

Обнаружение энтерококков в воде: что изменилось после введения СанПиН 1.2-3685-21

Л.В.Домотенко, Т.П.Морозова, А.П.Шепелин

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

Безопасность питьевой воды – один из самых актуальных вопросов, стоящих перед санитарными службами и организациями системы здравоохранения всего мира. В соответствии с современными требованиями к безопасности воды по санитарно-микробиологическим показателям, приведенными в новых СанПиН 1.2-3685-21, введен обязательный контроль содержания в ней энтерококков. Действующими нормативно-методическими документами регламентирован алгоритм обнаружения энтерококков в воде различных источников. Цель данной работы – анализ действующей нормативно-методической базы, регулирующей использование питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков, а также возможности обеспечения лабораторий, проводящих микробиологический анализ воды, отечественными питательными средами.

В работе также рассмотрены вопросы таксономии энтерококков, распространения в окружающей среде, их роли как возбудителей инфекций, возникновения лекарственно-устойчивых штаммов. Проведенный анализ действующих нормативно-методических документов и каталогов продукции отечественных производителей питательных сред показал, что в России налажен промышленный выпуск всего перечня рекомендуемых питательных сред, за исключением хромогенных и флуорогенных.

Ключевые слова: энтерококки, методы выявления и подтверждения, питательные среды

Для цитирования: Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Шепелин А.П. Обнаружение энтерококков в воде: что изменилось после введения СанПиН 1.2-3685-21. Бактериология. 2022; 7(2): 64–71. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-64-71

Detection of enterococci in water: what has changed after the introduction of SanPiN 1.2-3685-21

L.V.Domotenko, T.P.Morozova, A.P.Shepelin

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

Drinking water safety is one of the most pressing issues facing sanitation services and public health organizations around the world. In accordance with modern requirements for water safety in terms of sanitary and microbiological indicators given in the new SanPiN 1.2-3685-21, mandatory control of the content of enterococci in it has been introduced. The current regulatory and methodological documents regulate the algorithm for detecting enterococci in water from various sources. The purpose of this work is to analyze the current regulatory and methodological framework governing the use of nutrient media for the detection and confirmation of enterococci, as well as the possibility of providing laboratories conducting microbiological water analysis with domestic nutrient media. The paper deals also with the taxonomy of enterococci, distribution in the environment, their role as pathogens of infections, the emergence of drug-resistant strains. The analysis of the current normative and methodological documents and product catalogs of domestic manufacturers of nutrient media showed that there is launched the industrial production of almost the entire list of recommended nutrient media in Russian Federation, with the exception of chromogenic and fluorogenic media.

Key words: enterococci, methods of detection and confirmation, culture media

For citation: Domotenko L.V., Morozova T.P., Shepelin A.P. Detection of enterococci in water: what has changed after the introduction of SanPiN 1.2-3685-21. Bacteriology. 2022; 7(2): 64–71. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-64-71

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-2170
E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 05.04.2022 г., принята к печати 30.06.2022

For correspondence:

Lubov V. Domotenko, PhD (Chemical Sciences), Leading Researcher, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB Bld. 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, 142279 Russian Federation
Phone: (4967) 36-2170
E-mail: domotenko@obolensk.org

The article was received 05.04.2022, accepted for publication 30.06.2022

Безопасность питьевой воды – один из самых актуальных вопросов, стоящих перед санитарными службами и организациями системы здравоохранения всего мира. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) дает определение безопасной и доступной воды как важного фактора здоровья людей, независимо от того, используется ли она для питья, бытовых нужд, приготовления пищи или рекреационных целей [1]. Безопасность воды определяется химической, радиационной и эпидемической безопасностью. Эпидемическая безопасность оценивается по санитарно-микробиологическим и паразитологическим показателям. Санитарно-микробиологические показатели направлены на выявление в исследуемом образце микроорганизмов, имеющих непосредственную связь с человеческим организмом [2].

