

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)»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Оболенск—2017

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

кандидат химических наук **Домотенко Любовь Викторовна**

Научный консультант:

доктор биологических наук **Шепелин Анатолий Прокопьевич**

Официальные оппоненты:

Мионов Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, руководитель отдела микробиологии

Краева Людмила Александровна, доктор медицинский наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией медицинской бактериологии

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «_____» _____ 2018 г. на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета Д 350.002.01,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Гнойные бактериальные менингиты (ГБМ) — тяжелые инфекционные заболевания, основными этиологическими агентами которых являются *Neisseria meningitidis* (менингококк), *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) и *Haemophilus influenzae* (гемофильная палочка). Заболеваемость менингитом в последнее время во всем мире начала снижаться за счет введения специфической иммунопрофилактики, однако сохраняется высокая смертность, а многие больные остаются нетрудоспособными из-за несвоевременной диагностики болезни. Согласно данным Российского референс-центра по мониторингу за бактериальными менингитами более половины случаев ГБМ остаются нерасшифрованными (И.С. Королева, 2009; И.С. Королева, 2013).

Помимо ГБМ, *H. influenzae* и *S. pneumoniae* могут быть причиной и других инвазивных заболеваний: пневмония, артрит, эндокардит, остеомиелит, перикардит, целлюлит (Е. Я. Фролова, 2012; С. М. Харит, 2015).

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 (Т. М. Богданович, 2000; О. И. Кречикова, 2000; М. В. Абрамцева, 2014). 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 (С. М. Харит, 2015).

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 определение 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 (МУК 4.2.1887-04; М. С. Brouwer, 2010).

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 культивирования 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 (И. С. Королева, 2005). Ростовые свойства шоколадного агара напрямую зависят от соблюдения температурного режима приготовления среды, качества и типа используемой крови. Ряд иностранных фирм-производителей питательных сред осуществляют выпуск шоколадных агаров. 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. В 2015 г. несколькими фирмами налажено производство готового шоколадного агара в чашках Петри на основе сухих питательных сред иностранного производства, обогащенных гретой кровью.

В связи с этим является актуальной разработка питательных сред для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ из отечественных компонентов и 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*, 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 биологических показателей 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); 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. Методологической базой послужили работы отечественных и зарубежных исследователей по вопросам выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ. В работе использованы следующие методы исследования: культуральный (посев микроорганизмов на питательные среды); микроскопические (световая и электронная микроскопия); молекулярно-биологический (полимеразная цепная реакция); иммунологический (реакция латекс-агглютинации); кондуктометрический (определение изменения электрического импеданса в питательной среде в процессе роста микроорганизмов); оценки качества питательных сред по биологическим показателям (определение стабильности основных биологических свойств выращенных на них микроорганизмов, чувствительности питательных сред, скорости роста микроорганизмов, дифференцирующих и ингибирующих свойств питательных сред) и физико-химическим показателям (определение рН, массовой доли влаги и сухого остатка, содержания аминного азота, хлоридов, прочности студня, температуры и продолжительности плавления студня питательных сред).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены в виде докладов 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.

Работа выполнена в лаборатории разработки питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках отраслевых научно-исследовательских работ Роспотребнадзора НИР 061 «Разработка и внедрение технологий производства современных импортозамещающих и новых препаратов для диагностики инфекционных болезней» и НИР 040 «Конструирование состава и разработка технологии производства дифференциально-диагностических питательных сред на основе гидролизатов различной природы».

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка питательных сред

В процессе исследования использованы 57 штаммов микроорганизмов, находящихся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск», в коллекции Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и в коллекции Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора). Использованные штаммы относятся к 20 видам микроорганизмов, в том числе 18 штаммов *H. influenzae*, 7 — *N. meningitidis* и 7 — *S. pneumoniae*. В работе использовано 17 различных наименований питательных сред разных производителей. В качестве основной контрольной питательной среды использовали шоколадный агар на основе гонококкового агара (GC Medium Base, Becton Dickinson) с добавлением гемоглобина (Hemoglobin Bovine Freeze-Dried, Becton Dickinson) и смеси факторов роста (IsoVitalex Enrichment, Becton Dickinson) (далее в тексте — ША-BD).

