

Сравнительный анализ питательных сред для выделения протеев

А.П.Шепелин, О.В.Полосенко

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболенск, Российская Федерация

В настоящее время значительно возрос интерес к изучению заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами. Некоторые виды вызывают инфекции мочевыводящих путей, поражение желудочно-кишечного тракта, вторичные септические поражения после хирургических вмешательств, могут быть возбудителями внутрибольничных инфекций.

Бактериологический метод – основной и наиболее достоверный метод диагностики протейной инфекции. Выделение микроорганизма и получение «чистой культуры» значительно осложняются из-за способности некоторых бактерий рода *Proteus* к роению. Кроме того, бактерии рода *Proteus* довольно часто находятся в ассоциации с другими микроорганизмами, поэтому для их выделения используется ряд селективных и дифференциально-диагностических сред. Проведена специфическая оценка биологических свойств ряда современных питательных сред с целью определения культурально-морфологических и биохимических свойств бактерий рода *Proteus*.

Ключевые слова: питательные среды, протеи, специфическая активность, дифференцирующие свойства, селективность

Для цитирования: Шепелин А.П., Полосенко О.В. Сравнительный анализ питательных сред для выделения протеев. Бактериология. 2019; 4(3): 31–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-31-37

Comparative analysis of nutrient media for proteus isolating

A.P.Shepelin, O.V.Polosenko

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Currently, interest in the study of diseases caused by opportunistic microorganisms has significantly increased. Some species cause urinary tract infections, gastrointestinal tract damage, secondary septic lesions after surgery. Also, they can be causative agents of nosocomial infections.

The bacteriological method is the main and most reliable method for proteus infection diagnostic. Isolation of the microorganism and obtaining a «pure culture» is significantly complicated due to the ability of some bacteria of the genus *Proteus* to swarm. In addition, bacteria of the genus *Proteus* are quite often associated with other microorganisms, therefore, a number of selective and differential diagnostic media are used to isolate them.

A specific assessment of the biological properties of a number of modern nutrient media was carried out in order to determine the cultural, morphological and biochemical properties of bacteria of the genus *Proteus*.

Key words: nutrient media, protea, specific activity, differentiating properties, selectivity

For citation: Shepelin A.P., Polosenko O.V. Comparative analysis of nutrient media for proteus isolating. Bacteriology. 2019; 4(3): 31–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-31-37

Микроорганизмы рода *Proteus* относятся к факультативным обитателям толстого кишечника человека, обнаруживаются лишь у 5–10% здоровых людей и самостоятельного значения как показатель фекального загрязнения не имеют, но имеют определенное санитарно-показательное значение. Обнаружение большого количества *P. vulgaris* в почве и воде может свидетельствовать

о содержании в них и разрушении органических веществ животного происхождения. При загрязнении объектов внешней среды фекальными стоками, как правило, выявляют *P. mirabilis* [1].

Санитарно-показательные микроорганизмы рода *Proteus* вместе с бактериями группы кишечной палочки, энтерококками, сульфитредуцирующими кластридиями, колифагами

Для корреспонденции:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной деятельности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 11.08.2019 г., принята к печати 26.09.2019 г.

For correspondence:

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biology), deputy director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 11.08.2019, accepted for publication 26.09.2019

применяют для санитарно-гигиенической оценки почвы, воды открытых водоемов [2].

Существуют гигиенические нормативы по микробиологическим показателям безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, которые включают несколько групп микроорганизмов, в том числе условно-патогенные бактерии рода *Proteus* [3, 4].

В последние годы инфекционисты отмечают рост заболеваний, обусловленных бактериями *Proteus*. Кишечная форма заболевания, вызванная бактериями рода *P. vulgaris*, протекает тяжелее у детей раннего возраста. Не менее опасны гнойно-воспалительные заболевания мочевыводящей системы, вызываемые *P. mirabilis*, *P. rettgeri*.

Актуальность проблемы внутрибольничных инфекций (ВБИ) определяется широким распространением их в медицинских учреждениях различного профиля и значительным ущербом, наносимым этими заболеваниями здоровью населения [5].