Учитывая актуальность проблемы безопасности воды, в 2010 г. Генеральная Ассамблея ООН приняла резолюцию, в которой признала «право на безопасную и чистую питьевую воду и санитарии как право человека, имеющее существенно важное значение для полноценной жизни и полного осуществления всех прав человека» [3]. Согласно приведенным в резолюции данным, в настоящее время около 884 млн людей не имеют необходимого доступа к безопасной питьевой воде, а более 2,6 млрд – к водопроводной. Около 1,5 млн детей до пяти лет ежегодно умирают от болезней, связанных с употреблением непригодной для питья воды.

В нашей стране с 2018 г. реализуется национальный проект «Экология», а в его рамках – федеральный проект «Чистая вода», которые направлены на повышение качества питьевой воды для населения, в т.ч. для жителей населенных пунктов, не оборудованных современными системами централизованного водоснабжения, а также на экологическое оздоровление водных объектов [4].

В Государственном докладе «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году» отмечено, что результатом выполнения проектов в 2020 г. стало достоверное снижение удельного веса проб воды, не соответствующих гигиеническим нормативам по микробиологическим показателям – на 11,40 и 50,54% по сравнению с 2018 и 2011 гг. соответственно. Качество питьевой воды и присутствие в ней различных химических веществ, микробиологических и паразитологических агентов вероятно способствовали формированию 9,24 случая смерти на 100 тыс. всего населения, что составляет 0,75% от показателя общей смертности, и дополнительных случаев заболеваний: 938,07 случая на 100 тыс. всего населения и 1 898,17 случая на 100 тыс. детского населения [5].

Для повышения безопасности и качества воды научно обоснованы и гармонизированы с международными требованиями санитарно-микробиологические обязательные показатели безопасности питьевой воды централизованного водоснабжения (обобщенные колиформные бактерии, *Escherichia coli*) и энтерококки в новых санитарных правилах и нормах СанПиН 1.2.3685-21 [6].

В соответствии с требованиями СанПиН 1.2.3685-21 с 1 января 2022 г. введено обязательное исследование на наличие энтерококков при определении качества и безопасности питьевой воды, воды поверхностных водных объектов и обеззараженных сточных вод, допустимых к сбросу в по-

верхностные водные объекты. Ранее энтерококки рекомендовалось определять только при превышающем нормативы уровне общих колиформных бактерий с низким числом *E. coli* (<50–100 КОЕ в 100 мл воды), а также в случаях несоответствия оценки качества воды по основным показателям и санитарной ситуации на водных объектах.

Введение данного показателя в качестве индикатора фекального загрязнения воды обусловлено способностью энтерококков к более длительному выживанию в водной среде по сравнению с *E. coli* или термотолерантными колиформными бактериями, их большей устойчивостью к высыханию и хлорированию, а также распространением антибиотикоустойчивых штаммов энтерококков, вызывающих тяжелые инфекции [7, 8].

Методология выявления энтерококков в воде регламентирована нормативными документами. На сегодняшний день действуют ГОСТы и методические указания, описывающие технику проведения исследования [9–13]. Среди них ГОСТ 33463.6-2016 по методам гигиенической оценки системы водоснабжения на железнодорожном подвижном составе; ГОСТ 24849-2014 по методам санитарно-бактериологического анализа воды для полевых условий; МУК 4.2.2959-11 по методам санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического анализа прибрежных вод морей в местах водопользования населения и самый новый ГОСТ 34786-2021 по методам определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и энтерококков в воде питьевой. Следует также отметить ГОСТ ISO 7899-2-2018, подготовленный в Республике Беларусь и принятый Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации. Хотя он не действует в РФ, но является идентичным международному стандарту ISO 7899-2:2000. Известно, что готовятся к выходу новые методические рекомендации.

Общим для всех перечисленных стандартов является использование бактериологического посева на питательные среды. Отличия касаются метода исследования и перечня питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков.

Цель данной работы – анализ действующей нормативно-методической базы, регулирующей использование питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков, а также возможности обеспечения лабораторий, проводящих микробиологический анализ воды, отечественными питательными средами.