Обзор литературы, представленный в главе 1 диссертации, показал, что для выделения и культивирования таких прихотливых микроорганизмов, как *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*, требуются питательные среды сложного состава, содержащие богатую белковую основу и факторы роста. В ходе анализа известных коммерческих питательных сред для выделения и культивирования микроорганизмов установлено, что наиболее часто в них используют белковые гидролизаты со степенью расщепления около 30 %, которые содержат около 3,7 % аминного азота. Среди гидролизатов, выпускаемых во ФБУН ГНЦ ПМБ, наиболее близкими характеристиками обладают панкреатический гидролизат казеина (ПГК) и панкреатический гидролизат рыбной муки. В результате сравнительных исследований ростовых свойств на моделях минимальной питательной среды, приготовленных с их использованием, выбран ПГК как наиболее оптимальный для культивирования всех трёх основных возбудителей ГБМ. Однако скорость роста исследованных штаммов микроорганизмов на питательной среде минимального состава, содержащей в качестве единственного источника питания ПГК, была невысокой: штаммы *H. influenzae* и *N. meningitidis* формировали мелкие колонии

диаметром от 0,2 до 0,6 мм через (42±6) ч культивирования, а *S. pneumoniae* — от 0,2 до 0,4 мм через (21±3) ч культивирования.

Дальнейшие эксперименты по обогащению белковой основы питательных сред пептоном из мяса и дрожжевым экстрактом (ЭПД) проводили кондуктометрическим методом, регистрируя изменение электрического импеданса питательных сред без агара в процессе культивирования микроорганизмов с помощью микробиологического анализатора «Бак Трак 4100» (SY-LAB Gerate GmbH). Использование этого метода позволяет проследить за динамикой метаболической активности микроорганизмов и сократить время и количество исследований. 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. Регистрация изменения импеданса происходит относительно исходного уровня сигнала, поэтому график изменения импеданса в процессе культивирования микроорганизмов в питательных средах имеет вид S-кривой и отражает кривую роста микроорганизмов в питательной среде. В процессе измерения на «Бак Трак 4100» в автоматическом режиме регистрируются и отображаются в виде отдельных графиков два значения импеданса: М-параметр (импеданс среды) и Е-параметр (импеданс вблизи электродов, или электродный импеданс).

В работе исследовано влияние концентраций ПГК (от 15 до 25 г/л), пептона (до 5 г/л) и ЭПД (до 5 г/л) на изменение импеданса в процессе культивирования тест-штаммов *H. influenzae* и *S. pneumoniae*. Воспроизводимые результаты для *H. influenzae* получены при измерении М-параметра, а для *S. pneumoniae* при измерении Е-параметра. Полученные графики имели вид S-кривых.

На рисунке 1 представлены характерные кривые изменения импеданса при культивировании *H. influenzae* и *S. pneumoniae* в средах различного состава. Анализ полученных графиков показал, что добавление в среду пептона и ЭПД в концентрациях 5,0 г/л приводило к сокращению времени начала экспоненциальной фазы роста кривых импедансного сигнала при культивировании *H. influenzae* и повышению его интенсивности в процессе роста *H. influenzae* и *S. pneumoniae*.

Традиционное культивирование исследованных микроорганизмов на агаризованных вариантах питательных сред аналогичного состава и регистрация количества и размера выросших колоний подтвердило полученные закономерности: добавление в среду минимального состава пептона и ЭПД приводило к увеличению

количества выросших колоний всех трёх основных возбудителей ГБМ приблизительно в 2,5 раза и формированию колоний *H. influenzae* диаметром $(0,9 \pm 0,1)$ мм, а *N. meningitidis* – $(0,65 \pm 0,15)$ мм. На основании этих данных в качестве белковой основы питательной среды выбрана смесь ПГК, ЭПД и пептона.

