

Питательные среды для выявления и культивирования клостридий

Л.В.Домотенко, Я.В.Подкопаев, И.С.Косилова, М.В.Храмов, А.П.Шепелин

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

В статье приводятся общая характеристика клостридий и особенности бактериологических исследований по их обнаружению в клинических образцах и объектах окружающей среды. Описаны питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ, которые могут быть использованы для выявления, культивирования, определения чувствительности клостридий к антимикробным препаратам. Приведены результаты исследований эффективности этих питательных сред. **Ключевые слова:** *Clostridium*, сульфитредуцирующие клостридии, сульфитный агар, железосульфитный агар, среда Вильсона–Блера, среда Китта–Тароцци, тиогликолевая среда, колумбийский агар, антибиотикоустойчивость

Для цитирования: Домотенко Л.В., Подкопаев Я.В., Косилова И.С., Храмов М.В., Шепелин А.П. Питательные среды для выявления и культивирования клостридий. Бактериология. 2021; 6(4): 62–69. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-62-69

Nutrient media for detection and cultivation of clostridia

L.V.Domotenko, Ya.V.Podkopaev, I.S.Kosilova, M.V.Khramov, A.P.Shepelin

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

The article deals with a general characterization of clostridia as well as with specific features of bacteriological assays for their identification in clinical and environmental specimens. Nutrient media produced by FBIS SRCAMB to identify and culture clostridia as well as to determine their antimicrobial susceptibility are described. There are results from the efficiency assessment of the nutrient media.

Key words: *Clostridium*, sulfite-reducing clostridia, sulfite agar, iron sulfite agar, Wilson–Blair medium, Kitt–Tarozzi medium, thioglycollate medium, Columbia agar, antimicrobial susceptibility

For citation: Domotenko L.V., Podkopaev Ya.V., Kosilova I.S., Khramov M.V., Shepelin A.P. Nutrient media for detection and cultivation of clostridia. Bacteriology. 2021; 6(4): 62–69. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-62-69

Общая характеристика клостридий

Представители рода *Clostridium* относятся к числу широко распространенных микроорганизмов. Они встречаются повсеместно в окружающей среде: воздухе, почве, воде, разлагающейся растительности, продуктах питания, а также в кишечном тракте людей и животных [1].

Клостридии вызывают три смертельно опасных заболевания – газовую гангрену (*C. perfringens* и другие «гистотоксические» клостридии), столбняк (*C. tetani*) и ботулизм (*C. botulinum*). Кроме того, они причастны к патологии пищеварительного тракта, включая относительно легко протекающие гастроэнтериты и деструктивные процессы, требующие активного лечения (*C. perfringens*, *Clostridioides difficile*). К патогенным видам также относятся *C. chauvoei*,

C. septicum, *C. novyi* типов А и В, *C. haemolyticum*, *C. sordellii*, *C. colinum*, *C. spiroforme* и др. Патогенность клостридий связана со способностью продуцировать мощные токсины, которые образуются в инфицированном организме или во внешней среде.

К санитарно-показательным микроорганизмам относят клостридии, редуцирующие сульфит-ионы на железосульфитном агаре при температуре $44 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16–18 ч. Эта группа на 90% представлена *C. perfringens*, обитающей в кишечнике большинства людей. Количественный учет клостридий предусмотрен при исследовании потенциальных источников пищевых отравлений – пищевых продуктов (мясных, молочных, рыбных, мяса птицы), почвы, воды открытых водоемов и лечебных грязей.

Для корреспонденции:

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 15.07.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Lubov V. Domotenko, PhD (Chemical Sciences), Leading Researcher of the Laboratory of Culture Media of the Laboratory of Culture Media Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: domotenko@obolensk.org

The article was received 15.07.2021, accepted for publication 27.12.2021

Выявление спор сульфитредуцирующих клостридий рекомендовано при оценке эффективности технологических процессов очистки воды, поскольку эти споры весьма устойчивы к обеззараживанию хлором и другими дезсредствами. В соответствии с требованиями СанПиН 1.2.3685-21 одним из санитарно-микробиологических показателей безопасности воды систем централизованного питьевого водоснабжения, в том числе горячего водоснабжения, является отсутствие спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 см³ воды.

При анализе пищевых продуктов помимо спор определяют наличие вегетативных клеток сульфитредуцирующих клостридий [2, 3].

Особенности культивирования клостридий

Поскольку клостридии являются анаэробными микроорганизмами, важным условием, которое необходимо соблюдать на всех этапах выделения и идентификации анаэробов, является защита этих микробов от токсического действия молекулярного кислорода. Время между взятием материала и его посевом на питательные среды должно быть максимально коротким, важно не допускать перемешивания образца перед тестированием, чтобы не увеличивать содержание кислорода в нем. Замораживание и размораживание образцов также не рекомендуется, поскольку вегетативные клетки сульфитредуцирующих клостридий плохо переносят эту процедуру. Разведение образцов пищевых продуктов желательно проводить в свежеприготовленных растворах с минимально возможным содержанием кислорода. После посева чашки с агаром следует как можно быстрее поместить в анаэробные условия [4].

Для создания анаэробных условий инкубирования используют анаэростаты с газовой смесью для культивирования анаэробов, которая состоит из 80% азота, 10% водорода и 10% углекислого газа. Такой состав создается либо механически за счет удаления (откачивания) воздуха из анаэростата и последующего заполнения газовой смесью, либо химическим способом при использовании специальных газогенерирующих пакетов. Активация газогенерирующих пакетов происходит при добавлении дистиллированной воды, после чего происходит химическое связывание кислорода. В результате концентрация кислорода в анаэростате снижается, а концентрация углекислого газа возрастает.