Материалы и методы. По текстовым электронным базам данных (PubMed, eLIBRARY, Техэксперт, ISO) отобраны и проанализированы нормативные документы и научные работы согласно ключевым словам. После проведенного анализа отобранной литературы в настоящее исследование в соответствии с темой работы было включено 33 источника.

Характеристика и таксономия. Энтерококки (лат. *Enterococcus*) – род повсеместно распространенных грамположительных бактерий, не образующих спор, облигатно ферментативных хемоорганотрофов. Они представляют собой сферические или овальные клетки, расположенные парами или цепочками; каталазоотрицательные, хотя некоторые виды продуцируют псевдокаталазу, и обычно гомоферментативные, продуцирующие молочную кислоту [14].

Подвижность и пигментация различаются у разных видов; пигментированные виды обычно встречаются среди растений.

Согласно современной таксономии род *Enterococcus* принадлежит семейству *Enterococcaceae*, порядку *Lactobacillales*, классу *Bacilli*, типу *Firmicutes* и домену *Bacteria*. До 1984 г. энтерококки относились к стрептококкам группы D, а с 1984 г. на основе анализа геномной ДНК выделены в отдельный род. Род *Enterococcus* включает более 36 видов. На основании молекулярно-генетических признаков все виды энтерококков разделены на 5 групп (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum* и *E. cecorum*).

Распространение энтерококков. Энтерококки встречаются в воде, почве, растениях и у животных [15]. У человека, как и у других млекопитающих, эти бактерии в основном обнаруживаются в желудочно-кишечном тракте в виде комменсалов, входящих в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и выполняющих важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистой оболочки [16]. Их концентрация в фекалиях обычно составляет 10^5 – 10^8 клеток в 1 г [7]. Основными представителями нормальной микробиоты кишечника человека являются *E. faecalis* (90–95%) и *E. faecium* (5–10%).

Энтерококки, как представители нормальной микрофлоры кишечника человека и теплокровных животных, в большом количестве попадают в окружающую среду: в почву, воздух, воду, растения, пищевые продукты. Они выживают в окружающей среде благодаря своей способности легко адаптироваться к различным условиям: растут в диапазоне температур от 10 до 45°C, в 6,5%-м растворе NaCl при pH 9,6 и могут выживать при 60°C в течение 30 мин [14].

Вода различных источников может быть важным средством передачи инфекционных болезней из-за воздействия патогенных и условно-патогенных организмов, присутствующих в водоемах, включая энтерококки.

Энтерококки – возбудители инфекций. Энтерококки могут стать условно-патогенными бактериями, способными вызывать аутоинфекцию, а при накоплении за пределами своей естественной среды обитания – возбудителями множества инфекций (эндокардита, инфекций мочевых путей, простатита, внутрибрюшной инфекции, раневой инфекции и др.) [17]. Клиническое значение имеют виды *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. mundii*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. pallens* [18]. Отличительной особенностью энтерококков является их способность к образованию биопленок, способствующая устойчивости к целому ряду антибактериальных препаратов, особенно к β -лактамам антибиотикам и аминогликозидам. Многие антибиотики действуют на энтерококки бактериостатически.

В последние годы появились штаммы энтерококков с высокой вирулентностью, обладающие устойчивостью к ванкомицину (vancomycin-resistant enterococcus/VRE). VRE способны вызывать инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [19, 20]. При этом наибольший процент VRE-штаммов характерен для вида *E. faecium*, а вид *E. faecalis* наиболее часто вызывает ИСМП [21]. От пациентов с диагностированной энтерококковой инфекцией были выделены также *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* и *E. raffinosus* [22].

В списке резистентных к лекарственным средствам бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека, который опубликован ВОЗ в 2017 г., бактерии *E. faecium*, устойчивые к ванкомицину, входят в группу с высоким уровнем приоритетности для разработки новых антибиотиков [23].

Методы обнаружения энтерококков в воде. Основным методом обнаружения энтерококков в воде является бактериологический метод по выявлению жизнеспособных бактерий с помощью питательных сред.