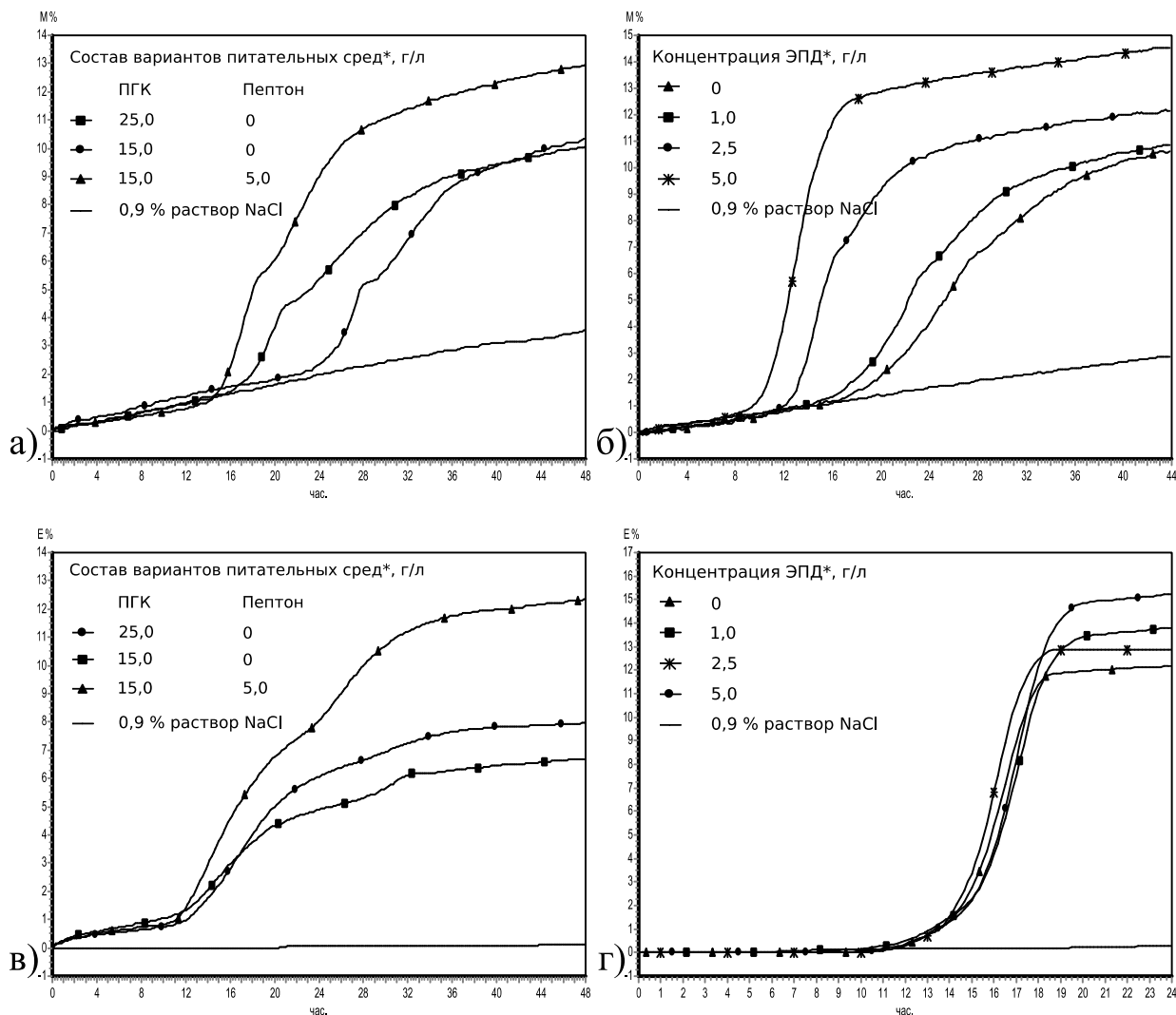


Рис. 1 Кривые изменения импеданса при культивировании *H. influenzae* (графики а, б) и *S. pneumoniae* (графики в, г). Помимо обозначенных компонентов питательные среды на графиках а, б, в, г содержат NaCl (1 г/л), глюкозу (1 г/л), гемин (10 мг/л), НАД (10 мг/л), на графиках б, г дополнительно ПГК (15 г/л)