Циркулирующие в стационарах возбудители ВБИ постепенно формируют госпитальные штаммы, наиболее эффективно адаптированные к местным особенностям того или иного отделения. Так, в хирургических стационарах общего профиля доминирует кишечная палочка, в урологических – кишечная палочка, протей, синегнойная палочка, клебсиеллы, в травматологических – золотистый стафилококк, синегнойная палочка, протей и т.п. Внутрибольничную (нозокомиальную) протейную инфекцию человека чаще вызывает *P. stuartii*.

Бактериологический метод – основной и наиболее достоверный метод диагностики протейной инфекции. Диагноз инфекции, вызванной *Proteus* spp., зависит от результатов культурального выделения микроорганизма.

Ферментативные гидролизаты белков (пептон, триптон, ПГРМ) содержат аминокислоты, пептиды, витамины группы В, минеральные вещества, т.е. все компоненты, необходимые для нормального развития микробной популяции. Поэтому они широко используются в качестве питательных субстратов для культивирования и выделения бактерий рода протеев, образующих на плотных питательных средах вуалеобразный налет (роение), что является характерной особенностью данных микроорганизмов. Кроме того, такие среды должны содержать компоненты, подавляющие рост ассоциативной микрофлоры.

Цель исследования – определение культурально-морфологических и биохимических свойств бактерий рода *Proteus* с использованием современных дифференциально-диагностических питательных сред.

Материалы и методы

Для биологического контроля питательных сред были использованы тест-штаммы микроорганизмов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Все использованные штаммы микроорганизмов типичны по своим культуральным, морфологическим, биохимическим свойствам. Исследовано 40 тест-штаммов энтеробактерий, включая *P. vulgaris*, *P. inconstans*, *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, а также 15 грамположительных тест-штаммов.

Результаты и обсуждение

Микроб хорошо культивируется на обычных питательных средах. При посеве материала, содержащего бактерии рода *Proteus*, в конденсационную воду свежескошенного агара (метод Шукевича) через несколько часов на мясо-пептонном агаре отмечается роение микроба, ползучий нежный вуалеобразный рост. Посев по методу Шукевича широко применяют в диагностических лабораториях при выделении протей из объектов внешней среды и продуктов [6].

При росте на плотных питательных средах, таких как ГРМ-агар, питательная среда №1, большинство штаммов протеев, обладающих феноменом роения или «ползучего роста», также образуют тонкий вуалеобразный налет на поверхности среды. Нероящиеся формы протей на таких неселективных питательных средах образуют круглые бесцветные колонии S-формы.

На рисунке 1 представлен рост роящегося тест-штамма *P. vulgaris* НХ 19 222 на питательной среде ГРМ-агар. Тест-штамм *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50 образует более компактные колонии диаметром 2,0–2,2 мм.

На кровяном агаре (ГРМ-агар с добавлением 7% крови барана) тест-штаммы *P. vulgaris* НХ 19 222 и *P. mirabilis* Сиднеев также образуют зоны роения, что является характерной особенностью данных микроорганизмов, а нероящийся тест-штамм *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50 на такой питательной среде образует мелкие серые блестящие колонии в S-форме (рис. 2).

Идентификация энтеробактерий начинается с изучения их колоний на дифференциально-диагностических средах. Для целей клинической микробиологии это в первую очередь среды Эндо или агар с эозин-метиленовым синим (среда Левина). Такие среды обычно не справляются с вуалеобразным ростом протеев (рис. 3, 4). Нероящиеся представители рода протеев обычно образуют более «нежные» колонии небольших размеров [7, 8].

Так как при выделении чистых культур микроорганизмов с неселективных или слабоселективных плотных питательных сред возникают затруднения из-за присутствия протей, способного к роению, для подавления данного феномена используют среды, содержащие соли желчных кислот (среда Плоскирева, висмут-сульфит агар, агар Мак-Конки, SS-агар и др.), желчь, 0,1% раствор хлоралгидрата, а также хорошо просушенные среды, на которых возможно наблюдать рост протей без роения либо с очаговым роением.

В методических указаниях, используемых для диагностики энтеробактерий, нет дифференциально-диагностических питательных сред, рекомендуемых конкретно для выделения протей. Все представленные дифференциально-диагностические среды так или иначе содержат компоненты, ингибирующие рост и роение протей. Это может привести к не совсем достоверной диагностике и потере изолятов протей, патогенных для человека.

