

Сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *Escherichia coli* с целью применения в ветеринарных лабораториях

Ю.А.Скоморина¹, А.А.Кремлева¹, Л.Ш.Ахметова¹, Т.А.Подольская¹, А.П.Шепелин², О.В.Полосенко²

¹ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория», Москва, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Статья посвящена сравнительным исследованиям современных дифференциально-диагностических питательных сред для эффективного культивирования и идентификации *Escherichia coli*. Проведена оценка качества питательных сред по биологическим показателям в соответствии с их назначением. Особое внимание уделено дифференциально-диагностическим средам нового поколения. Установлено, что испытываемые среды обладают высокой производительностью и ингибирующими свойствами. Современные питательные среды отечественных производителей не уступают по заявленным производителями характеристикам. При условии проведения валидационных процедур ветеринарные лаборатории вправе использовать современные питательные среды, не установленные нормативными документами.
Ключевые слова: питательные среды, эшерихии, производительность, селективность и специфичность

Для цитирования: Скоморина Ю.А., Кремлева А.А., Ахметова Л.Ш., Подольская Т.А., Шепелин А.П., Полосенко О.В. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *Escherichia coli* с целью применения в ветеринарных лабораториях. Бактериология. 2020; 5(2): 24–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-24-32

Comparative evaluation of nutrient media of *Escherichia coli* isolating for using in veterinary laboratories

Yu.A.Skomorina¹, A.A.Kremleva¹, L.Sh.Akhmetova¹, T.V.Podolskaya¹, A.P.Shepelin², O.V.Polosenko²

¹Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory, Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The article is focus on comparative studies of modern differential diagnostic nutrient media for effective cultivation and identification of *Escherichia coli*. The assessment of the quality of media by biological properties was carried out in accordance with their purpose. Special attention is paid to the new generation of differential diagnostic nutrient media. It was found that the tested media have high productivity and inhibitory properties. New culture media of inland producers are not inferior in terms of the characteristics declared by the manufacturers. In case of methods validation the veterinarian laboratory will be able to use new nutrient media.
Key words: nutrient media, *Escherichia*, productivity, selectivity and specificity

For citation: Skomorina Yu.A., Kremleva A.A., Akhmetova L.Sh., Podolskaya T.V., Shepelin A.P., Polosenko O.V. Comparative evaluation of nutrient media of *Escherichia coli* isolating for using in veterinary laboratories. Bacteriology. 2020; 5(2): 24–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-24-32

E*scherichia coli* (эшерихии) – преимущественные бактерии нормальной факультативно-анаэробной микрофлоры кишечника человека и животных, но ряд сероваров могут быть возбудителями острых инфекционных болезней животных всех видов [1].

Наряду с тем, что эшерихии являются возбудителями инфекционных болезней, эти синантропные бактерии относят-

ся еще и к основным санитарно-показательным микроорганизмам. В настоящее время кишечная палочка принята в качестве показателя фекального загрязнения объектов внешней среды, в том числе пищевых продуктов и кормов. Так, при обнаружении *E. coli* делают заключение о наличии фекального загрязнения и возможном присутствии патогенных видов.

Для корреспонденции:

Скоморина Юлия Александровна, заместитель руководителя / заведующий отделом бактериологии ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»

Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23

Телефон: (495) 700-0137

E-mail: yskomorina@inbox.ru

Статья поступила 30.07.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

For correspondence:

Yulia A. Skomorina, deputy head / head of the department of bacteriology of the Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory

Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation

Phone: (495) 700-0137

E-mail: yskomorina@inbox.ru

The article was received 30.07.2020, accepted for publication 15.09.2020

Согласно действующим на территории Российской Федерации нормативным документам по исследованию кормов и кормовых добавок, кишечная палочка является одним из главных показателей контроля качества и безопасности. Среди бактериальных болезней животных *E. coli* является одним из основных возбудителей инфекционных болезней животных, в частности молодняка.

На территории Российской Федерации действуют следующие ветеринарные нормативные документы (НД) по выделению кишечной палочки из кормов из патологического материала животных: «Правила бактериологического исследования кормов», 1975 г. [2], ГОСТ 25311-82 «Мука кормовая животного происхождения» [3] и «Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», 2000 [4].

В лабораторных условиях для определения наличия или отсутствия *E. coli* (в том числе и патогенных) в кормах и патологическом материале при бактериологическом исследовании основным этапом является посев на питательные среды. Культуральный метод с применением питательных сред является основой исследовательской работы микробиологов. Надежность питательной среды зависит от качества основных ингредиентов среды, правильности рецептуры, качества методики приготовления, степени отсутствия микробного заражения, а также от надлежащих условий упаковки и хранения. Выбор питательных сред и их производителей также напрямую влияет на результат работы микробиолога и определяет ее успех.

В вышеуказанных нормативных документах предусмотрено использование таких питательных сред, как агар Эндо и Левина. Однако в настоящее время существует широкий выбор питательных сред как российского, так и зарубежного производства, характеризующихся высокой чувствительностью и производительностью, а также обладающих хорошими дифференцирующими, ростовыми и ингибирующими свойствами.

В современной лабораторной практике широкое применение имеют хромогенные среды, позволяющие не только обнаруживать, но и одновременно идентифицировать микроорганизмы благодаря компонентам, входящим в состав питательной среды. Хромогенные питательные среды позволяют выявить специфические ферменты у разных микроорганизмов. Для обнаружения такого фермента и, соответственно, идентификации микроорганизма в состав среды вводят определенный субстрат – вещество, при расщеплении которого этим ферментом образуются окрашенные продукты. Идентификация микроорганизмов возможна уже на этапе первичного посева, что позволяет сократить время исследования.

Актуальность совершенствования методов исследования материала для выделения *E. coli* в ветеринарной практике связана с появлением новых питательных сред. Применение современных сред в ветеринарной практике затруднительно из-за отсутствия их в действующих НД. Однако для использования питательных сред, не предусмотренных НД, в лаборатории есть возможность проведения валидационного процесса [5]. При проведении валидации лаборатория подтверждает то, что новые используемые питательные среды не уступают по характеристикам питательным средам, заявленным в нормативных документах.