Анаэробные бактерии необходимо культивировать только на специальных бескислородных средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом (10–150 мВ). Анаэробные условия для роста анаэробов достигаются посевом в питательные среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества, или при глубинном методе посева микроорганизмов в плотные (агаризованные) питательные среды.

В качестве редуцирующих веществ используют кусочки животных тканей (печень, мозг, почки, селезенка), которые связывают растворенный в среде кислород и адсорбируют бактерии. Некоторыми нормативными документами в Российской Федерации для культивирования мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов рекомендована среда Китта–Тароцци – жидкая или полужидкая среда, содержащая в своем составе кусочки печени, мяса или рыбы [3, 5–7]. В МУК 4.2.2316-08 она названа среда Тароцци.

В иностранных источниках питательную среду с кусочками животных тканей называют cooked meat medium [8]. Среда Китта–Тароцци, описанная в разных источниках, может различаться как по составу, так и по способу приготовления.

Для выделения облигатных анаэробов широко используются питательные среды, содержащие такие восстановители, как тиогликолят натрия, цистеина гидрохлорид, сульфит натрия, дитиотреитол и дитионит натрия. Для контроля за степенью насыщения кислородом в состав питательных сред добавляют специальные редокс-индикаторы (метиленовый синий, резазурин). Примером питательной среды, содержащей восстановители и индикатор, может служить используемая для проведения испытаний на стерильность тиогликолевая среда, которая обеспечивает рост как аэробных микроорганизмов, так и строгих анаэробов [9, 10].

Для выявления сульфитредуцирующих клостридий предназначена среда, называемая железосульфитный (сульфитный) агар. Впервые использовать способность клостридий восстанавливать сульфит-ионы с образованием нерастворимого сульфида железа черного цвета в качестве индикатора роста предложили Вильсон и Блер в 1924 г. для выделения из воды *C. perfringens* [11]. Разработанную питательную среду авторы назвали iron sulfite agar (железосульфитный агар). Под этим названием среда описывается в англоязычной литературе. В некоторых российских нормативных документах среду называют средой Вильсона–Блера, что зачастую вызывает путаницу, поскольку средой Вильсона–Блера иногда называют висмут-сульфитный агар, разработанный теми же авторами, но содержащий цитрат висмута и бриллиантовый зеленый и предназначенный для выделения сальмонелл.

Состав коммерческого железосульфитного агара отличается от первоначального: хлорид железа сначала был заменен на железоммонийные квасцы (железа (III) аммония сульфат), а затем на цитрат железа. Введение цитрата железа привело к получению более прозрачной среды.

Поскольку, помимо клостридий, и другие бактерии могут образовывать сульфиды, их вегетативные формы должны быть удалены из исследуемых образцов соответствующей обработкой (например, пастеризацией). Иногда для селективного выделения клостридий рекомендовано использование питательных сред, содержащих антибиотики, например триптозо-сульфит-циклосериновый и сульфит-полимиксин-неомициновый агары [5, 12]. Среда с добавлением цикloserина не требует пастеризации, позволяет обнаруживать вегетативные клостридиальные клетки в мясе и мясных продуктах и ингибирует рост *Bacillus* spp.

Для выделения непосредственно *C. perfringens* из фекалий человека и животных предложены несколько питательных сред, но ни одна из них не является идеальной [13]. На колумбийском агаре с бараньей кровью колонии *C. perfringens* образуют двойные зоны гемолиза: узкую зону полного гемолиза внутри большой зоны частичного гемолиза. Рост других гемолитических бактерий, таких как *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., некоторые штаммы *E. coli* и *C. bifermentans*, может препятствовать правильной идентификации *C. perfringens*. Добавление яичного желтка в чашки с агаром приводит к образованию непрозрачных зон вокруг колоний *C. perfringens*, что связано с его лецитиназной активностью. Однако *C. sordelli* и *C. bifermentans* продуцируют

ферменты, которые тесно связаны с альфа-токсином *C. perfringens* (лецитиназой), и поэтому могут давать ложноположительные результаты. Из сульфит-содержащих питательных сред для выделения *C. perfringens* используют среды с добавлением циклосерина или канамицина и полимиксина.

Недавно разработан новый хромогенный агар для селективного выделения *C. perfringens* (CHROMagar *C. perfringens*). На нем *C. perfringens* формирует оранжевые колонии, а другие микроорганизмы либо не растут, либо образуют колонии сине-зеленого цвета. Сравнительные исследования четырех питательных сред (кровяного колумбийского агара; Perfringens Agar Base, обогащенного 5% стерильной яичной эмульсии, 12 мг/л канамицина сульфата и 30 000 МЕ/л полимиксина В; триптозо-сульфитного агара с добавкой 400 мг/л D-циклосерина и CHROMagar *C. perfringens*) продемонстрировали их одинаковую чувствительность [13]. Но по специфичности хромогенный агар превосходил остальные три среды.

