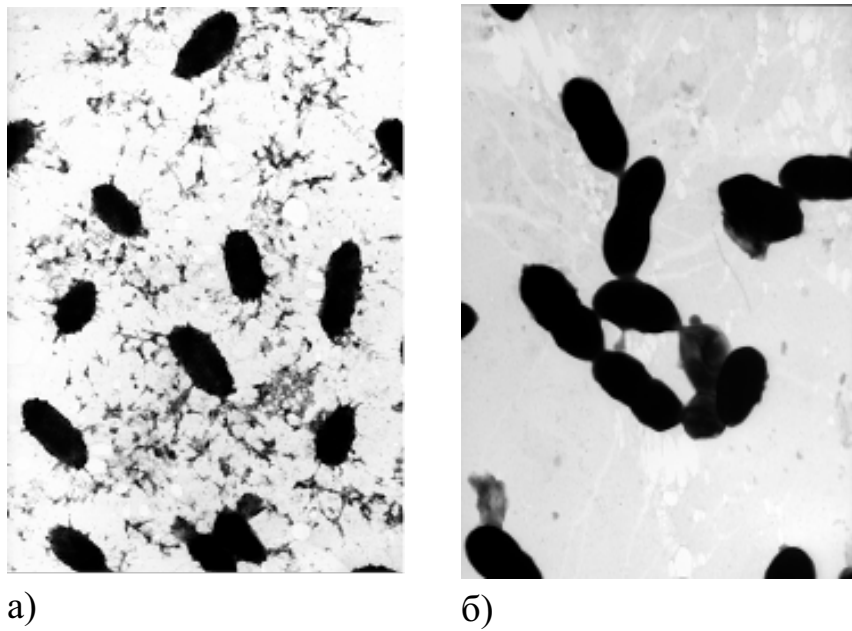


Рисунок А.1 — Электронно-микроскопическое изображение негативно контрастированных клеток при увеличении  $\times 15000$ : а) *H. influenzae* ATCC 9006; б) *S. pneumoniae* ATCC 6305

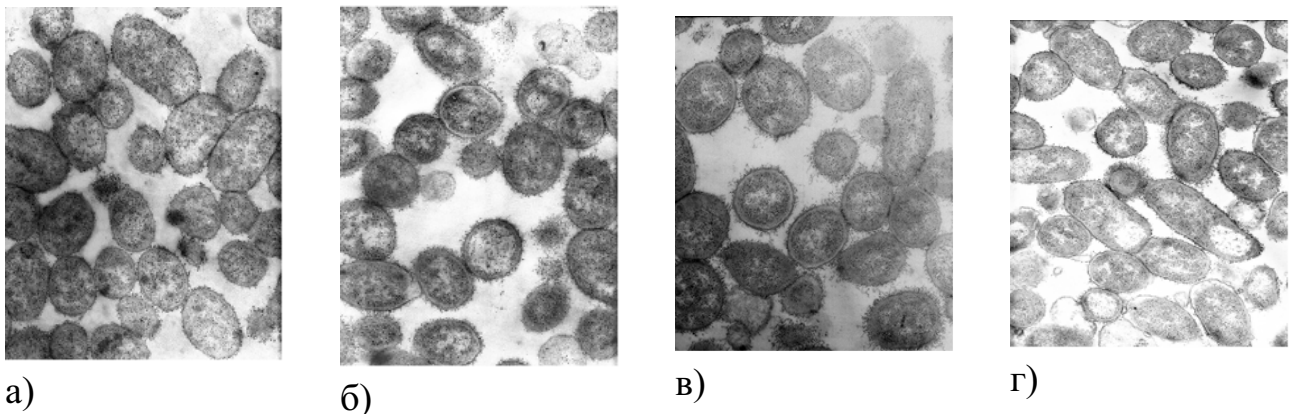


Рисунок А.2 — Ультратонкие срезы *H. influenzae* ATCC 9006 при увеличении  $\times 22500$ , выращенных на: а) Гемофилус агаре; б) ГБМ-агаре; в) Шоколадном агаре; г) шоколадном агаре Becton Dickinson

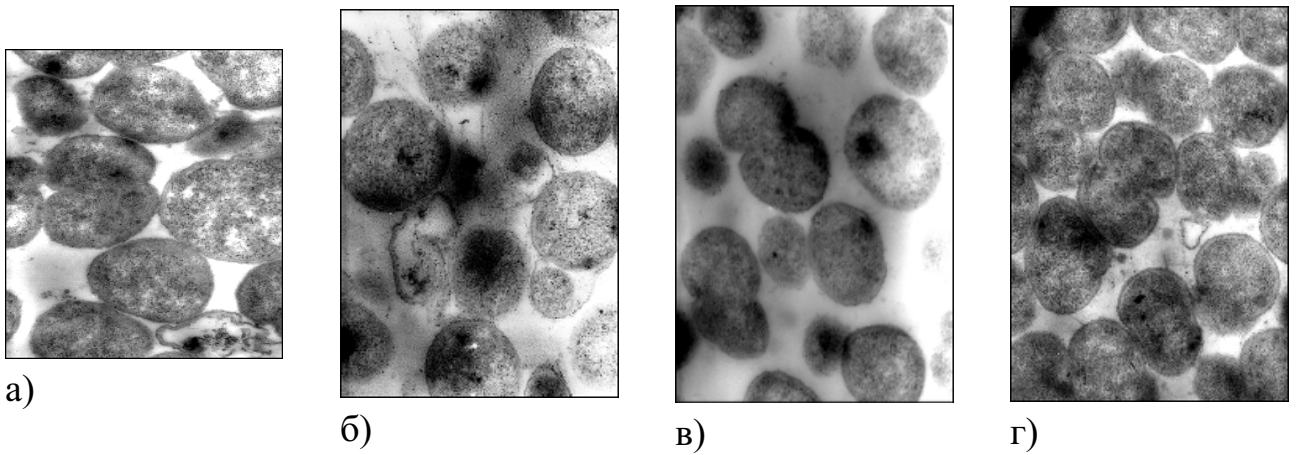


Рисунок А.3 – Ультратонкие срезы *N. meningitidis* ATCC 13102 при увеличении  $\times 22500$ , выращенных на: а) ГБМ-агаре; б) Шоколадном агаре; в) Менингоагаре; г) шоколадном агаре Becton Dickinson