Цель исследования – сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *E. coli* отечественных и зарубежных производителей.

Материалы и методы

В работе использованы питательные среды, предназначенные для выделения *E. coli*, различных производителей: среда Левина (HiMedia) [6], лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 (ФБУН ГНЦ ПМБ) [7], хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli* (Merck) [8], дезоксихолат-лактозный агар (HiMedia), лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью (Merck), желчный глюкозный агар с фиолетовым красным (Bio-Rad) [9], агар Макконки-ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ), сорбитол *E. coli* O157:H7 (ФБУН ГНЦ ПМБ), среды Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Merck, HiMedia, Conda); триптон-соевый агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) [6–10]. Все питательные среды готовили в соответствии с прилагаемыми инструкциями по применению.

Сравнительные исследования питательных сред проводили по значимым биологическим показателям: производительность, специфичность и селективность согласно требованиям ГОСТ 11133-2016 «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды» [11].

- Производительность питательной среды (PR) – это степень роста целевого микроорганизма на питательной среде при определенных условиях.

- Селективность питательной среды – это степень ингибирования нецелевого микроорганизма на/в селективной питательной среде при определенных условиях.

- Специфичность питательной среды – это демонстрация при определенных условиях того, что нецелевые микроорганизмы не проявляют те же визуальные характеристики, что целевые микроорганизмы [11, 12].

Для контроля качества питательных сред по микробиологическим показателям использовали целевые (для выявления и подсчета) и нецелевые (не демонстрируют признаков, характерных для целевого микроорганизма) тест-штаммы микроорганизмов, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»: *E. coli* ATCC 25922; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 79; *Klebsiella pneumonia* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 и изоляты энтеробактерий, выделенные из кормов: *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* и *Proteus*.

Исследования проводили в соответствии с требованиями действующих нормативных документов [2–4].

Биохимическую идентификацию изолятов энтеробактерий проводили с помощью стрипов API 20E.

Используя стерильный 0,9%-й раствор натрия хлорида, готовили взвесь культуры, оптическая плотность которой соответствовала 10 ед. по стандартному образцу мутности (СОС-42-28-85). Из полученной суспензии готовили 10-кратные разведения (10^{-2} – 10^{-8}) путем последовательного переноса 0,5 мл взвеси культуры в пробирки с 4,5 мл стерильного 0,9%-го раствора натрия хлорида. Посевная доза составила 120 микробных клеток. Учет результатов проводили

через 18–20 ч инкубации посевов при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ путем визуального определения количества, размера и характера роста колоний.

Результаты и обсуждение

Назначение и основные характеристики используемых в работе питательных сред представлены в табл. 1.

Анализируя данные, можно заявить, что на сегодняшний день существует довольно широкий спектр питательных сред различных производителей для выделения энтеробактерий и *E. coli*. Питательные среды сконструированы таким образом, чтобы использовать ростовые особенности энтеробактерий для их выявления по способности конвертировать тот или иной субстрат.

Одним из требований, предъявляемым к питательным средам, является морфологическая оценка роста целевых штаммов и полное или частичное ингибирование роста нецелевых штаммов. На всех испытуемых питательных средах были изучены культурально-морфологические свойства и эксплуатационные критерии с использованием тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922; *E. aerogenes* ATCC 13048 NCTC

10006; *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 79; *K. pneumonia* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603.

Для определения селективности испытуемых питательных сред качественным методом использовали тест-штаммы *E. faecalis* ATCC 19433 и *S. aureus* ATCC 25923.

Посев тест-штаммов осуществлялся на среды согласно требуемому разведению по ГОСТ 11133-2016 (*E. coli* по 0,1 мл из разведения 10^{-6} и *S. aureus* / *E. faecalis* по 0,1 мл из разведения 10^{-4}). Посевы инкубировались при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч.

Результаты биологического контроля качества питательных сред различных производителей представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что на питательных средах, согласно заявленным характеристикам, отмечался выраженный рост целевого тест-штамма *E. coli*. Практически на всех исследуемых средах полностью подавлен рост грамположительных нецелевых тест-штаммов *E. faecalis* и *S. aureus*, за исключением среды Левина, на которой *S. aureus* показал слабо выраженный рост в виде бесцветных колоний.

Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на различных питательных средах представлен на рис. 1–12.