Молекулярные методы обнаружения энтерококков в питьевой воде находятся в стадии разработки и используются только в исследовательских целях [24, 25]. В качестве мишени для количественной полимеразной цепной реакции исследователи использовали различные гены: *asa1*, *ace*, *culA*, *gelE*, *hyl* [26], *sodA* [27], *ace* и *gelE* [28]. В исследовании TPitkänen et al. показано, что использование подходов на основе рибосомальной рРНК значительно повышает чувствительность обнаружения распространенных фекальных энтерококков в водах окружающей среды [29].

Бактериологические методы. Большинство методов подсчета энтерококков на питательных средах основаны на определении активности фермента β -глюкозидазы (эскулиназы), который присутствует в подавляющем большинстве видов и штаммов энтерококков, а также на регистрации биохимических свойств, специфичных для рода *Enterococcus*, на способности расти при температуре 44–45°C, применении селективных добавок, используемых для подавления роста грамотрицательных микроорганизмов и дифференциации от других грамположительных бактерий [30].

Стандартные методы исследования воды включают методы подсчета энтерококков с помощью метода мембранной фильтрации, титрационного метода (или метода ферментации в пробирках) и качественных (ускоренных) тестов с хромогенным или флуорогенным субстратом.

Метод мембранной фильтрации считается современным золотым стандартом для оценки качества воды на наличие энтерококков [7]. Титрационный метод рекомендуется при анализе мутных образцов воды. Для качественного обнаружения энтерококков в воде стали применяться хромогенные и флуорогенные среды, в том числе в многолуночном формате. В ряде сравнительных исследований различных видов воды с использованием бактериологических методов показано, что метод мембранной фильтрации обладал или большей, или равной чувствительностью с коммерческими тестами на основе флуорогенной среды [31–33].

Действующие отечественные нормативно-методические документы, регламентирующие методы по обнаружению энтерококков в воде и их подтверждению, рекомендуют все три бактериологических метода с использованием питательных сред. В таблице приведен перечень питательных сред, рекомендованных различными нормативными документами (НД) для проведения анализа.

Питательные среды. Выбор питательной среды определяется методом обнаружения энтерококков и требованиями НД. Рекомендуемые для проведения анализа питательные среды можно разделить на две основные группы: для выявления (или определения, подсчета) энтерококков и их подтверждения.

К основным питательным средам для подсчета энтерококков методом мембранной фильтрации относятся энтерококк-агар (аналог m-Enterococcus agar) и среда Сланеца–Бартли. Обе среды содержат 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый (ТТХ), который восстанавливается бактериями до нерастворимого формаза, обуславливая темно-красный цвет колоний. Все темно-бордовые колонии, появившиеся при повышенных температурах инкубирования (44–45°C), предположительно можно относить к энтерококкам.

Некоторые стандарты рекомендуют использовать для обнаружения энтерококков желчь-эскулин-азидный агар (Bile Esculin Azide Agar), который рекомендован также для их предварительной идентификации (или подтверждения), основанной на способности энтерококков гидролизовать эскулин. Данная питательная среда содержит желчь, подавляющую рост грамположительных организмов, и азид натрия, ингибирующий рост грамотрицательных микроорганизмов. В состав среды входит цитрат железа. Энтерококки, вырабатывающие фермент эскулиназу, гидролизуют эскулин до

эскулетина (6,7-дигидроксикумарин) и глюкозы. Эскулетин реагирует с цитратом железа, образуя фенольный комплекс железа, который окрашивает питательную среду в цвет от темно-коричневого до черного.

Следует отметить, что название питательной среды – желчь-эскулин-азидный агар – образовано от английского Bile Esculin Azide Agar, и в отечественных НД могут встречаться аналогичные названия данной питательной среды: желчно-эскулиновый агар с азидом натрия, желчно-эскулин-азидная среда и др., которые отражают присутствие в составе желчи, эскулина и азида натрия.

Рекомендуемый требованиями ГОСТ 34786-2021 агар с канамицином, эскулином и азидом натрия (Kanamycin esculin azide agar) подавляет рост сопутствующей бактериальной флоры за счет присутствия канамицина и азида натрия. Образующийся эскулетин формирует комплекс с трехвалентным железом, окрашивая питательную среду в месте роста энтерококков в цвет от оливково-зеленого до черного.