Так, на питательной среде для выделения сальмонелл и шигелл (SS-агар) рост *P. mirabilis* 3177 сопровождается образованием колоний бурого цвета с темным центром диаметром 2,0–4,0 мм без роения. Рост *P. vulgaris* НХ 19 222 – в виде бесцветных колоний диаметром 2,0–4,0 мм, возможно частичное очаговое роение (рис. 5).

На питательной среде для выделения сальмонелл (Висмут-сульфит-ГРМ агар) колонии *P. vulgaris* НХ 19 222 круглые, светло-зеленого цвета диаметром 1,0–2,0 мм (рис. 6).

На питательной среде для селективного выделения и учета всех видов энтеробактерий (агар Мосселя) *P. mirabilis* 3177 растет в виде круглых, малинового цвета колоний, с зоной преципитации диаметром 1,5–2,5 мм [9] (рис. 7). Селективность агара Мосселя в отношении грамположительных микроорганизмов основана на ингибиторной способности кристаллического фиолетового и солей желчных кислот.

Высокоселективная питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий (XLD-агар) обладает ярко выраженными дифференцирующими свой-

ствами. Бактерии, продуцирующие в процессе роста на XLD-агаре сероводород, образуют колонии с черным центром. Образование черного центра происходит в процессе химической реакции солей железа, входящих в состав среды, с сероводородом и образованием в результате реакции сульфида железа черного цвета. На XLD-агаре тест-штамм *P. mirabilis* 3177 образует круглые, прозрачные колонии с черным центром, диаметром 1,0–2,5 мм (рис. 8).

Лактозный ТТХ агар с тергитолом 7 является средой, в основном применяемой для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий. Дифференцирующие свойства среды основаны на изменении pH в кислую сторону при росте лактозоферментирующих бактерий, которые образуют на среде колонии желтого или желто-оранжевого цвета

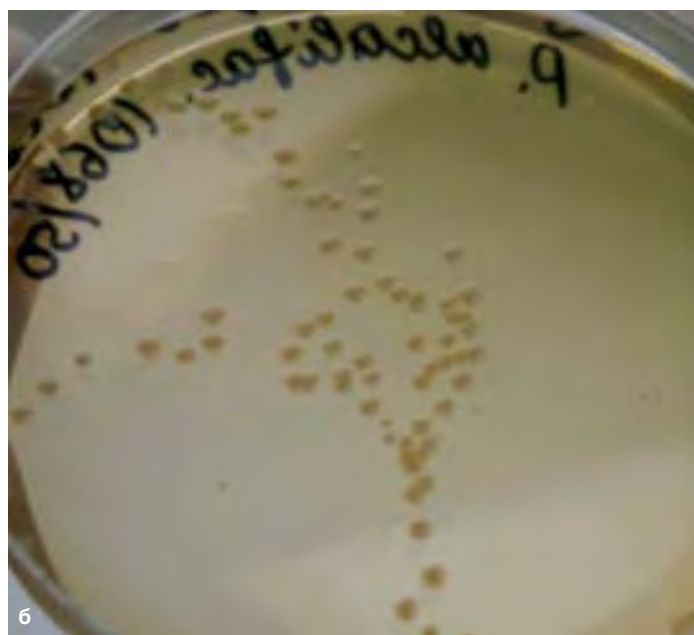


Рис. 1. Рост тест-штаммов на ГРМ-агаре: а – *P. vulgaris* НХ 19 222; б – *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50.