Таблица 1. Характеристика питательных сред для выделения *E. coli*

№ п/п	Наименование среды	Назначение	Характеристики среды
1.	Среда Левина	Для выделения и дифференциации патогенных и условно патогенных энтеробактерий, а также для выделения стафилококков	Метиленовый синий и эозин в определенной степени подавляют рост грамположительных микроорганизмов. Данные красители служат в качестве дифференцирующих индикаторов ферментации лактозы
2.	Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	Для обнаружения и учета <i>E. coli</i> и колиформных бактерий	Ингибирующие свойства придает гептадецилсульфат натрия (Тергитол-7), подавляющий роение протей и рост большинства грамположительных микроорганизмов
3.	Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	Для одновременного определения колиформ и <i>E. coli</i>	Наличие в среде пептонов, пирувата, сорбитола и фосфатного буфера обеспечивает быстрый рост колоний, даже поврежденных клеток колиформных бактерий
4.	Дезоксихолат-лактозный агар	Для выделения и подсчета колиформных бактерий	Оптимальные концентрации дезоксихолат натрия и цитрата натрия подавляют рост грамположительных бактерий. Лактоза помогает дифференцировать кишечные бактерии
5.	Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью	Для обнаружения и учета колиформных бактерий, включая <i>E. coli</i>	Кристаллический фиолетовый и соли желчных кислот подавляют рост большинства грамположительных сопутствующих бактерий
6.	Желчный глюкозный агар	Для детектирования и подсчета энтеробактерий	Одновременное присутствие кристаллического фиолетового и солей желчи; среда ингибирует грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии
7.	Агар Макконки-ГРМ	Для обнаружения и выделения колиформных бактерий и кишечных патогенов	Желчные соли, кристаллический фиолетовый, входящие в состав среды, значительно подавляют рост грамположительной микрофлоры
8.	Среда сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар	Для выделения и дифференциации <i>E. coli</i> O157:H7 и других энтеробактерий по признаку ферментации сорбита	Совокупность компонентов, входящих в состав набора, обеспечивает питательные потребности для роста, дифференциации по признаку ферментации сорбита и ингибиции отдельных видов микроорганизмов
9.	Среда Эндо (Conda)	Для выделения колиформ и других кишечных микроорганизмов	Продуцирование ацетальдегида лактозо-ферментирующими организмами, такими как <i>E. coli</i> , приводит к образованию характерных красных колоний и красной окружающей зоны вследствие реакции ацетальдегида с сульфитом натрия в присутствии фуксина
10.	Агар Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Для выделения энтеробактерий	Совокупность компонентов, входящих в состав набора, обеспечивает питательные потребности для роста, дифференциации и ингибиции отдельных видов микроорганизмов
11.	Среда Эндо (Merck)	Для выявления <i>E. coli</i> и колиформных бактерий	Сульфат натрия и фуксин подавляют рост грамположительных бактерий
12.	Среда Эндо (HiMedia)	Для выделения энтеробактерий	Среда содержит пептон, который обеспечивает азот, углерод, витамины и минералы, необходимые для роста бактерий. Сульфит натрия и основной фуксин делают среду селективной, подавляя грамположительные микроорганизмы

№ п/п	Наименование среды	Диаметр и морфология колоний <i>E. coli</i>	Результаты биологического контроля		
			<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	
1.	Среда Левина	0,5–1,9 мм	Темно-фиолетовые колонии с зеленым металлическим блеском	Наличие роста в виде бесцветных колоний	Отсутствие роста
2.	Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	0,8–2,2 мм	Колонии оранжевого цвета с желтой зоной вокруг	Отсутствие роста	Отсутствие роста
3.	Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	1,7–2,9 мм	Темно-синие и фиолетовые колонии	Отсутствие роста	Отсутствие роста
4.	Дезоксихолат-лактозный агар	0,9–3,0 мм	Розовые с преципитатом вокруг	Отсутствие роста	Отсутствие роста
5.	Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью VRBL	1,0–2,0 мм	Красные колонии, окруженные красноватой зоной преципитации	Отсутствие роста	Отсутствие роста
6.	Желчный глюкозный агар VRBG	2,2–3,5 мм	Розово-красные колонии	Отсутствие роста	Отсутствие роста
7.	Агар Макконки-ГРМ	0,6–2,8 мм	Красные колонии	Отсутствие роста	Отсутствие роста
8.	Среда сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар	1,5–2,5 мм	Малиновые колонии со слабо выраженным металлическим блеском или без него	Отсутствие роста	Отсутствие роста
9.	Среда Эндо (Condo)	0,5–2,0 мм	Красные колонии с металлическим блеском	Отсутствие роста	Отсутствие роста
10.	Агар Эндо ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ)	2,0–2,5 мм	Малиновые колонии с металлическим блеском	Отсутствие роста	Отсутствие роста
11.	Среда Эндо (Merck)	1,2–1,4 мм	Малиновые колонии с зеленоватым металлическим блеском	Отсутствие роста	Отсутствие роста
12.	Среда Эндо (HiMedia)	0,8–1,2 мм	Красные колонии с металлическим блеском	Отсутствие роста	Отсутствие роста

Наименование питательной среды	Номер чашки					Кoeffициент производительности
	1	2	3	4	5	
ТСА	115	116	133	147	93	контроль посевной дозы микроорганизма
Агар Макконки-ГРМ	87	104	103	86	101	0,79
Среда Левина	104	93	92	139	112	0,89
Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	88	94	93	89	94	0,76
Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	86	85	97	99	86	0,75
Дезоксихолат-лактозный агар	91	83	61	57	43	0,55
Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью	69	60	47	63	60	0,50
Желчный глюкозный агар	57	72	76	69	77	0,58
Эндо (HiMedia)	101	107	107	128	110	0,92
Эндо (Merck)	73	67	79	78	66	0,60
Сорбитол-агар	121	122	88	101	99	0,88
Агар Эндо ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ)	121	107	114	102	91	0,88
Эндо (Condo)	97	98	105	106	113	0,86

Все дифференциально-диагностические среды, представленные на рис. 1–12, обеспечивают рост *E. coli*. Морфология, размер и количество колоний соответствуют заявленным производителями характеристикам.

Определение производительности питательных сред проводили следующим образом: в чашки с испытуемыми средами засеивали по 0,1 мл суспензии *E. coli* с концентрацией 10^2 КОЕ/см³. Параллельно осуществлялся контроль посевной дозы тест-штамма микроорганизма путем высева на плотную неселективную питательную среду триптон-соевый агар ТСА (ФБУН ГНЦ ПМБ) (контроль) (табл. 3).

После инкубации посевов в термостате в течение 18–24 ч при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ проводили визуальный контроль и количественный подсчет выросших колоний. Все эксперименты проводили в пяти повторностях.

Для каждой селективной питательной среды был определен коэффициент производительности (P_R), который вычисляли по формуле:

$$P_R = \frac{N_s}{N_o},$$

где N_s – общее количество колоний, полученных на питательной среде, подвергнутой испытанию (количество колоний в чашках);

N_o – общее количество колоний, полученных на определенной контрольной питательной среде, в одной или нескольких чашках.