Таблица. Перечень питательных сред для обнаружения и подтверждения энтерококков в воде

НД	Наименование	Питательные среды
ГОСТ 34786-2021	Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и энтерококков	Метод мембранной фильтрации: Для определения: <ul style="list-style-type: none"> • среда Сланеца–Бартли; • энтерококковый агар Chromocult; • энтерококковый (азидный) агар; • стрептококковый агар KF (KF Streptococcus Agar); • основа хромогенного агара для кишечных энтерококков (m-EI Chromogenic Agar Base); • агар желчно-эскулиновый с азидом натрия (желчь-эскулин-азидный агар). Для подтверждения: <ul style="list-style-type: none"> • микроскопия; • солевой агар с ТТХ; • каталазный тест. Качественный метод: <ul style="list-style-type: none"> • среда Readycult Enterococci 100 или аналогичная; • тест-набор Enterolert-DW или аналогичный на основе хромогенного бульона. Определение НВЧ энтерококков: <ul style="list-style-type: none"> • тест-система Quanti-Tray и тест-набор Enterolert-DW или аналогичные
ГОСТ РБ ГОСТ ISO 7899-2—2018	Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков. Часть 2. Метод мембранной фильтрации	<ul style="list-style-type: none"> • Среда Сланеца–Бартли; • желчно-эскулиновый агар с азидом
ГОСТ 33463.6—2016	Системы жизнеобеспечения на железнодорожном подвижном составе. Часть 6. Методы гигиенической оценки системы водоснабжения	Метод мембранной фильтрации Для определения: <ul style="list-style-type: none"> • энтерококк-агар; • среда Сланеца–Бартли. Для подтверждения: <ul style="list-style-type: none"> • тест-системы для идентификации энтерококков или • солевой агар с ТТХ; • желчь-эскулин-азидный агар. Ускоренное выявление: <ul style="list-style-type: none"> • готовые питательные среды на подложках. Сигнальный метод: <ul style="list-style-type: none"> • хромогенный бульон
ГОСТ 24849-2014	Вода. Методы санитарно-бактериологического анализа для полевых условий	Метод мембранной фильтрации: Для выявления: <ul style="list-style-type: none"> • энтерококк-агар или другая азидная среда с ТТХ (например, азидная среда Сланеца–Бартли). Для подтверждения: <ul style="list-style-type: none"> • тест-системы для идентификации энтерококков; • или питательные среды: • солевой агар с ТТХ; • желчь-эскулин-азидный агар. Для ускоренного выявления: <ul style="list-style-type: none"> • готовые питательные среды на подложках. Сигнальный метод: <ul style="list-style-type: none"> • Хромогенный бульон

Таблица. Перечень питательных сред для обнаружения и подтверждения энтерококков в воде (окончание)

МУК 4.2.2959-11	Методы санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического анализа прибрежных вод морей в местах водопользования населения: Методические указания	<p>Метод мембранной фильтрации: Для выделения: <ul style="list-style-type: none"> • среда Сланеца–Бартли или энтерококк-агар. Для подтверждения: <ul style="list-style-type: none"> • микроскопия; • солевой агар с ТТХ; • каталазный тест. Титрационный метод: <ul style="list-style-type: none"> • накопительная щелочно-полимиксиновая среда; • среды для пересева: • молочно-ингибиторная (МИС) или энтерококк-агар, или среда Сланеца–Бартли. Упрощенный метод: <ul style="list-style-type: none"> • титрационный метод с использованием лактозо-пептонной среды для накопления обобщенных колиформных бактерий (ОКБ) и одновременно энтерококков, затем пересев на МИС, среду Сланеца–Бартли или энтерококк-агар </p>
МУК 4.2.xxxx-21 (проект)	Бактериологические методы исследования воды. Методические указания по методам контроля	<p>Метод мембранной фильтрации Выявление: <ul style="list-style-type: none"> • среда Сланеца–Бартли; • энтерококк-агар; • желчно-эскулин-азидная среда или азидный агар с канамицином и эскулином (готовая питательная среда) или другие среды аналогичного качества. Подтверждение: <ul style="list-style-type: none"> • микроскопия; • солевой агар с ТТХ; • каталазный тест. Титрационный метод: <ul style="list-style-type: none"> • 1-й этап –щелочно-полимиксиновая среда; • 2-й этап – МИС, энтерококкагар, среда Сланеца–Бартли, желчь-эскулин-азидная сред или азидный агар с канамицином и эскулином. Упрощенный метод: <ul style="list-style-type: none"> • титрационный метод с использованием лактозо-пептонной среды для накопления ОКБ и одновременно энтерококков, затем пересев на МИС, среду Сланеца–Бартли или энтерококк-агар. Качественный метод: <ul style="list-style-type: none"> • среда ReadyCult Enterococci 100 </p>