Определение чувствительности клостридий к антимикробным препаратам

Актуальной проблемой современного здравоохранения является распространение устойчивых к антимикробным препаратам (АМП) микроорганизмов, особенно аэробных. Среди анаэробных бактерий повышенной резистентностью ко многим классам антибиотиков отличаются *C. difficile*, вызывающая антибиотикоассоциированную диарею, и клостридии, относящиеся к RIC-группе (*C. ramosum*, *C. innocuum*, *C. clostridioforme*) [14]. Данные о чувствительности к антибиотикам штаммов *C. perfringens* и других видов клостридий, вызывающих газовую гангрену, весьма ограничены. В некоторых публикациях отмечается появление штаммов *C. perfringens*, устойчивых к препарату первого выбора – пенициллину, а также к имипенему, метронидазолу, цефтриаксону, клиндамицину, хлорамфениколу, пенициллину, ванкомицину, бацитрацину и др. [15, 16].

Анализ публикаций показал нестандартность подхода к определению антибиотикоустойчивости представителей рода *Clostridium*. Некоторые авторы использовали диско-диффузионный метод [17], другие – метод микроразведений в бульоне [18] или метод градиентной диффузии [15, 16, 19]. Различия в подходах касаются и используемых питательных сред. Описано применение кровяного колумбийского агара [20], агара и бульона для бруцелл со специальными добавками [16], агара Мюллера–Хинтона с добавками [15].

Ведущими организациями по стандартизации – CLSI (Институт клинических и лабораторных стандартов) и EUCAST (Европейский комитет по определению антимикробной чувствительности) – для определения чувствительности анаэробных бактерий в настоящее время рекомендованы только методы определения минимальной подавляющей концентрации (МПК). CLSI рекомендует проводить тестирование МПК методом микроразведений в бульоне, для которого используют бульон для бруцелл с добавлением 5 мг/л гемина, 1 мг/л витамина K1 и 5% лошадиной крови; и методом разведений в агаре (референтный метод) на агаре для бруцелл с добавлением 5 мг/л гемина, 1 мг/л витамина K1 и 5% бараньей крови [21].

EUCAST для определения чувствительности микроорганизмов со сложными питательными потребностями рекомендует использовать агар или бульон Мюллера–Хинтона с добавлением 5% дефибрированной лошадиной крови и 20 мг/л никотинамидадениндинуклеотида (-NAD), но для грамположительных анаэробных бактерий методики определения чувствительности окончательно не стандартизованы.

Коммерческие питательные среды для выявления и культивирования клостридий

Зарубежные фирмы-производители выпускают ряд коммерческих питательных сред для выявления и культивирования клостридий. Среди них можно выделить анаэробный агар (anaerobic agar), готовую мясную среду (cooked meat medium), железосульфитный агар (iron sulfite agar), усиленную среду для клостридий (reinforced clostridial medium), триптозный агар с сульфитом и циклосерином (TSC), тиогликолевую среду (thioglycollate medium), агар Шедлера (Schaedler agar).

Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработаны технологии производства и осуществляется промышленный выпуск следующих питательных сред, которые могут быть использованы для выделения и культивирования клостридий:

- питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях (среда Вильсона–Блера);
- питательная среда для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях (железосульфитный агар);
- питательная среда для выявления клостридий по сульфитредуцирующему признаку сухая (сульфитный агар);
- питательная среда для культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов сухая (среда Китта–Тароцци);
- питательная среда для контроля стерильности сухая (тиогликолевая среда);
- питательная среда для контроля стерильности сухая (тиогликолевая среда с резазурином);
- питательная среда для бактериологических исследований колумбийский агар сухой;
- питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сухая (агар Мюллера–Хинтона II);
- питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллеза сухой (бруцеллагар).

Среда Вильсона–Блера и железосульфитный агар предназначены для санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов, воды, почвы с целью выявления сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях. **Сульфитный агар** предназначен для бактериологических исследований не только в санитарной, но и в клинической микробиологии с целью выявления сульфитредуцирующих клостридий при микробиологической диагностике дисбактериоза кишечника. Эта среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05626).

Необходимость в выпуске идентичных сред различного наименования обусловлена отсутствием единообразия в нормативных документах. Нормативными документами

(ISO, ГОСТы) для выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, включая *C. perfringens*, в пищевых продуктах, воде, почве и др. регламентировано, как правило, использование железосульфитного агара [2]. Тем не менее некоторые стандарты рекомендуют для тех же целей среду Вильсона–Блера [3, 6, 12].

Все три описанные питательные среды имеют сходный компонентный состав, который обеспечивает необходимые для роста и дифференциации сульфитредуцирующих клостридий вещества. Входящий в их состав гидролизат казеина является источником углерода, азота, минералов; дрожжевой экстракт – источником витаминов группы В, которые стимулируют рост бактерий. Железа цитрат и натрия сульфит являются индикаторами продукции сероводорода – кло-

стридии восстанавливают сульфит-ионы до сульфид-ионов, которые вступают в реакцию с ионами железа, образуя черный осадок сульфида железа.

Сульфитный и железосульфитный агар выпускаются в трех модификациях, различающихся концентрацией агара: модификация 1 (1,5 г/л агара), модификация 2 (7,0 г/л агара) и модификация 3 (17,5 г/л агара), и могут быть использованы как в пробирках (модификации 1 и 2), так и в чашках Петри (модификация 3). Среда Вильсона–Блера не имеет модификаций и содержит агар в концентрации 11,0 г/л (рис. 1). По биологическим показателям качества среда Вильсона–Блера, сульфитный и железосульфитный агар не отличаются между собой.

В ходе проведения клинических испытаний сульфитного агара во ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области» и в испытательном центре ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН установлено, что испытываемая питательная среда обладает более высокой чувствительностью по сравнению с контрольной средой, в качестве которой использована среда Вильсона–Блера лабораторного приготовления.