Результаты по определению производительности питательных сред представлены в табл. 3 и на рис. 13. В ходе испытаний питательных сред для выделения и идентификации

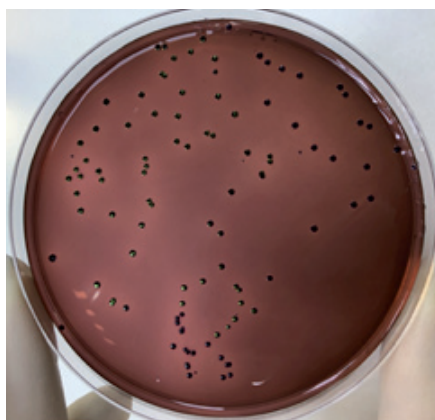


Рис. 1. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Левина.

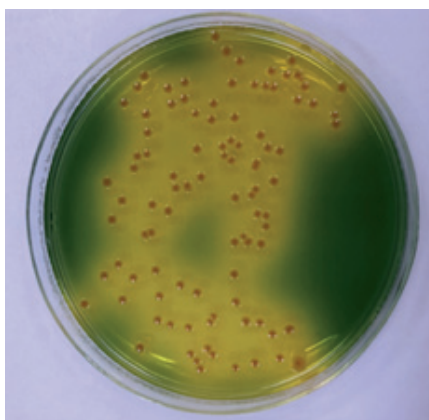


Рис. 2. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7.

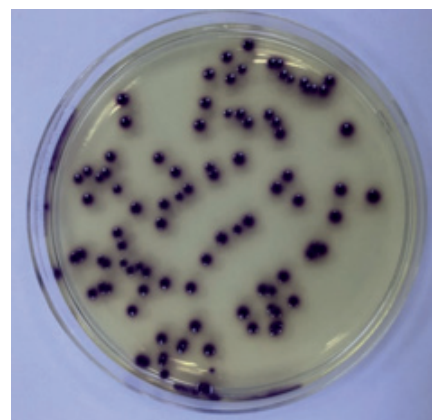


Рис. 3. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Chromocult Coliform.

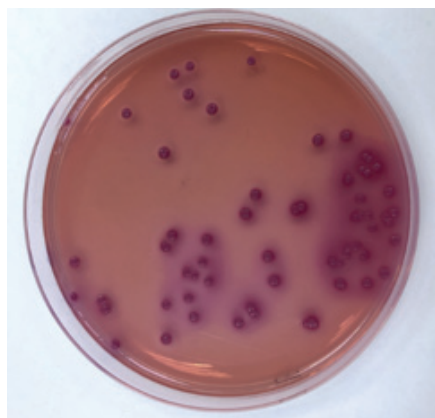


Рис. 4. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на дезоксихолат-лактозном агаре.



Рис. 5. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде VRBL.

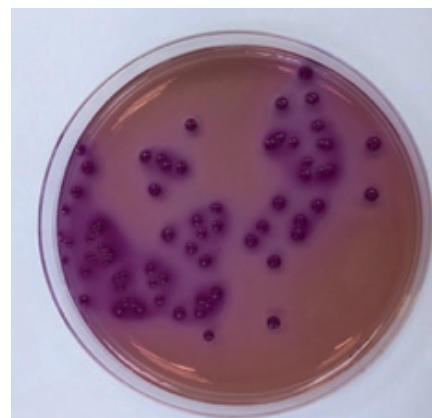


Рис. 6. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде VRBG.

ции энтеробактерий наименее продуктивной средой при посеве контрольного штамма *E. coli* оказались: дезоксихолат-лактозный агар, лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью, желчный глюкозный агар, так как при посевной концентрации тест-штамма *E. coli* – 120 КОЕ/см³ – количество выросших колоний составило всего 57–91 КОЕ.

Коэффициент производительности целевых микроорганизмов на селективных средах должен быть не менее 0,5 и не более 1,4 [11]. По результатам исследований видно, что все среды имели коэффициент производительности $\geq 0,5$. Самый высокий коэффициент производительности PR был по средам Левина, Эндо, Сорбитол-агару. При посевной концентрации 120 КОЕ/см³ тест-штамма *E. coli* на указанных средах количество выросших колоний соответствовало значению на контрольной среде, что свидетельствует о высокой чувствительности испытуемых питательных сред и сопоставимости результатов.

Дифференциально-диагностические питательные среды, используемые для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, могут иметь разные дифференцирующие свойства. На ряде сред проведение дифференциации *E. coli* от прочих энтеробактерий крайне затруднительно, поэтому на следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ специфичности испытуемых питательных сред (табл. 4).

Специфичность испытуемых питательных сред определяли с использованием тест-штаммов: *E. aerogenes* ATCC 13048 NCTC 10006; *S. enterica* subsp. *enterica* serovar

Typhimurium 79; *K. pneumonia* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603 из разведения 10-4.

В результате проведенного анализа специфичности питательных сред для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий было установлено, что дезоксихолат-лактозный агар, агар Макконки-ГПМ, лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью, желчный глюкозный агар проявляют слабовыраженное окрашивание колоний, что приводит к сомнительным результатам дифференциации и необходимости использования дополнительных тестов.

Хромогенный агар для *E. coli* и колиформных бактерий, среды Эндо разных производителей, среда Левина, лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 обеспечивали четкую дифференциацию штаммов *E. coli* от других представителей группы кишечной палочки и были выбраны для дальнейших испытаний.

Следующим этапом работы явился анализ специфичности плотных идентификационных сред при посеве изолятов микроорганизмов, выделенных из кормов животного происхождения, с целью выбора оптимальных питательных сред для проведения исследований в ветеринарных лабораториях.

За период с 01.04.2020 по 31.04.2020 исследовалось 114 проб кормов животного происхождения, выделено 28 культур энтеробактерий. В ходе биохимической идентификации микроорганизмов энтеробактерий, проведенной с помощью стрипов API 20E, выделенные культуры изолятов были определены как *E. coli* (8), *Salmonella* spp., (4), *Proteus mirabilis* (2), *E. aerogenes* (11), *K. pneumoniae* (3).