Для выявления энтерококков в воде разрешены к использованию хромогенные среды, например m-EI Chromogenic Agar Base – селективная среда для обнаружения и подсчета энтерококков в воде методом мембранной фильтрации. Появление колоний синего цвета подтверждает наличие энтерококков. Различные по объему и разведению пробы могут быть протестированы с помощью данной процедуры одноступенчатой мембранной фильтрации для обнаружения и подсчета энтерококков в питьевой, пресной, родниковой и морской воде. Пептон и дрожжевой экстракт являются источниками питательных веществ, необходимых для роста микроорганизмов: азота, витаминов, минеральных солей и аминокислот. Эскулин гидролизруется энтерококками с образованием эскулетина и декстрозы. Циклогексимид ингибирует большинство грибов, азид натрия ингибирует грамотрицательные бактерии. Х-глюкозид является субстратом для глюкозидазоположительных энтерококков.

Другая разрешенная хромогенная среда Enterococci-Agar for microbiology Chromocult – селективная среда для выделения, дифференциации и подсчета энтерококков в воде, пищевых продуктах и других образцах. Рост энтерококков в среде усилен в результате тщательно отобранного состава пептонов, добавлением в среду фосфатов и твина-80. Азид натрия и соли желчных кислот ингибируют рост сопутствующей микрофлоры. Энтерококки расщепляют специфические хромогенные субстраты, входящие в состав среды, приводя к красному окрашиванию колоний, что позволяет их легко дифференцировать от бесцветных, синих/фиолетовых или бирюзовых колоний других микроорганизмов.

Обнаружение энтерококков титрационным методом согласно международному методу 9230 B Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition [<https://www.standardmethods.org/>] предполагает использование азид-глюкозного бульона (Azide dextrose broth) для посева соответствующих разведений образца воды. При появлении помутнения бульона проводят подтверждающий тест на энтерококки путем посева на желчь-эскулин-азидный агар. Для получения большей точности (90%) выросшие коричнево-черные колонии с коричневыми ореолами подвергают дальнейшей идентификации.

В соответствии с требованиями МУК 4.2.2959-11 титрационный метод проводят с использованием накопительной щелочно-полимиксиновой среды с дальнейшим пересевом на энтерококк-агар, среду Сланеца–Бартли или молочно-ингибиторную среду.

Для быстрого обнаружения энтерококков в воде нормативными документами (ГОСТ 34786-2021, ГОСТ 33463.6-2016, ГОСТ 24849-2014) рекомендован качественный (сигнальный) метод с использованием хромогенных бульонов. Метод позволяет подтвердить наличие кишечных энтерококков в пробе воды по изменению цвета среды через 18–24 ч инкубирования.

Импортозамещающие питательные среды. Практически весь перечень питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков, рекомендованных нормативными документами, выпускается отечественными производителями. В частности, в нашем центре налажено промышленное производство основных питательных сред для энте-

рококков: энтерококк-агара, среды Сланеца–Бартли и желчь-эскулин-азидного агара, используемых при выполнении метода мембранной фильтрации в соответствии с требованиями международных и российских нормативных документов. Энтерококк-агар уже хорошо зарекомендовал себя в микробиологических лабораториях при исследовании различных образцов. Среда Сланеца–Бартли и желчь-эскулин-азидный агар недавно разработаны по программе импортозамещения.