В Центре гигиены и эпидемиологии был проведен анализ 115 проб фекалий с использованием сульфитного агара модификации 2 и 50 проб с использованием сульфитного агара модификации 1. В первом случае сульфитредуцирующие клостридии обнаружены в 52 пробах, а во втором – в 20 пробах. В то же время на контрольной среде положительных результатов было 49 и 19 соответственно.

При исследовании 110 образцов консервов и специй во ВНИИ МП сульфитредуцирующие клостридии выявлены в 15 образцах на каждой из трех модификаций сульфитного агара, а на контрольной среде – только в 10 образцах.

Среда Китта–Тароцци предназначена для бактериологических исследований в санитарной микробиологии с целью выявления облигатно-анаэробных микроорганизмов в пищевых продуктах, пищевом сырье, кормах для животных, объектах окружающей среды, а также для восстановления анаэробных микроорганизмов из лиофилизированного состояния или со среды хранения.

Среда Китта–Тароцци представляет собой набор, состоящий из сухой основы питательной среды (далее – Основа) – 1 банка, и печени говяжьей сухой – 4 пакета (на 100 г Основы) или 5 пакетов (на 125 г Основы). Совокупность компонентов, входящих в состав Основы, обеспечивает рост широкого спектра микроорганизмов, в том числе облигатно-анаэробных. Вязкость питательной среды защищает от быстрого проникновения в нее кислорода. Печень говяжья является редуцирующим кислород компонентом, который обеспечивает анаэробнозис, достаточный для строгих анаэробов.

Среда Китта–Тароцци обеспечивает рост таких строгих анаэробов, как *C. perfringens* и *C. novyi*, через 18–24 ч инкубации (рис. 2).

При разработке технологии производства среды Китта–Тароцци в качестве прототипа была выбрана среда Тароцци лабораторного приготовления на основе перевара Хоттингера по МУК 4.2.2316-08. В результате проведенных исследований полученная среда Китта–Тароцци превосходила прототип по показателям скорости роста и эффектив-

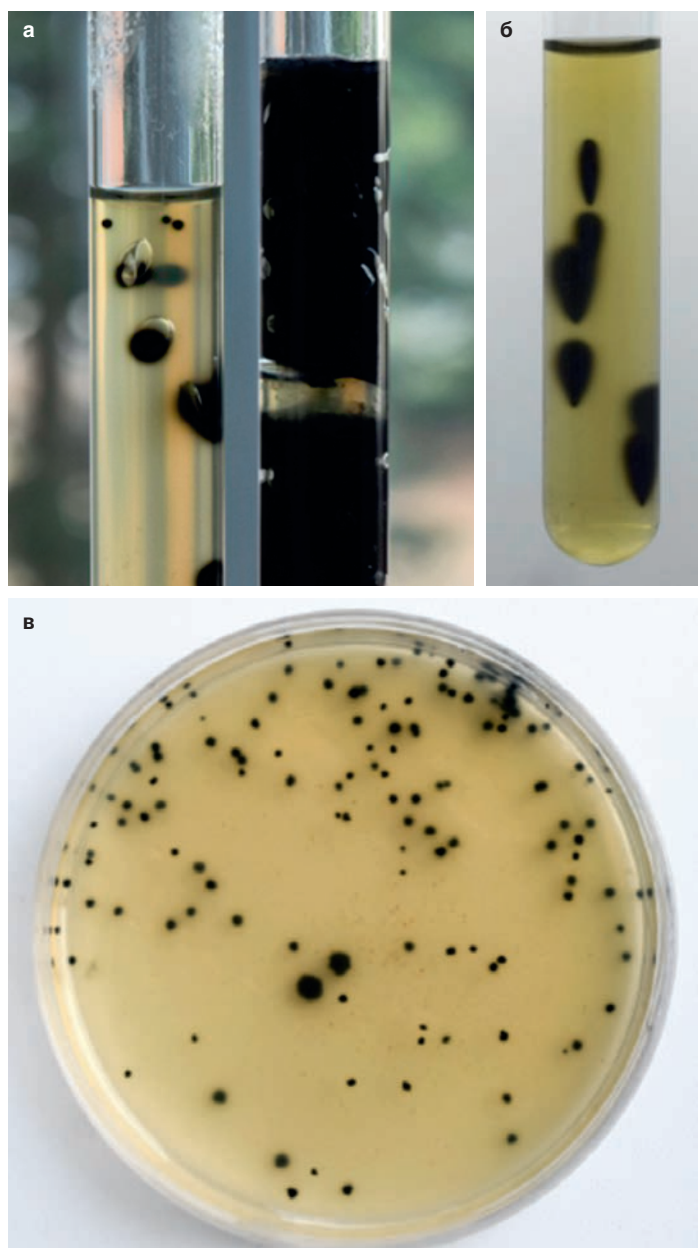


Рис. 1. Рост *C. perfringens* через 18 ч инкубирования:
а) *C. perfringens* ATCC 13124 на среде Вильсона–Блера;
б) *C. perfringens* ATCC 10543 на железосульфитном агаре модификации 1;
в) *C. perfringens* ATCC 13124 на железосульфитном агаре модификации 3 (глубинный посев).