Обязательными условиями для роста *H. influenzae* являются наличие в питательной среде факторов роста V и X в доступной для микроорганизма форме. В качестве источника фактора X при разработке питательной среды испытаны гемин, гемоглобин, черный альбумин и стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ) — ферментативный гидролизат сухой крови крупного рогатого скота. В ходе проведенных исследований выбран СРГМ, ранее не применявшийся для культивирования гемофильной палочки и пневмококка. Установлено, что наличие в питательной среде СРГМ в

концентрациях от 7,0 до 15,0 г/л полностью удовлетворяет потребность исследованных штаммов *H. influenzae* в факторе роста X.

В качестве источника фактора V испытывали кристаллический НАД в концентрациях от 0,1 до 10,0 мг/л и автолизат пекарских дрожжей (от 100 до 300 мл/л) лабораторного приготовления. В результате проведенных исследований установлено, что оба этих компонента могут быть использованы при культивировании гемофильной палочки, однако из-за нестандартности автолизата в окончательную пропись питательной среды включен только НАД в концентрации 1,0 мг/л.

Для придания питательной среде селективных свойств в отношении *H. influenzae* испытывали бацитрацин в концентрациях от 100 до 750 мг/л. Показано, что бацитрацин ни в одной из использованных концентраций не влиял на рост исследованных штаммов рода *Haemophilus*, а в концентрации 300 мг/л и выше полностью подавлял рост исследованных штаммов *S. pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* при посеве из всех полученных разведений и полностью подавлял рост штаммов *N. meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* и *Staphylococcus aureus* при посеве из разведений 10^{-3} и ниже.

Разработанная в результате исследования питательная среда названа Гемофилус агар. Среда состоит из следующих компонентов:

ПГК	15,0 г
СРГМ	12,0 г
ЭПД	5,0 г
Пептона	5,0 г
Калия фосфорнокислого однозамещенного	0,8 г
Натрия хлористого	1,0 г
Крахмала растворимого	1,0 г
Агара микробиологического	12,0±2,0 г
Бацитрацина	300 мг
НАД	1,0 мг
Воды дистиллированной	до 1,0 л

На разработанной питательной среде штаммы *H. influenzae* проявляют типичные культурально-морфологические и серологические свойства. Штаммы формируют через (21±3) ч культивирования типичные круглые слизистые полупрозрачные колонии сероватого цвета, не отличающиеся от колоний, выросших на контрольной среде ША-ВД. В мазках, окрашенных по Граму, выглядят в виде грамотрицательных коротких палочек или коккобацилл с наличием небольшого количества нитеподобных цепочек. В мазках капсулированных штаммов *H. influenzae*, окрашенных по Гинсу, хорошо просматривается

капсула. Реакция латекс-агглютинации с типоспецифической сывороткой *H. influenzae* типа b у штаммов, принадлежащих к данному типу, дает положительный результат.

Два других основных возбудителя ГБМ, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*, на Гемофилус агаре растут, но их скорость роста заметно ниже, чем на контрольной среде. Диаметр колоний *S. pneumoniae* на Гемофилус агаре через 18 ч культивирования составлял $(0,3 \pm 0,1)$ мм, на среде ША-ВД — $(0,5 \pm 0,1)$ мм. Колонии 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 в отношении пневмококка и менингококка провели серию экспериментов по полной или частичной замене в среде СРГМ на гемоглобин или чёрный альбумин и применению других стимулирующих рост компонентов. Исследования показали, что повышению скорости роста менингококка и пневмококка способствует добавление в питательную среду глюкозы в концентрации 1 г/л или использование смеси СРГМ (5 г/л) и гемоглобина (10 г/л). Введение в состав цианокобаламина, тиамин пирогосфата, аденина, L-глутамин и L-цистеин гидрохлорид позволило улучшить биологические свойства экспериментальных вариантов питательных сред в отношении всех трёх основных возбудителей ГБМ.