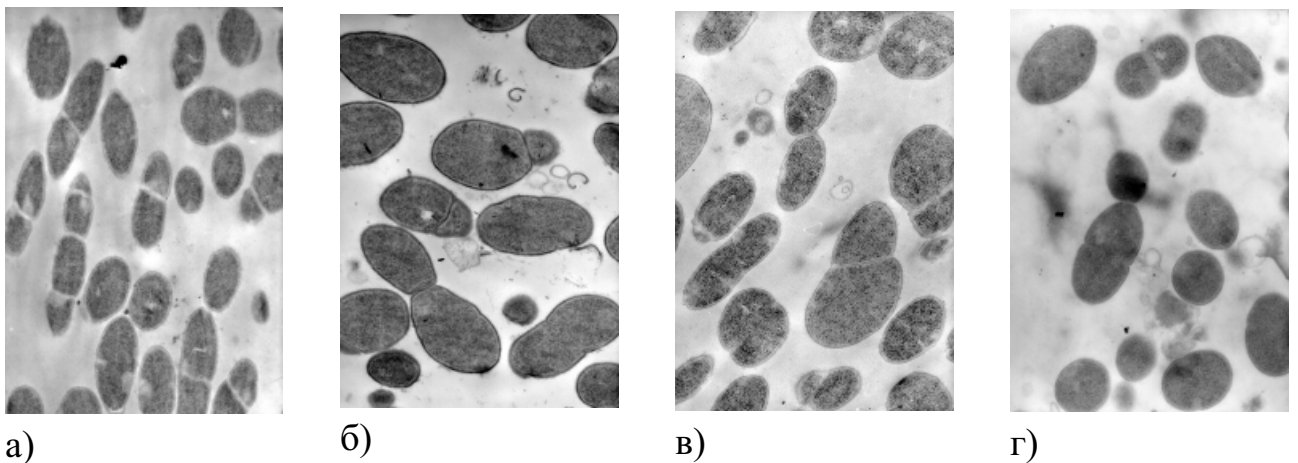


Рисунок А.4 – Ультратонкие срезы *S. pneumoniae* ATCC 6305 при увеличении  $\times 22500$ , выращенных на: а) ГБМ-агаре; б) Шоколадном агаре; в) шоколадном агаре Becton Dickinson; г) кровяном агаре на основе триптиказо-соевого агара

## Приложение Б

### Регистрационные удостоверения разработанных питательных сред





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ  
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**  
от 13 октября 2011 года № ФСР 2011/11118

На медицинское изделие  
**Набор реагентов для бактериологических исследований "Питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению" (ГЕМОФИЛУС АГАР) по ТУ 9398-121-78095326-2010**

Настоящее регистрационное удостоверение выдано  
**Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, (ФБУН ГНЦ ПМБ), Россия, 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск**

Производитель  
**Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, (ФБУН ГНЦ ПМБ), Россия, 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск**

Место производства медицинского изделия  
**142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск**

Номер регистрационного досье № 36345 от 08.09.2011

Вид медицинского изделия -

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 1

Код Общероссийского классификатора продукции для медицинского изделия 93 9816

приказом Росздравнадзора от 13 октября 2011 года № 6605-Пр/11  
и приказом от 29 февраля 2016 года № 1659 о замене  
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения  М.А. Мурашко

0017578

Рисунок Б.1 — Регистрационное удостоверения № ФСР 2011/11118





Рисунок Б.2 — Регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13081

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАРОВООХРАНЕНИЯ  
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

**ПРИЛОЖЕНИЕ  
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ**

№ ФСР 2012/13081 Лист 1

- готовая стерильная основа (Основа) - 4 бутылки,
- стерильная ростовая добавка (РД-ША) - 4 флакона,
- селективная добавка для выделения гемофильной палочки (СД-Г) - 1 флакон,
- селективная добавка для выделения пневмококков (СД-П) - 1 флакон,
- селективная добавка для выделения менингококков (СД-М) - 1 флакон.

*Handwritten signature*

Врио руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения  
и социального развития

10 февраля 2012 года

  
Д.В.Пархоменко

003039

Рисунок Б.3 — Приложение к регистрационному удостоверению  
№ ФСР 2012/13081



Рисунок Б.4 — Регистрационное удостоверение № РЗН 2016/4872  
от 07.10.2016 г.

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**ПРИЛОЖЕНИЕ  
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ  
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 07 октября 2016 года № РЗН 2016/4872

Лист 1

На медицинское изделие  
Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая» (ГБМ-агар) по ТУ 9398-203-78095326-2013, в составе:

1. Сухая основа питательной среды (Основа), 0,25 кг - 1 банка.
2. Ростовая добавка (РД), 5 флаконов - 1 коробка.
3. Инструкция по применению.
4. Паспорт.



Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения

  
М.А. Мурашко  
0026015

Рисунок Б.5 — Приложение к регистрационному удостоверению  
№ РЗН 2016/4872 от 07.10.2016 г.