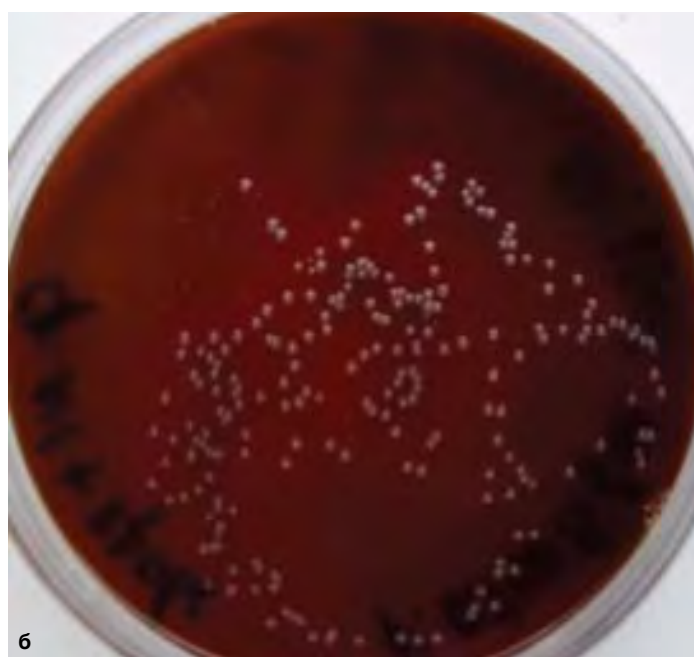
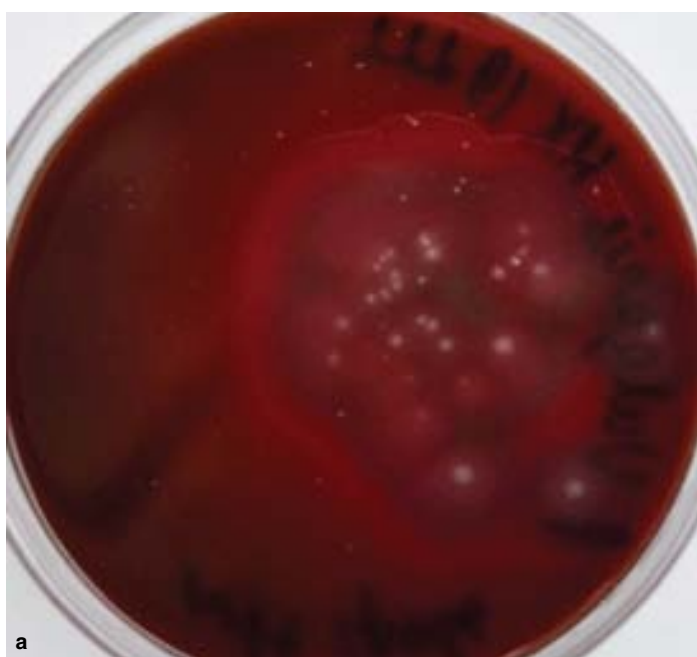


Рис. 2. Рост тест-штаммов на кровяном агаре: а – *P. vulgaris* НХ 19 222; б – *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50.

с желтой зоной вокруг колоний и на восстановлении 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) лактозоотрицательными бактериями, которые окрашиваются в красно-коричневый цвет.

Селективность среды обеспечивает тергитол 7, додецилсульфат натрия и ТТХ, подавляющие рост большинства грамположительных бактерий.

На рисунке 9 представлен рост протеев *P. mirabilis* Сиднеев и *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50 на лактозном ТТХ агаре с тергитолом 7.

Актуальность проблемы внутрибольничных инфекций, в том числе и от протеев, диктует необходимость разработки новой питательной среды, обеспечивающей выделение и предварительную видовую дифференциацию этой бактерии. В ФБУН ГНЦ ПМБ была разработана «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения

протеев», предназначенная для выделения и визуальной идентификации бактерий рода протеев, провиденции и морганелл из клинического материала.

Среда обеспечивает селективность в отношении грамположительной и грамотрицательной сопутствующей микрофлоры за счет присутствия в среде желчи крупного рогатого скота, кристаллического фиолетового и полимиксина В сульфата [10].

Дифференциально-диагностическая питательная среда обеспечивает рост протеев в виде:

- колонии *Proteus alcalifaciens* NCTC 1068-50 – круглые, гладкие, полупрозрачные, розового цвета диаметром от 1,5 до 2,5 мм (рис. 10a);
- колонии *Proteus mirabilis* 3177 – круглые, гладкие, полупрозрачные, розовые, с темным центром, диаметром от 1,0 до 2,5 мм (рис. 10b);



Рис. 3. Рост тест-штамма *P. mirabilis* 3177 на среде Левина.