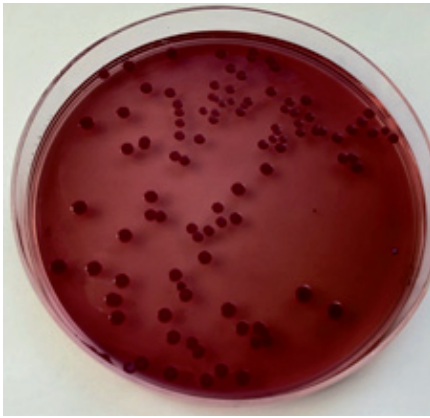


Рис. 7. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Макконки-ГРМ.

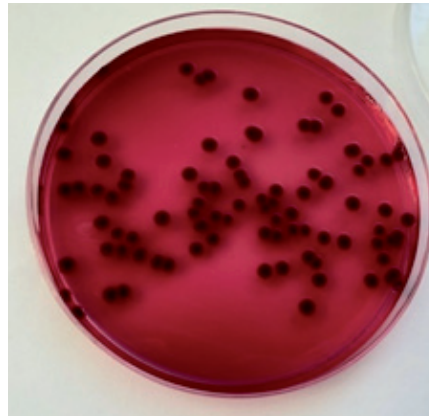


Рис. 8. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде сорбитол *E. coli* O157:H7.

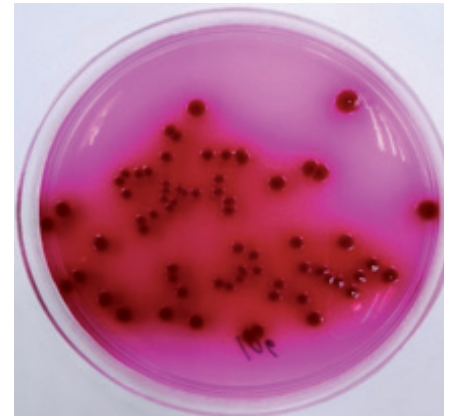


Рис. 9. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Эндо (Conda) (после 48 ч инкубации).

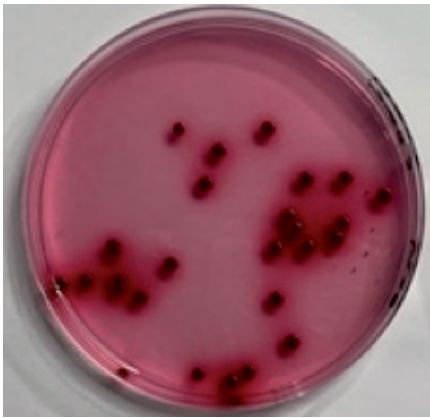


Рис. 10. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ).

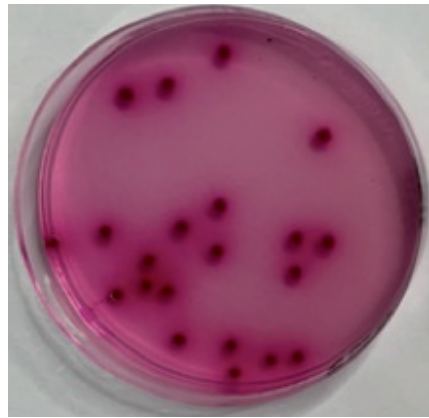


Рис. 11. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Эндо (Merck).

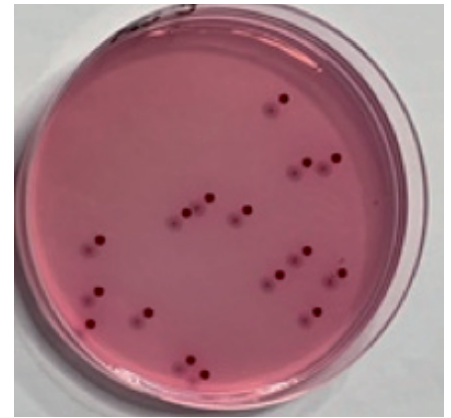


Рис. 12. Рост тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 на питательной среде Эндо (HiMedia).

В дальнейшем для оценки специфичности сред использовали ассоциацию из выделенных изолятов: *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* (табл. 5).

Следует отметить, что четкую дифференциацию колоний энтеробактерий обеспечивали питательные среды: лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 (ФБУН ГНЦ ПМБ), хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli* (Merck) (рис. 14–17). При проведении сравнительных испытаний питательных сред Эндо производителей ФГБУН ГНЦ ПМБ и HiMedia оказалось, что только питательная среда Эндо ГРМ обеспечивала рост выделенных из кормов изолятов *E. coli* с металлическим блеском, что является дополнительным диагностическим признаком при выделении эшерихий. Следует отметить, что при посеве ассоциации микроорганизмов *E. coli* и *Proteus* на средах Эндо превалирующим был рост протей, что затрудняло дифференциацию из-за его способности к роению.

Таким образом, результаты сравнительных испытаний плотных идентификационных сред для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий разных производителей на музейных тест-штаммах и штаммах, выделенных из кормов, показали, что питательные среды лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 (Оболенск) и хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli* (Merck) в ряде случаев превосходят по показателям специфичности и обеспечивают четкую дифференциацию энтеробактерий.