ности среды. В частности, через 18 ч инкубирования выход микробных клеток *C. perfringens* ATCC 13124 с 1 мл среды Китта–Тароцци был выше на 43%, *C. novyi* 198 – на 37%, а *C. sporogenes* ATCC 19404 – на 29%, чем со среды Тароцци лабораторного приготовления.

Тиогликолевая среда – универсальная питательная среда для выращивания широкого спектра анаэробных и аэробных микроорганизмов. В нашем Центре осуществляется выпуск двух вариантов тиогликолевой среды. Первый – тиогликолевая среда по ТУ 9398-040-78095326-2008, она зарегистрирована в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03235) и предназначена для бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии с целью контроля стерильности лекарственных средств, медицинских иммунологических препаратов. Второй вариант – это тиогликолевая среда с резазурином по ТУ 20.59.52-328-78095326-2020, она не является медицинским изделием и предназначена для проведения испытаний на стерильность различных лекарственных средств и парфюмерно-косметической продукции, для которых установлены требования стерильности.

Оба варианта тиогликолевой среды содержат редуцирующие компоненты – натрия тиогликолят и цистеина гидрохлорид, которые обеспечивают уровень окислительно-восстановительного потенциала, достаточный для строгих анаэробов, а вязкость питательной среды защищает от быстрого проникновения кислорода. Тиогликолят натрия является инактиватором ртутных соединений, поэтому питательная среда может быть использована при исследовании образцов, содержащих ртутные консерванты. В состав тиогликолевой среды с резазурином дополнительно входит окислительно-восстановительный индикатор резазурин, который

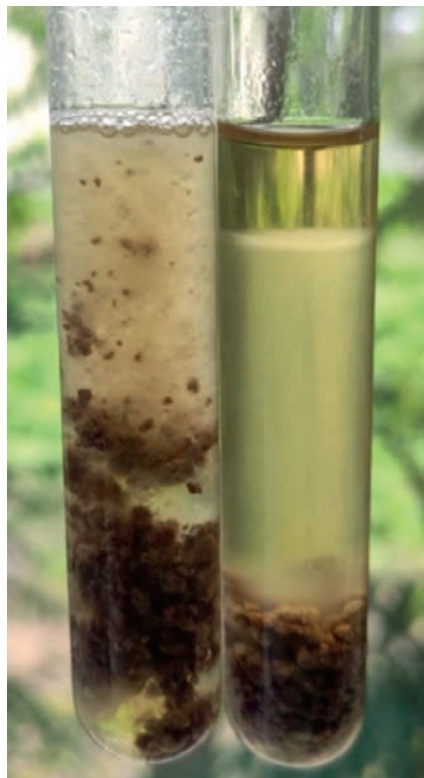


Рис. 2. Рост *C. perfringens* ATCC 13124 (слева) и *C. novyi* 198 (справа) через 18 ч инкубирования на среде Китта–Тароцци.

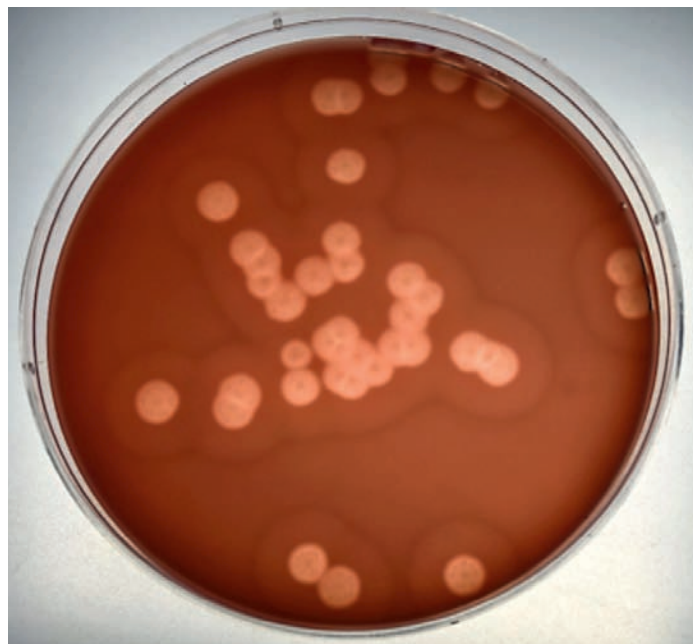


Рис. 3. Рост *C. perfringens* ATCC 13124 через 18 ч инкубирования на колумбийском агаре с добавлением 5% дефибрированной бараньей крови.

позволяет визуально оценить насыщенность среды кислородом по изменению ее цвета со светло-желтого на красный.

В соответствии с требованиями ОФС 1.2.4.0003.15 «Стерильность» (ГФ РФ XIV изд.) контроль качества тиогликолевой среды по биологическим показателям необходимо осуществлять с использованием семи тест-штаммов: *Alcaligenes faecalis* 415, *C. novyi* 198, *C. sporogenes* ATCC 19404, *Bacillus subtilis* 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* NCTC 885-653. В ФБУН ГНЦ ПМБ с использованием этих семи тест-штаммов проведены сравнительные испытания обоих вариантов тиогликолевой среды собственного производства и трех аналогичных питательных сред иностранных производителей: Thioglycolate Medium G (Merck, кат. №1.16761.0500), Difco Fluid Thioglycollate Medium (Becton Dickinson, кат. №225650) и Thioglycollate Fluid Medium European Pharmacopoeia, USP (Pronadisa, кат. №905091). Через 48 ч инкубирования на всех исследованных средах характер роста шести штаммов (*A. faecalis* 415, *C. sporogenes* ATCC 19404, *B. subtilis* 6633, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538 и *C. albicans* NCTC 885-653) не отличался между собой и соответствовал требованиям ОФС 1.2.4.0003.15. В то же время штамм *C. novyi* 198 вырос при посеве бактериальной суспензии из разведений 10^{-4} и 10^{-5} только на тиогликолевых средах отечественного производства, а на исследованных иностранных питательных средах рост отсутствовал.