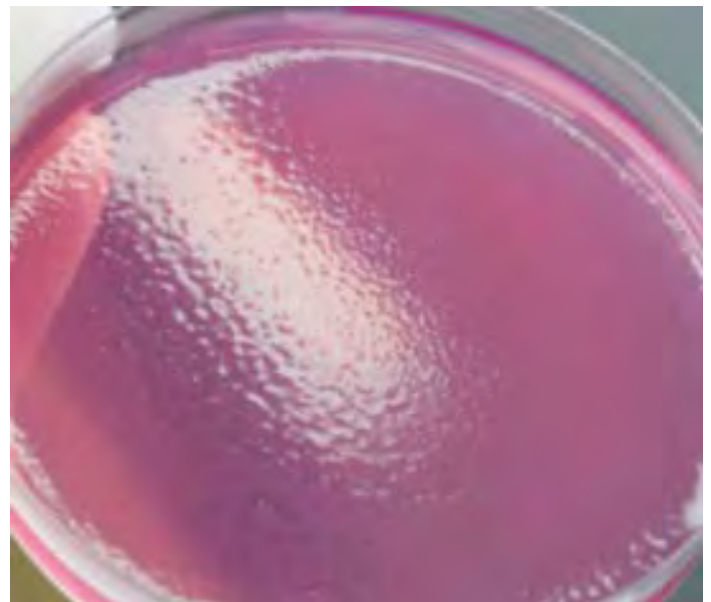


Рис. 4. Рост тест-штамма *P. mirabilis* 3177 на агаре Эндо-ГРМ.

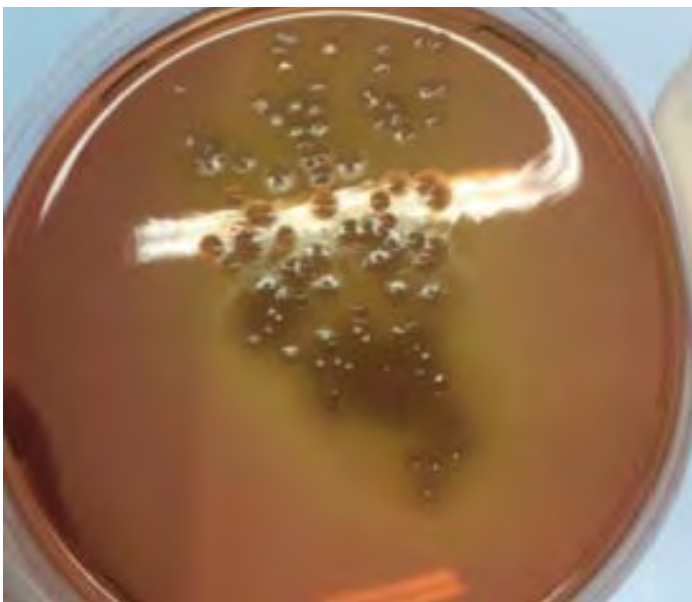


Рис. 5. Рост тест-штамма *P. vulgaris* HX 19 222 на SS-агаре.

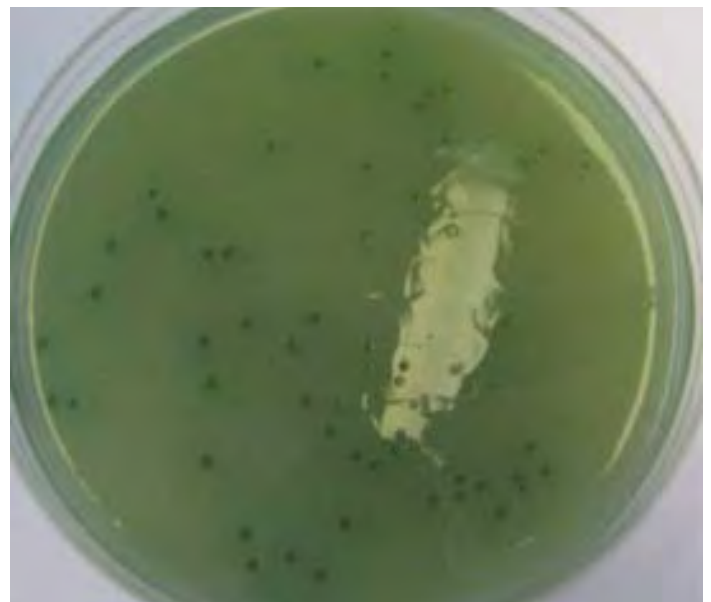


Рис. 6. Рост тест-штамма *P. vulgaris* HX 19 222 на BCA.

- колонии *Proteus vulgaris* НХ 19 222 – круглые, гладкие, полупрозрачные, желтоватые со слабым пожелтением среды, возможно образование темного центра, диаметром от 1,0 до 2,5 мм;

- колонии *Morganella morganii* 1518 – круглые, гладкие, полупрозрачные, розового цвета, диаметром от 1,5 до 2,5 мм.