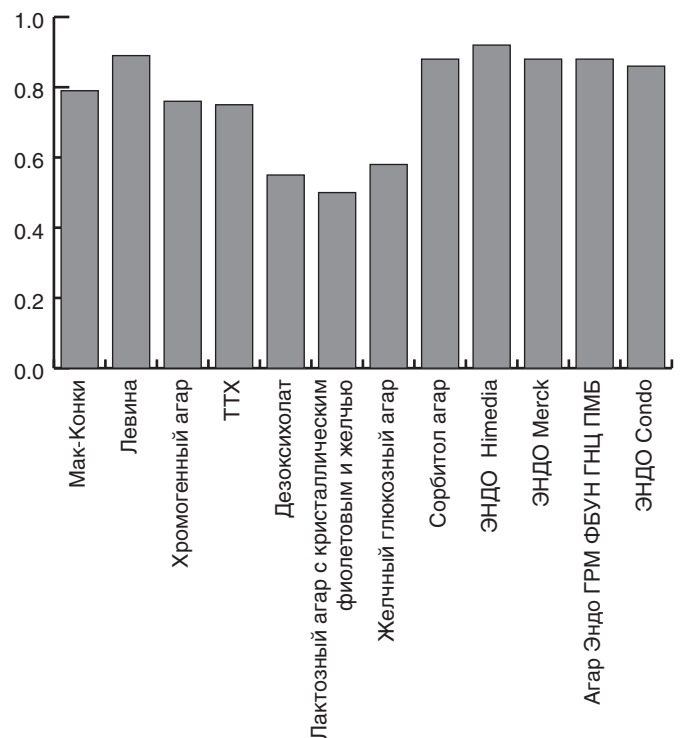


Рис. 13. Коэффициенты производительности питательных сред для выделения энтеробактерий.

Таблица 4. Специфичность питательных сред для выделения *E. coli*

№ п/п	Наименование среды	Характер роста некоторых тест-штаммов энтеробактерий			
		<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048; NCTC 10006;	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium 79	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
1	Среда Левина	Рост подавлен	Бесцветные колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции синерозового цвета	Темно-фиолетовые колонии с зеленым металлическим блеском
2	Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	Зеленовато-желтого цвета колонии	Колонии красного цвета с синей зоной	Зеленовато-желтого цвета колонии	Колонии оранжевого цвета с желтой зоной вокруг
3	Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	Розово-красного цвета колонии	Бесцветные колонии	Розового цвета колонии	Темно-синие и фиолетовые колонии
4	Дезоксихолат-лактозный агар	Розовые с преципитатом вокруг	Бесцветные колонии	Розовые с преципитатом вокруг	Розовые с преципитатом вокруг
5	Лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью	Розового цвета колонии	Бесцветные колонии	Красные колонии, окруженные красноватой зоной преципитации	Красные колонии, окруженные красноватой зоной преципитации
6	Желчный глюкозный агар	Розово-красные колонии	Розово-красные колонии	Розово-красные колонии	Розово-красные колонии
7	Агар Макконки-ГРМ	Красные колонии	Бесцветные колонии	Красные колонии	Красные колонии
8	Среда сорбитол <i>E. coli</i> O157:H7 агар	Нежно-розового цвета колонии	Колонии малинового цвета с металлическим блеском	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Малиновые колонии со слабо выраженным металлическим блеском или без него
9	Среда Эндо (Conda)	Нежно-розового цвета колонии	Бледно-розового цвета колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Красные колонии с металлическим блеском
10	Агар Эндо ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Нежно-розового цвета колонии	Бледно-розового цвета колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Малиновые колонии с металлическим блеском
11	Среда Эндо (Merck)	Нежно-розового цвета колонии	Бледно-розового цвета колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Малиновые колонии с зеленоватым металлическим блеском
12	Среда Эндо (HiMedia)	Нежно-розового цвета колонии	Бледно-розового цвета колонии	Большие, выпуклые, частично сливающиеся колонии слизистой консистенции малинового цвета с металлическим блеском	Красные колонии с металлическим блеском

Таблица 5. Выявляемость патогенных энтеробактерий на питательных средах для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий

Наименование среды	Ассоциация <i>E. coli</i> и <i>S. enteritidis</i>	Ассоциация <i>E. coli</i> и <i>P. mirabilis</i>	Ассоциация <i>E. coli</i> и <i>K. pneumoniae</i>	Штамм <i>E. coli</i> , выделенный из корма
Агар Эндо ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ)	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Salmonella</i>	Рост в виде роения колоний бледно-розового цвета	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella</i>	Красные колонии с металлическим блеском
Среда Эндо (HiMedia)	<i>E. coli</i> и единичные колонии <i>Salmonella</i>	Рост в виде роения колоний бледно-розового цвета, единичные красные колонии без металлического блеска	Красные колонии без металлического блеска	Красные колонии без металлического блеска
Лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Salmonella</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Proteus</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella</i>	Колонии оранжевого цвета с желтой зоной вокруг
Хромогенный агар для определения колиформ и <i>E. coli</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Salmonella</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Proteus</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella</i>	Темно-фиолетовые колонии
Среда Левина	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Salmonella</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Proteus</i>	Четкая дифференциация <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella</i>	Темно-фиолетовые колонии с зеленым металлическим блеском

Выводы

На сегодняшний день существует широкий выбор стандартизованных питательных сред для выделения и идентификации энтеробактерий, отличающиеся по составу и назначению. Существующее разнообразие питательных сред

позволяет выделять *E. coli* и одновременно дифференцировать по морфологическим признакам.

Результаты сравнительных испытаний плотных идентификационных сред для обнаружения и учета *E. coli* и колиформных бактерий разных производителей на музейных тест-штаммах и штаммах, выделенных из кормов, показали,

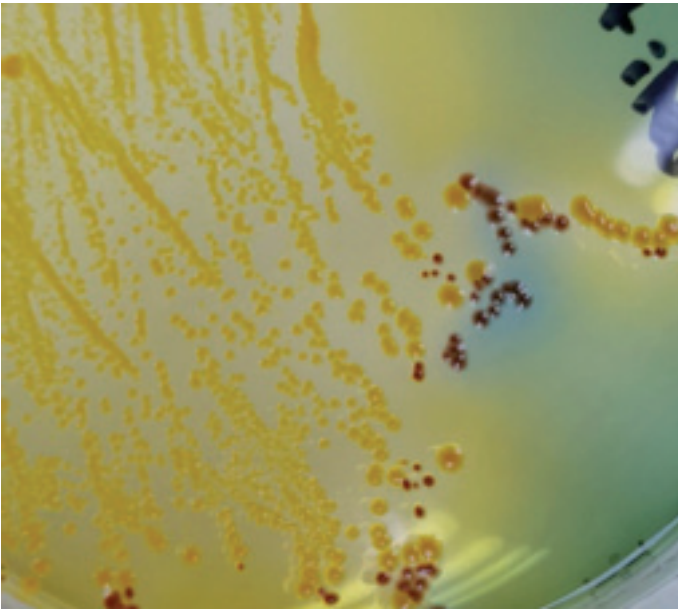


Рис. 14. Рост штамма *E. coli* и *Proteus*, выделенных из кормов, на питательной среде ТТХ-агар.