Колумбийский агар – высокопитательная среда общего назначения, используемая для выделения и культивирования широкого спектра микроорганизмов из клинических и неклинических образцов. Для выделения и культивирования требовательных микроорганизмов в среду добавляют от 5 до 10% дефибрированной крови животных, наиболее часто – дефибрированную баранью кровь. Колумбийский агар рекомендован Фармакопеей США (USP), Европейской

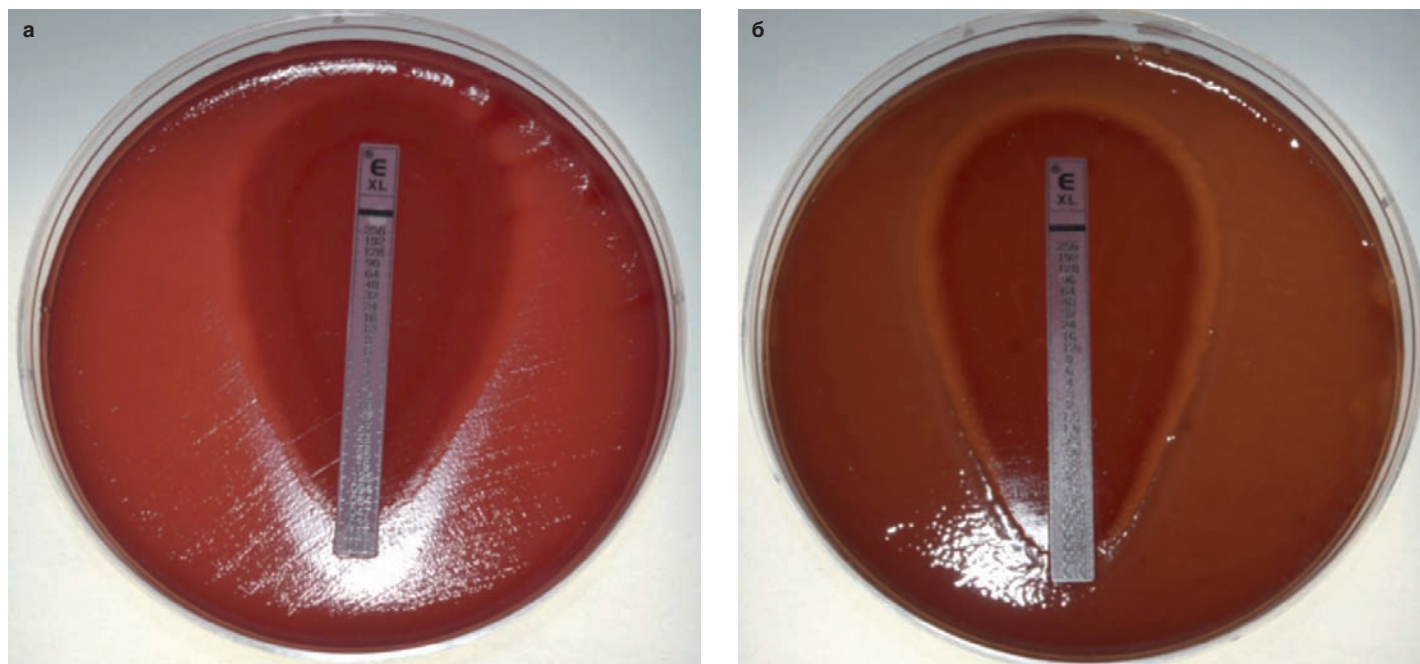


Рис. 4. Результаты определения значений МПК амоксициллина/клавулановой кислоты для *C. perfringens* ATCC 13124 через 18 ч инкубации при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$:

- а) на агаре Мюллера–Хинтон II с добавлением лошадиной крови и β -NAD;
 б) на бруцеллагаре с добавлением гемина, витамина K1 и бараньей крови.

фармакопеей (EU) и Японской фармакопеей (JP) для испытаний нестерильной продукции на наличие клостридий.

Колумбийский агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ зарегистрирован в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03235). Кровяной агар, приготовленный на основе этой среды, обеспечивает в анаэробных условиях рост клостридий, включая *C. perfringens*. При культивировании *C. perfringens* формируются типичные колонии с характерными двойными зонами гемолиза (рис. 3).

Питательные среды для определения чувствительности к antimicrobial препаратам

Агар Мюллера–Хинтон II предназначен для определения чувствительности микроорганизмов к АМП диско-диффузионным методом и может быть использован для определения МПК методом градиентной диффузии с помощью E-тестов. Бруцеллагар предназначен для культивирования и выделения бруцелл из клинического материала и пищевых продуктов животного происхождения при их бактериологическом исследовании.