Дальнейшая идентификация выделенных культур проводится по общепринятой схеме.

Представители рода *Proteus* ферментируют глюкозу с образованием кислоты и небольшого количества газа, не ферментируют лактозу и маннит, устойчивы к цианиду, образуют уреазу и фенилаланиндезаминазу. Опорными тестами для идентификации бактерии рода *Proteus* являются: дезаминирование фенилаланина, реакция на серо-

водород, реакция с метилротом, реакция Фогес–Проксауэра, разжижение желатина. Виды дифференцируют по дополнительным биохимическим тестам, представленным в таблице.

Для определения уреазы используются среды, в составе которых присутствует мочевины (среда Олькеницкого и ее модификации).

На питательной среде для первичной идентификации энтеробактерий (железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной) – аналоге среды Олькеницкого утилизацию мочевины учитывают по изменению исходного цвета среды на яркомалиновый, ферментацию лактозы учитывают по изменению цвета скошенной части среды на желтый, глюкозы – по изменению цвета столбика среды на желтый, газообразование – по появлению пузырьков воздуха или разрыва



Рис. 7. Рост тест-штамма *P. mirabilis* 3177 на агаре Мосселя.



Рис. 8. Рост тест-штамма *P. mirabilis* 3177 на XLD-агаре.

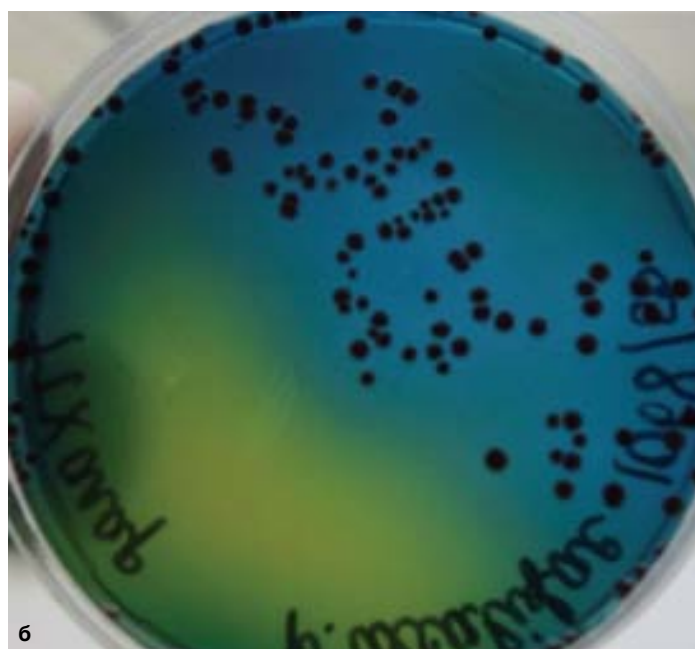
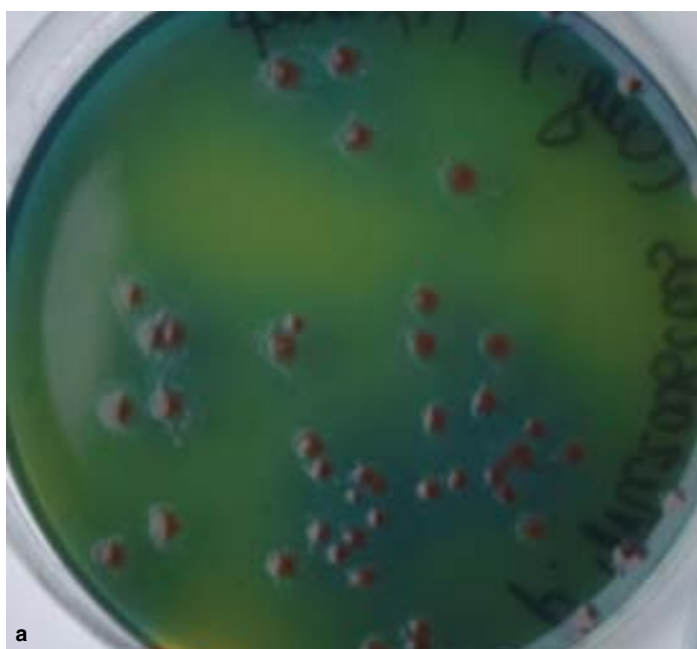


Рис. 9. Рост тест-штаммов на лактозном ТТХ агаре с тергитолом 7: а – *P. mirabilis* Сиднеев; б – *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50.