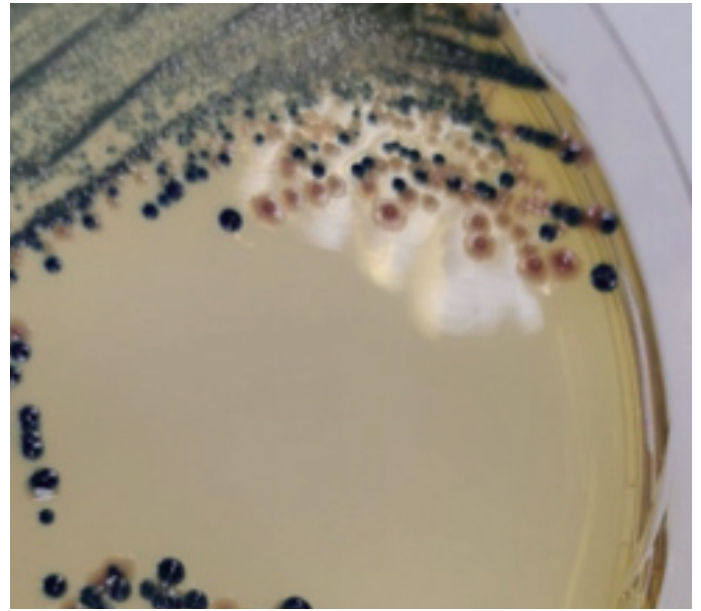


Рис. 15. Рост штамма *E. coli* и *Klebsiella*, выделенных из кормов, на питательной среде хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli*.

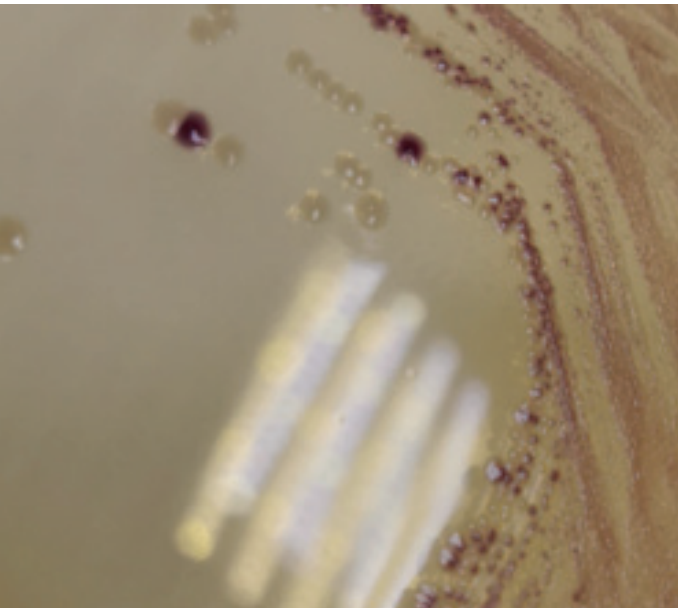


Рис. 16. Рост штамма *E. coli* и *Salmonella*, выделенных из кормов, на питательной среде хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli*.

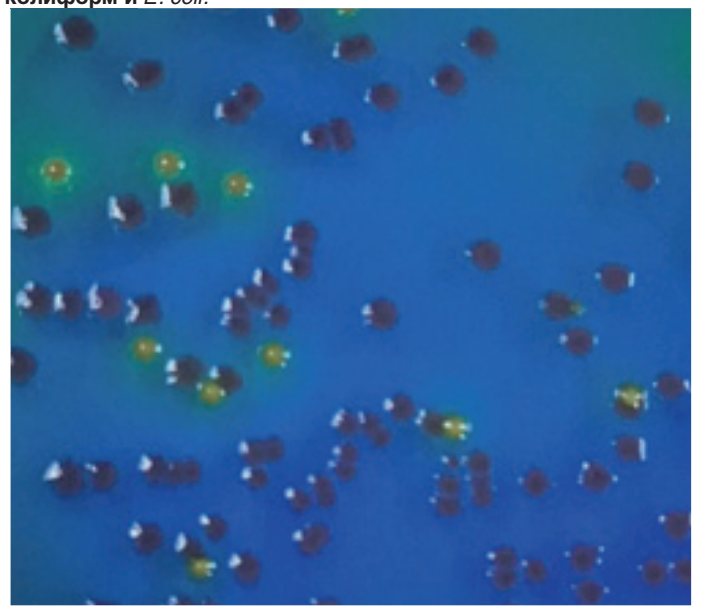


Рис. 17. Рост полевых изолятов *E. coli* и *Salmonella* на питательной среде ТТХ-агар.

что питательные среды лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7 (ФБУН ГНЦ ПМБ) и хромогенный агар для определения колиформ и *E. coli* (Merck) в ряде случаев превосходят по показателям специфичности такие питательные среды, как дезоксихолат-лактозный агар, агар Макконки-ГРМ, лактозный агар с кристаллическим фиолетовым и желчью, желчный глюкозный агар, и обеспечивают четкую дифференциацию энтеробактерий.

По ростовым свойствам не уступают, а в ряде случаев превосходят импортные аналоги испытываемые среды отечественного производства – агар Эндо ГРМ и лактозный ТТХ-агар с тергитолом 7.

Использование совокупности питательных сред для выделения и идентификации энтеробактерий позволит усовершенствовать методы микробиологического анализа кормов,

что существенно повысит результативность бактериологических исследований.