В результате проведенных исследований разработаны прописи еще двух питательных сред для выделения всех трех 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. В состав этих сред входят (на 1 л):

ПГК	15,0 г
ЭПД	5,0 г
Пептон	5,0 г
Натрий хлористый	1,0 г
Крахмал растворимый	1,0 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,5 г
L-цистеин гидрохлорид	0,25 г
L-глутамин	0,1 г
Аденин	10 мг
НАД	1,5 мг
Цианокобаламин	1 мг
Тиамин пирогосфат	1 мг

Агар микробиологический (12,±2,0) г

Дополнительно в ГБМ-агар для улучшения биологических свойств добавлена глюкоза (1 г/л), а в качестве заменителя крови и источника фактора X — СРГМ (12 г/л) также, как и в Гемофилус агар. В Шоколадном агаре в отличие от предыдущих двух разработанных сред использована смесь СРГМ (5 г/л) и гемоглобина (10 г/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.

Колонии *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, выросшие на ГБМ-агаре и Шоколадном агаре, крупнее, чем на Гемофилус агаре без добавления бацитрацина, и практически не отличались ни по размеру, ни по количеству от выросших на контрольной среде ША-ВД и шоколадных агарах других иностранных фирм-производителей.

Оценка биологических показателей качества разработанных питательных сред с использованием музейных штаммов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, относящихся к разным серогруппам, показала типичность культуральных и морфологических свойств культивируемых микроорганизмов. 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 контрольной среде 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±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, незначительно мельче, чем на ГБМ-агаре.

Морфология колоний *H. influenzae*, выросших на всех средах, была одинакова: штаммы росли в виде серых слизистых блестящих колоний, достигая размера 1,2-1,3 мм к 18 ч культивирования. Среднее количество колоний практически одинаково на всех исследованных средах.

Размеры и количество колоний *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*, выросших на разработанных питательных средах и контрольной среде ША-ВД через 18 ч культивирования при температуре (37±1) °С, представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Размер и количество колоний штаммов *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* через 18 ч культивирования на различных средах

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

Примечания:

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

** — среднее арифметическое количество колоний и его среднее квадратичное

Обе питательные среды — 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.

Результаты изучения ингибирующих свойств Шоколадного и ГБМ-агара при применении селективных добавок представлены в таблице 2. Для сравнения в таблице представлены данные для Гемофилус агара.

Таблица 2 — Ингибирующие свойства разработанных питательных сред с селективными добавками

Микроорганизмы	Гемофилус агар	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>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>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / 10 ⁻⁶
<i>S. pneumoniae</i> серотип 2	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / 10 ⁻⁶
<i>A. faecalis</i> ATCC 27853	+ / 10 ⁻⁶	± / 10 ⁻⁶	— / исходное	— / исходное
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+ / 10 ⁻⁶	± / 10 ⁻⁶	— / исходное	— / исходное
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	+ / 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	± / 10 ⁻⁶	— / исходное	— / исходное
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / 10 ⁻⁶
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / 10 ⁻⁶
<i>G. vaginalis</i> ATCC 14018	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / 10 ⁻⁶
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 11994	нет данных	— / исходное	— / исходное	+ / 10 ⁻⁶
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	— / исходное	— / исходное	— / 10 ⁻²	+ / 10 ⁻⁶
<i>S. pyogenes</i> Dick-1	— / исходное	— / исходное	— / исходное	+ / 10 ⁻⁶
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	+ / 10 ⁻⁵	— / исходное	— / исходное	— / исходное

Примечания:

* — характер роста: «+» — рост культуры, подавления роста 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

Использование селективных добавок как в составе Шоколадного агара, так и ГБМ-агара позволяет избирательно культивировать и выделять определенные виды микроорганизмов. 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. Подобные селективные свойства отмечены у Гемофилус агара.