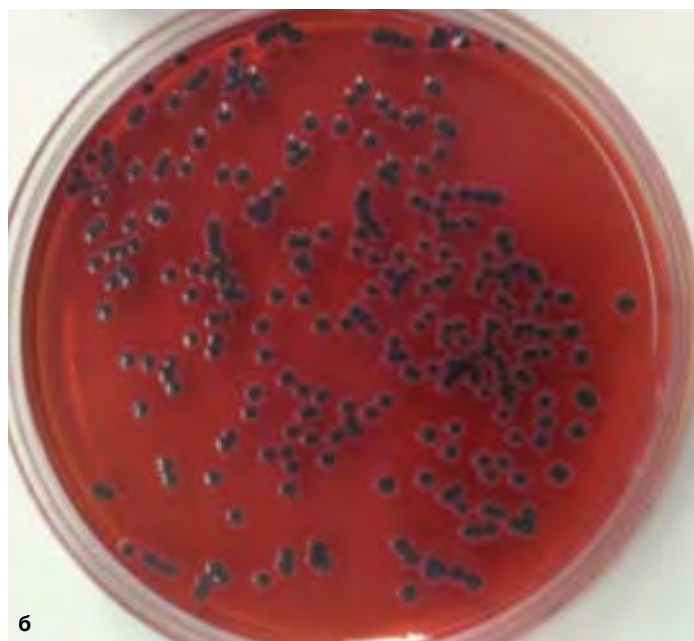


Рис. 10. Рост тест-штаммов на дифференциально-диагностической питательной среде для выделения протеев: а – *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50, б – *P. mirabilis* 3177.

Таблица. Основные биохимические признаки протеев

Признак	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. stuartii</i>
Ферментация					
Глюкозы	+	+	+	+	+
Мальтозы	-	+	-	-	-
Арабинозы	-	-	-	-	-
Сахарозы	-	+	-	-	в
Маннит	-	-	-	+	-
Лактоза	-	-	-	-	-
Уреаза	+	+	-	+	в
Индол	-	+	+	+	+
H ₂ S	+	+	-	-	-
Орнитин	+	-	-	-	-

(+) – положительный признак; (-) – отрицательный признак.

среды в столбике, образование сероводорода – по почернению среды в столбике (рис. 11).

Важнейший признак протеев, отличающий их от прочих энтеробактерий, – способность дезаминировать фенилаланин. Питательная среда для дифференциации энтеробактерий по тесту дезаминирования фенилаланина (Фенилаланин-агар) используется для дифференциации *Proteus* spp., *Providencia* spp. и *Morganella* spp. от других энтеробактерий по признаку дезаминирования фенилаланина до фенилпиروиноградной кислоты. Культуры микроорганизмов, дезаминирующие фенилаланин, после внесения треххлористого железа изменяют цвет поверхности среды и конденсата на дне пробирки со светло-желтого на зеленый; не дезаминирующие фенилаланин – не изменяют цвет среды и конденсата.

Выводы

Достоверным методом диагностики протейной инфекции является бактериологический метод с использованием питательных сред для выделения и изучения культурально-морфологических признаков бактерий.

Новая дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения протеев предназначена для выделения и визуальной идентификации бактерий рода протей, провиденции и морганелл из различного клинического материала, а также для получения информации о потенциально патогенных бактериях – возбудителях внутрибольничных инфекций. Наличие в среде кристаллического фиолетового и полимиксина В значительно ингибирует рост грамположительных микроорганизмов и большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Среда обеспечивает внутривидовую дифференциацию протеев по способности образовывать сероводород.

Использование совокупности новых и ранее разработанных эффективных отечественных питательных сред для вы-



Рис. 11. Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной (аналог Олькеницкого). Слева направо: контроль (незасеянная среда); рост тест-штаммов: *P. alcalifaciens* NCTC 1068-50, *P. vulgaris* HX 19222, *P. mirabilis* Сиднеев.

деления и идентификации протеев позволит усовершенствовать методы микробиологического анализа при диагностике инфекционных заболеваний.