Проведение валидационных процессов методик дает возможность лабораториям проводить исследования на средах, наиболее удобных в использовании, поэтому правильный выбор из такого разнообразия питательных сред будет способствовать повышению объективности получаемых результатов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора и ФГБУ ЦНМВЛ.

Financial support

The work was performed of the program Rospotrebnadzor and the Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1977 Dec;18(3):775-9. DOI: 10.1128/IAI.18.3.775-779.1977
2. Правила бактериологического исследования кормов. Утверждены Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 10 июня 1975 г.
3. ГОСТ 25311-82. Мука кормовая животного происхождения.
4. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. 2000 г.
5. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.
6. HiMedia Laboratories Pvt Limited. A-406. Bhavershwar Plaza, LBS Marg, Mumbai 400 086, India.
7. Диагностические препараты. Каталог продукции. Оболенск: ФБУН ГНЦПМБ.
8. Microbiology Manual. MERCK, LPRO UBA-V.
9. Bio-Rad Laboratories, Inc.
10. Laboratorios CONDA; Calle Forja 9, 28850, Torrejón de Ardoz, Madrid.
11. ГОСТ 11133-2016. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды.
12. Батаева ДС, Панфилова ЕП. Качество питательных сред – залог достоверности и воспроизводимости результатов микробиологических исследований. Все о мясе. 2018;2:41-45. DOI: 10.21323/2071-2499-2018-2-39-43
13. Кремлева А, Скоморина Ю, и др. Оценка распространенности патогенных эшерихий в кормах на территории РФ в 2014–2018 гг. Комбикорма. 2020;3:68-70. DOI: 10.25741/2413-287X-2020-03-4-098
14. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография под ред. д.м.н., проф. А.Ю.Поповой и акад. РАН И.А.Дятлова. М.: Изд. Династия, 2020, с. 368-77.
15. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Ажержмачева НИ, Ершова МГ, Поletaева ЕД. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(9):557-563. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563
16. Шепелин АП, Дятлов ИА. Питательные среды для энтеробактерий. Монография. М.: Изд. Династия, 2017, 231 с.

References

1. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1977 Dec;18(3):775-9. DOI: 10.1128/IAI.18.3.775-779.1977
2. Rules of bacteriological research of feed, 1975. (In Russian).
3. GOST 25311-82. Feeding flour of animal origin. Methods of bacteriological analysis. (In Russian).
4. Guidelines for the bacteriological diagnosis of colibacteriosis (escherichiosis) of animals. 2000. (In Russian).
5. GOST ISO/IEC 17025-2019. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (In Russian).
6. HiMedia Laboratories Pvt Limited. A-406. Bhavershwar Plaza, LBS Marg, Mumbai 400 086, India.
7. Diagnostic drugs. Obolensk: State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. (In Russian).
8. Microbiology Manual. MERCK, LPRO UBA-V.
9. Bio-Rad Laboratories, Inc.
10. Laboratorios CONDA; Calle Forja 9, 28850, Torrejón de Ardoz, Madrid.
11. GOST 11133-2016. Microbiology of food, animal feed, and water. (In Russian).

12. Bataeva DS, Panfilova EP. The quality of the culture mediums is a key to the validity and reproducibility results of microbiological assays. *Vsyo o myase*. 2018;2:41-45. DOI: 10.21323/2071-2499-2018-2-39-43 (In Russian).
13. Kremleva A, Skomorina Yu, et al. Otsenka rasprostranennosti patogennykh esherikhii v kormakh na territorii RF v 2014–2018 gg. *Kombikorma*. 2020;3:68-70. DOI: 10.25741/2413-287X-2020-03-4-098 (In Russian).
14. Mikrobiologicheskii kontrol' kachestva pishchevoi produktsii [Microbiological quality control of food products]. Edited by A.Yu.Popova, I.A.Dyatlov. Moscow: "Dynasty" Publ., 2020, pp. 368-77. (In Russian).
15. Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Azhermacheva NI, Ershova MG, Poletaeva ED. Clinical trials of salmonella enrichment medium. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika)*. 2018;63(9):557-563. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563 (In Russian).
16. Shepelin AP, Dyatlov IA. Pitatel'nye sredy dlya enterobakterii [Nutrient media for enterobacteria.]. Moscow: "Dynasty" Publ., 2017, 231 p. (In Russian).

Информация об авторах:

Кремлева Анна Александровна, научный руководитель ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»
Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23
Телефон: (495) 700-0137
E-mail: viktoriya1409@yandex.ru

Ахметова Лилия Шафиковна, заведующая отделом питательных сред ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»
Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23
Телефон: (495) 700-0137
E-mail: pitatelnie_sredi@mail.ru

Подольская Татьяна Владимировна, главный специалист ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»
Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23
Телефон: (495) 700-0137
E-mail: pitatelnie_sredi@mail.ru

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24
Телефон: (4967) 36-0020
E-mail: shepelin@obolensk.org

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: polosenko@obolensk.org

Information about authors:

Anna A. Kremleva, scientific advisor, Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory
Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation
Phone: (495) 700-0137
E-mail: viktoriya1409@yandex.ru

Lilia Sh. Akhmetova, head of nutrient media department, Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory
Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation
Phone: (495) 700-0137
E-mail: pitatelnie_sredi@mail.ru

Tatiana V. Podolskaya, chief specialist, Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory
Address: 23 Oranzhereinaya str., Moscow, 111622, Russian Federation
Phone: (495) 700-0137
E-mail: pitatelnie_sredi@mail.ru

Anatoly P. Shepelin, MD, PhD, DSc (Biology), deputy director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: 24 Territory «Kvartal A», Obolensk, Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0020
E-mail: shepelin@obolensk.org

Olga V. Polosenko, PhD (Biology), leading researcher of the microbiological research department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: 24 Territory «Kvartal A», Obolensk, Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: polosenko@obolensk.org