В ходе лабораторных исследований показана принципиальная возможность использования обеих питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ (агара Мюллера–Хинтон II и бруцеллагара) при определении МПК для двух тест-штаммов: *C. perfringens* ATCC 13124 и *C. sporogenes* ATCC 19404. Значения МПК трех АМП сравнивали с результатами, полученными на аналогичных питательных средах иностранного производства: Mueller Hinton II Agar (BD BBL, кат. №211438) и Brucella Agar (BD BBL, кат. №211086). Для тестирования в оба агара Мюллера–Хинтон II добавляли 5% лошадиной крови и 20 мг/л β -NAD, а в оба бруцеллагара – 5 мг/л гемина, 1 мг/л витамина K₁ и 5% бараньей крови.

Как показали результаты, значения МПК исследованных антибиотиков в отношении проанализированных штаммов были идентичны на всех используемых питательных средах (рис. 4). Так, значение МПК амоксициллина/клавулановой кислоты составляло 0,032 мг/л, ампициллина/сульбактама – 0,023 мг/л, а меропенема – 0,023 мг/л для *C. perfringens* ATCC 13124. Значение МПК амоксициллина/клавулановой кислоты составляло 0,094 мг/л, ампициллина/сульбактама – 0,064 мг/л, а меропенема – 0,047 мг/л для *C. sporogenes* ATCC.

Проведенные нами исследования и анализ публикаций, посвященных определению чувствительности клостридий к АМП [14–20], показывают необходимость дальнейшего исследования и стандартизации методики определения антибиотикочувствительности клостридий.

Заключение

Клостридии широко распространены в окружающей среде и представляют собой довольно разнородную группу. Количественному учету при исследовании потенциальных источников пищевых отравлений – пищевых продуктов, почвы, воды открытых водоемов и лечебных грязей – подлежат сульфитредуцирующие клостридии, относящиеся к санитарно-показательным микроорганизмам. В соответствии с требованиями нормативных документов для их выявления и подсчета используются питательные среды. Большинство питательных сред содержат соль сернистой кислоты (сульфит) и растворимую соль железа, что позволяет выявлять клостридии по способности восстанавливать сульфиты. К числу таких питательных сред относятся среда Вильсона–Блера, железосульфитный и сульфитный агар. Выбор других питательных сред (среда Китта–Тароцци, колумбийский агар, тиогликолевая среда) зависит от цели и задач исследования.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Благодарности

Выражаем огромную благодарность за оказанную помощь при проведении клинических испытаний сульфитного агара сотрудникам ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области» и испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН, особенно к.т.н. Юлии Константиновне Юшиной.

Gratitude

The authors express their deep gratitude for the assistance in conducting clinical trials of sulfite agar to the staff of the FBUZ "Center for Hygiene and Epidemiology in the Kaluga Region" and the testing center of the FGBNU "FSC Food Systems named after VM Gorbатов" of the Russian Academy of Sciences, especially Yulia K. Yushina, Ph.D.

Литература

1. Лобзин ЮВ, Кветная АС, Скрипченко НВ, Железова ЛИ. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021;98(1):91-103. DOI: 10.36233/0372-9311-37
2. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях: ГОСТ 29185-2014 (ISO 15213:2003). М.: Стандартинформ; 2015.
3. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий: ГОСТ 7702.2.6-2015. М.: Стандартинформ; 2016.
4. Clostridia in medical, veterinary and food microbiology – Diagnosis and typing. Ed.-in-chief Mainil J. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2006.
5. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе: ГОСТ 10444.1-84. М.: Стандартинформ; 2010.
6. Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям: ГОСТ 7702.2.0-2016. М.: Стандартинформ; 2016.
7. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
8. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 4th ed. CRC press; 2010.
9. Clinical veterinary microbiology. Ed. by Markey B. 2nd ed. Elsevier Health Sciences; 2013.
10. Curtis GDW, Baird RM, Corry JEL (ed.). Handbook of culture media for food and water microbiology. 3rd ed. Royal Society of Chemistry; 2011.

11. Wilson WJ, Blair EMMV. The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. The Journal of Pathology and Bacteriology. 1924;27(1):119-121.
12. Продукты пищевые. Метод определения *Clostridium perfringens*: ГОСТ 10444.9-88. М.: Стандартинформ; 2010.
13. Hustá M, Ducatelle R, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Goossens E. A comparative study on the use of selective media for the enumeration of *Clostridium perfringens* in poultry faeces. Anaerobe. 2020 Jun;63:102205. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2020.102205
14. Шильникова ИИ, Дьякова СА, Кулага ЕВ, Соколова ЕН, Терещенко ИВ, Дмитриева НВ. Идентификация и чувствительность к антибиотикам клостридий, включая *Clostridium difficile*, выделенных при инфекционных осложнениях у онкологических больных. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(7):439-444. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-439-444
15. Akhi MT, Bidar Asl S, Pirzadeh T, Naghili B, Yeganeh F, Memar Y, Mohammadzadeh Y. Antibiotic Sensitivity of *Clostridium perfringens* Isolated From Faeces in Tabriz, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015 Jul 25;8(7):e20863. DOI: 10.5812/jjm.20863v2
16. Fourie JJC, Bezuidenhout CC, Sanko TJ, Mienie C, Adeleke R. Inside environmental *Clostridium perfringens* genomes: antibiotic resistance genes, virulence factors and genomic features. J Water Health. 2020 Aug;18(4):477-493. DOI: 10.2166/wh.2020.029
17. Khanna N. Clindamycin-resistant *Clostridium perfringens* cellulitis. J Tissue Viability. 2008 Aug;17(3):95-7. DOI: 10.1016/j.jtv.2008.04.001
18. Pirš T, Avberšek J, Zdovc I, Krt B, Andlovic A, Lejko-Zupanc T, Rupnik M, Ocepek M. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. J Med Microbiol. 2013 Sep;62(Pt 9):1478-1485. DOI: 10.1099/jmm.0.058875-0
19. Tansuphasiri U, Matra W, Sangsuk L. Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005 Jul;36(4):954-61.
20. Poilane I, Cruaud P, Rousseau JG, Torlotin JC, Collignon A. Sensibilité de *Clostridium difficile* au métronidazole par le E-test: influence du milieu de culture [Susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole using the E-test: effect of the culture medium]. Pathol Biol (Paris). 1999 May;47(5):515-8.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 6th ed. M11-A7. CLSI, Wayne, PA.