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* и *S. pneumoniae*. У некоторых из исследованных микроорганизмов наблюдали частичное подавление роста.

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* и *N. meningitidis*.

В связи с тем, что селективные добавки СД-Г, СД-М и СД-П содержат амфотерицин, на всех селективных вариантах питательных сред полностью отсутствовал рост *C. albicans* ATCC 60193. В составе Гемофилус агара нет противогрибковых компонентов, поэтому на этой среде подавления роста *C. albicans* не происходило.

После завершения этапа разработки проведена оценка стабильности свойств микроорганизмов, выращенных на Гемофилус агаре, Шоколадном агаре и ГБМ-агаре, с использованием дополнительных методов. В ходе исследований структурных характеристик бактерий методом ультратонких срезов и методом негативного контрастирования в процессе электронной микроскопии с использованием сканирующего электронного микроскопа Н-500 (Hitachi) при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении от 15000 до 45000 крат выявлено, что культивирование штаммов *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* на разработанных питательных средах не влияет на структурные характеристики клеток и не изменяет их морфологию.

Исследования штаммов *H. influenzae* ATCC 49247 и *H. influenzae* ATCC 49760, выращенных на контрольных питательных средах и на всех трёх разработанных средах, методами ПЦР с использованием праймеров G1 (5' GAAGTCGTAACAAGG 3'), специфичного к 3'-концу гена 16S рРНК, L1 (5' CAAGGCATCCACCGT 3'), специфичного к 5'-концу гена 23S рРНК, праймеров ERIC 1 и ERIC 2, а также методом со случайными короткими (до 10 нуклеотидных оснований) праймерами (RAPD-PCR) с использованием случайного праймера OPA 11 (CAATCGCCGT) показали видовое молекулярно-генетическое сходство и идентичные внутривидовые различия.

Следующим этапом исследования стала разработка технологии серийного производства Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара.

Разработка технологии производства питательных сред

В связи с особенностями состава, в частности наличием в питательных средах термолабильных компонентов и селективных добавок, каждая из сред была сконструирована в виде наборов реагентов, включающих основу питательной среды, ростовую и селективные добавки.

В ходе проведенных исследований отработаны технологии выпуска основы ГБМ-агара в сухом виде, а Гемофилус агара и Шоколадного агара в виде стерильных готовых к применению гелей, разлитых во флаконы, для последующего расплавления и розлива в чашки Петри. Определены режимы технологических процессов.

В результате исследований разработана технология приготовления ростовых и селективных добавок для всех трех питательных сред методом лиофильного высушивания растворов компонентов. Для оптимизации процесса высушивания ростовой добавки для Гемофилус агара и селективных добавок СД-М и СД-П потребовалось введение наполнителя, нейтрального в отношении микроорганизмов и компонентов среды. В качестве наполнителя испытаны мальтодекстрин глюсидекс с декстрозным эквивалентом 19 (глюсидекс 19), поливинилпирролидон, декстраны с молекулярной массой 5 000, 40 000, 60 000 и 500 000 Да. В результате исследований в качестве наполнителей для приготовления ростовой добавки выбраны глюсидекс 19 и поливинилпирролидон, которые могут быть взаимозаменяемы, а для приготовления СД-М и СД-П только глюсидекс 19.

Для определения показателей качества питательных сред изготовлено по 10 экспериментально производственных серий Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара из серий компонентов, различающихся по физико-химическим показателям. Установлена зависимость биологических показателей питательных сред от физико-химических показателей компонентов, что позволило управлять качеством производственных серий питательных сред. В процессе исследования определены сроки годности питательных сред, требования к биологическим и физико-химическим показателям качества. На основании проведенных исследований разработана нормативная документация, включающая технические условия, промышленные регламенты и инструкции по применению для всех трёх питательных сред.

На заключительном этапе исследования проведена оценка качества производственных серий питательных сред с использованием музейных штаммов микроорганизмов и образцов клинического материала.