Литература

1. Кондакова ГВ. Санитарная микробиология. Ярославль: ЯрГУ; 2005, 84 с.
2. Литусов НВ, Сергеев АГ, Григорьева ЮВ, Ишутинова ВГ. Микрофлора окружающей среды и тела человека. Учебное пособие. Екатеринбург, 2008, 28 с.
3. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов СанПиН 2.3.2.1078-01 (с изменениями на 6 июля 2011 г.).
4. Шепелин АП, Дятлов ИА, Полосенко ОВ. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Бактериология. 2017;2(2):39-47. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47
5. Веткина ИФ, Комаринская ЛВ, Ильин ИЮ, Соловьева МВ. Современный подход к выбору дезинфицирующих средств в системе профилактики внутрибольничных инфекций (ВБИ). ФАРМиндекс-Практик. 2005;7:13-20.
6. Методика. Индикации бактерий рода «Протеус» в кормах животного происхождения. 1981 г. (Дата актуализации 01.01.2019) утв. Главным управлением ветеринарии МСХ СССР.
7. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 г., №535. М., 1985, 126 с.
8. Шепелин АП, Дятлов ИА. Питательные среды для энтеробактерий. Монография. М.: Изд. Династия; 2017, 232 с.
9. Шепелин АП, Марчихина ИИ, Полосенко ОВ, Шолохова ЛП, Ажермачева НИ, Доброхотский ОН, Борзенкова ТХ. Клинические испытания агара и бульона Моссея. Клиническая лабораторная диагностика. 2017;62(10):631-5. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-10-631-635
10. Мартовецкий МН, Шепелин АП, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Полосенко ОВ. Разработка питательных сред для выделения протеев и клебсиелл. Инфекция и иммунитет. 2016;6(3):66.

References

1. Kondakova GV. Sanitarnaya mikrobiologiya [Sanitary Microbiology]. Yaroslavl; 2005, 84 p. (In Russian).
2. Litusov NV, Sergeev AG, Grigor'eva YuV, Ishutinova VG. Mikroflora okruzhayushchei sredy i tela cheloveka. Ekaterinburg, 2008, 28 p. (In Russian).

3. Sanitary and epidemiological rules and regulations. Hygienic requirements for the safety and nutritional value of food SanPiN 2.3.2.1078-01 (as amended on July 6, 2011). (In Russian).
4. Shepelin AP, Dyatlov IA, Polosenko OV. Microbiological control of food products quality. Bacteriology. 2017;2(2):39-47. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47 (In Russian).
5. Vеткина ИФ, Комаринская ЛВ, Ильин ИЮ, Соловьева МВ. Sovremennyy podkhod k vyboru dezinfitsiruyushchikh sredstv v sisteme profilaktiki vnutribol'nichnykh infektsii (VBI). FARMindex-Praktik. 2005;7:13-20. (In Russian).
6. Method. Indications of bacteria of the genus "Proteus" in animal feed. 1981 (date of updating 01.01.2019) approved. The main Department of veterinary medicine of the Ministry of agriculture of the USSR. (In Russian).
7. On the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical and diagnostic laboratories of medical institutions: Order of the Ministry of health of the USSR from 22.04.1985, No. 535. Moscow, 1985, 126 p. (In Russian).
8. Shepelin AP, Dyatlov IA. Pitatel'nye sredy dlya enterobakterii. Moscow: "Dynasty" Publ.; 2017, 232 p. (In Russian).
9. Shepelin AP, Marchikhina II, Polosenko OV, Sholokhova LP, Azhermacheva NI, Dobrokhotsky ON, Borzenkova TKh. The clinical trials of agar and mossa ee broth. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2017;62(10):631-5. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-10-631-635 (In Russian).
10. Martovetskii MN, Shepelin AP, Marchikhina II, Sholokhova LP, Polosenko OV. Razrabotka pitatel'nykh sred dlya vydeleniya proteev i klebsiell. Infektsiya i immunitet (Russian Journal of Infection and Immunity). 2016;6(3):66. (In Russian).

Информация об авторе:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат бионических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований лаборатории микробиологических и физико-химических методов анализа НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0020
 E-mail: polosenko@obolensk.org

Information about author:

Olga V. Polosenko, PhD (Biology), leading researcher, microbiological research sector, laboratory of microbiological and physico-chemical methods of analysis, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0020
 E-mail: polosenko@obolensk.org