References

1. Lobzin YuV, Kvetnaya AS, Skripchenko NV, Zhelezova LI. Current notions about etiopathogenic and genetics specific features of *Clostridium perfringens* toxins. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2021;98(1):91-103. DOI: 10.36233/0372-9311-37 (In Russian).
2. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Methods for detection and enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions: GOST 29185-2014 (ISO 15213:2003). Moscow: Standartinform; 2015. (In Russian).
3. Poultry meat, edible offal and ready-to-cook products. Methods for detection and quantity determination of sulfite-reducing clostridium: GOST 7702.2.6-2015. Moscow: Standartinform; 2016. (In Russian).
4. Clostridia in medical, veterinary and food microbiology – Diagnosis and typing. Ed.-in-chief Mainil J. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2006.
5. Canned food. Preparation of reagent solutions, dyes, indicators and culture media for microbiological analysis: GOST 10444.1-84. Moscow: Standartinform; 2010. (In Russian).
6. Poultry slaughtering products, poultry meat ready-to-cook products and the objects of production environment. Sampling methods and the preparation to

- microbiological analyses: GOST 7702.2.0-2016. Moscow: Standartinform; 2016. (In Russian).
7. Methods of control of bacteriological nutrient media: methodical instructions MUK 4.2.2316–08. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2008. (In Russian).
 8. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 4th ed. CRC press; 2010.
 9. Clinical veterinary microbiology. Ed. by Markey B. 2nd ed. Elsevier Health Sciences; 2013.
 10. Curtis GDW, Baird RM, Corry JEL. (ed.). Handbook of culture media for food and water microbiology. 3rd ed. Royal Society of Chemistry; 2011.
 11. Wilson WJ, Blair EMMV. The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. The Journal of Pathology and Bacteriology. 1924;27(1):119-121.
 12. Продукты пищевые. Метод определения *Clostridium perfringens*: ГОСТ 10444.9-88. М.: Стандартинформ; 2010.
 13. Hustá M, Ducatelle R, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Goossens E. A comparative study on the use of selective media for the enumeration of *Clostridium perfringens* in poultry faeces. Anaerobe. 2020 Jun;63:102205. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2020.102205
 14. Shilnikova II, Dyakova SA, Kulaga EV, Sokolova EN, Tereschenko IV, Dmitrieva NV. The Identification and sensitivity to antibiotics of clostridia, including *Clostridia difficile* isolated under infectious complications in oncologic patients. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2016;61(7):439-444. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-7-439-444
 15. Akhi MT, Bidar Asl S, Pirzadeh T, Naghili B, Yeganeh F, Memar Y, Mohammadzadeh Y. Antibiotic Sensitivity of *Clostridium perfringens* Isolated From Faeces in Tabriz, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015 Jul 25;8(7):e20863. DOI: 10.5812/jjm.20863v2
 16. Fourie JCJ, Bezuidenhout CC, Sanko TJ, Mienie C, Adeleke R. Inside environmental *Clostridium perfringens* genomes: antibiotic resistance genes, virulence factors and genomic features. J Water Health. 2020 Aug;18(4):477-493. DOI: 10.2166/wh.2020.029
 17. Khanna N. Clindamycin-resistant *Clostridium perfringens* cellulitis. J Tissue Viability. 2008 Aug;17(3):95-7. DOI: 10.1016/j.jtv.2008.04.001
 18. Pirš T, Avberšek J, Zdovc I, Krt B, Andlovic A, Lejko-Zupanc T, Rupnik M, Ocepek M. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. J Med Microbiol. 2013 Sep;62(Pt 9):1478-1485. DOI: 10.1099/jmm.0.058875-0
 19. Tansuphasiri U, Matra W, Sangsuk L. Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005 Jul;36(4):954-61.
 20. Poilane I, Cruaud P, Rousseau JG, Torlotin JC, Collignon A. Sensibilité de *Clostridium difficile* au métronidazole par le E-test: influence du milieu de culture [Susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole using the E-test: effect of the culture medium]. Pathol Biol (Paris). 1999 May;47(5):515-8.
 21. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 6th ed. M11-A7. CLSI, Wayne, PA.

Информация об авторах:

Подкопаев Ярослав Васильевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: podkopaev@obolensk.org

Косилова Ирина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003
 E-mail: kosilova.irina@gmail.com

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24 ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0079
 E-mail: khramov@obolensk.org

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

Information about authors:

Yaroslav V. Podkopaev, PhD (Biological Sciences), Researcher of the Laboratory of Culture Media Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: podkopaev@obolensk.org

Irina S. Kosilova, Junior Researcher of the Laboratory of Culture Media Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003
 E-mail: kosilova.irina@gmail.com

Mikhail V. Khramov, MD, PhD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0079
 E-mail: khramov@obolensk.org

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0020
 E-mail: shepelin@obolensk.org