Оценка качества производственных серий разработанных питательных сред

Оценку качества питательных сред с использованием музейных штаммов возбудителей ГБМ проводили в два этапа. На первом этапе ростовые свойства Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара сравнивали с коммерческими шоколадными агарами четырех фирм-производителей (Becton Dickinson, Mast Group, bioMerieux и HiMedia), с питательной средой Haemophilus test medium (Oxoid) и вариантами шоколадного агара лабораторного приготовления с использованием бараньей крови и крови крупного рогатого скота. В качестве примера на рисунке 2 представлены графики зависимости количества и размеров колоний трех исследованных штаммов микроорганизмов на различных питательных средах через 18 ч инкубирования. Различий в характере роста исследованных штаммов на средах производства Becton Dickinson, bioMerieux и HiMedia не было, поэтому на рисунке 2 приведены данные только для шоколадного агара Becton Dickinson (ША-BD).

В ходе проведенных исследований установлено, что Гемофилус агар, Шоколадный агар и ГБМ-агар не уступают по биологическим показателям испытанным коммерческим питательным средам иностранного производства и превосходят шоколадные агары лабораторного приготовления.

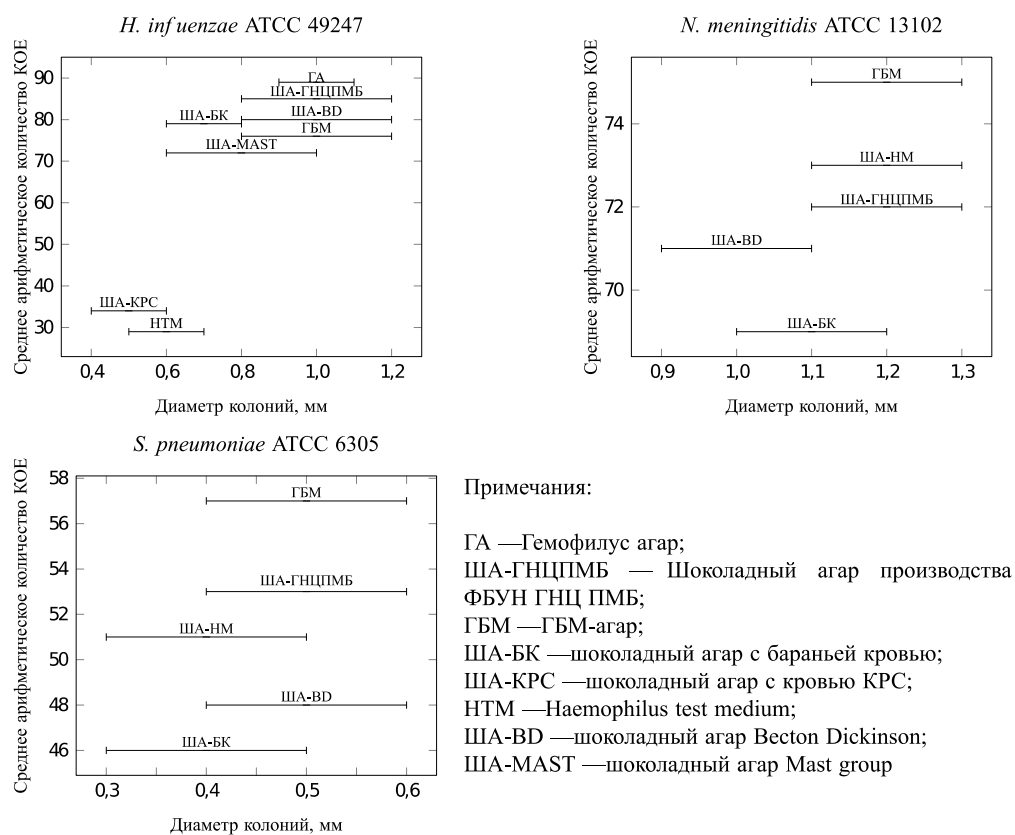


Рис. 2— Графики зависимости количества и размеров колоний *H. influenzae* ATCC 49247, *N. meningitidis* ATCC 13102 и *S. pneumoniae* ATCC 6305 на различных питательных средах через 18 ч инкубирования при температуре (37±1) °С

На втором этапе ростовые свойства разработанных питательных сред испытаны в ФБУН ЦНИИЭ и ФБУН МНИИЭМ с использованием 14 музейных штаммов основных возбудителей ГБМ. Отмечено, что питательные среды не уступают по биологическим показателям качества питательным средам, используемым для выделения этих микроорганизмов в лабораторной практике, они удобны в работе, для их использования не требуется добавления крови, что очень важно при проведении работ в полевых условиях и в передвижных лабораториях.

В ходе исследований 5 клинических образцов спинно-мозговой жидкости от больных с подозрением на гнойный бактериальный менингит, поступивших на санитарно-микробиологическое обследование во ФБУН ЦНИИЭ, на Гемофилус агаре и контрольной среде выявлен рост бактерий *H. influenzae* из двух образцов одновременно на обеих средах.

При проведении испытаний Шоколадного агара, ГБМ-агара в сравнении с контрольной питательной среды в НАКФФ при исследовании 90 клинических образцов мазков из зева, полученных от пациентов с заболеваниями верхних дыхательных путей, поступивших из лечебно-профилактических учреждений города Москвы и Московской области, выделено одинаковое число (154) культур микроорганизмов на всех средах. Идентификацию выделенных культур микроорганизмов проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) на MALDI Biotyper 3.0 Microflex (Bruker). Из 154 выделенных культур микроорганизмов две принадлежали к виду *N. meningitidis*, 23 — к виду *S. pneumoniae* и 9 культур идентифицировано как *H. influenzae*. Количество выделенных культур основных возбудителей ГБМ на Шоколадном агаре и ГБМ-агаре совпадало с количеством выделенных культур на контрольной среде. Использование испытываемых 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.

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)».

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, 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 и 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.

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 // Материалы международной конференции: 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 // материалы научно–практической школы–конференции молодых ученых и специалистов научно–исследовательских 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 // Материалы III ежегодного всероссийского конгресса по инфекционным болезням. — Москва, 2011. — С. 291.

9. Домотенко, Л. В. Питательные среды для диагностики гнойных бак-териальных менингитов / Л. В. Домотенко, **Я. В. Подкопаев**, Т. П. Морозова, М. В. Храмов // Материалы 3-й российской научно-практической конференции: 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 // Материалы 3-й российской научно-практической конференции: 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 // Материалы IV ежегодного 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. — 2012. — Т. 4, № 4. Приложение — С. 94.

13. Герасимов, В. Н. Оценка качества бактериальных клеток и биомассы *H. influenzae* методом электронной микроскопии / В. Н. Герасимов, **Я. В. Подкопаев**, Е. А. Голов, Ю. В. Герасимова, С. А. Котов, Л. В. Домотенко, М. В. Храмов // Материалы

VI ежегодного 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ГБМ** — Гнойные бактериальные менингиты
- КОЕ** — Колониеобразующая единица
- МУК** — Методические указания
- НАД** — Никотинамидадениндинуклеотид
- НАКФФ** — Открытое акционерное общество «Национальное агентство клинической фармакологии и фармации»
- ПГК** — Панкреатический гидролизат казеина
- ПЦР** — Полимеразная цепная реакция
- РД-ША** — Ростовая добавка для Шоколадного агара и ГБМ-агара
- СД-Г** — Селективная добавка для выделения гемофильной палочки
- СД-М** — Селективная добавка для выделения менингококка
- СД-П** — Селективная добавка для выделения пневмококка
- 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-ВД** — Шоколадный агар на основе гонококкового агара производства Veston Dickinson с добавлением гемоглобина и смеси факторов роста
- ЭПД** — Экстракт пекарских дрожжей
- АТСС** — Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection, США)