Щелочно-полимиксиновая среда и молочно-ингибиторная среда, необходимые для титрационного метода, производятся другими фирмами. Рекомендованные для качественного (ускоренного) метода хромогенные и флуорогенные среды пока в нашей стране не выпускаются. Но нами уже намечены возможные пути решения этой проблемы.

Заключение

Проведенный анализ действующей нормативно-методической базы, регулирующей использование питательных сред для выявления и подтверждения энтерококков, и каталогов продукции отечественных фирм – производителей питательных сред показал, что в России налажен промышленный выпуск практически всего перечня рекомендуемых питательных сред, особенно для выполнения анализа воды с помощью основного метода мембранной фильтрации.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

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

Литература

1. Питьевая вода [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water> (дата обращения 20.06.2022).
2. Игнатъева ЛП, Потапова МО. Критерии качества воды поверхностных и подземных источников. Эколого-гигиеническая оценка качества питьевой воды, воды водоемов. Иркутск, 2014, 20 с.
3. Право человека на воду и санитарии. Резолюция, принятая на 64-й сессии Генеральной Ассамблеи ООН 28 июля 2010 года. A/RES/64/292. [Электронный ресурс]. URL: <https://undocs.org/ru/A/RES/64/292>
4. О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2020 году. Государственный доклад. М.: Минприроды России; МГУ имени М.В.Ломоносова; 2021, 864 с.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2021, 256 с.
6. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания: СанПиН 1.2.3685-21. Утверждены постановлением Главного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. №2 и введены в действие 01.03.2021.
7. Vyapanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A. Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012;76(4):685-706. DOI: 10.1128/mmr.00023-12
8. Rodrigues C, Cunha MA. Assessment of the microbiological quality of recreational waters: indicators and methods. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*. 2017;2(1). DOI: 10.1007/s41207-017-0035-8
9. Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и энтерококков: ГОСТ 34786-2021. Дата введения 01.01.2022.
10. Качество воды. Обнаружение и подсчет кишечных энтерококков. Часть 2. Метод мембранной фильтрации: ГОСТ ISO 7899-2-2018 (ГОСТ РБ, в РФ не действует).
11. Системы жизнеобеспечения на железнодорожном подвижном составе. Часть 6 Методы гигиенической оценки системы водоснабжения: ГОСТ 33463.6-2016. Дата введения 01.01.2017.
12. Вода. Методы санитарно-бактериологического анализа для полевых условий: ГОСТ 24849-2014 Дата введения 01.01.2016.
13. Методы санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического анализа прибрежных вод морей в местах водопользования населения: Методические указания. Дата введения:29.07.2011. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 114 с.
14. Бондаренко ВМ, Суворов АН. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции. М.: Медицина; 2007, 30 с.
15. Никонов ЕЛ, Попова ЕН, ред. Микробиота. М.: Медиа Сфера; 2019, 256 с.
16. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: Отраслевой стандарт (ОСТ 91500.11.0004-2003). Приказ Минздрава России №231 от 09.06.2003.
17. Любимова АВ, Шаляпина НА, Колодziejewa ВВ, и др. Эпидемиология ванкомицин-резистентных энтерококков в отделениях различного профиля. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(4):48-52.
18. Daniel DS, Lee SM, Gan HM, Dykes GA, Rahman S. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. *J Infect Public Health*. 2017 Sep-Oct;10(5):617-623. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.02.006
19. De Filippis ML, McKee, eds. Molecular typing in bacterial infections, infectious disease. New York: Springer Science. 2012, p. 17-23.
20. Фёдорова АВ, Клясова ГА, Фролова ИН, Хрульнова СА, Ветихина АВ, Капорская ТС, Молчанова ИВ. Антибиотикорезистентность *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, выделенных из гемокультуры от больных с опухолями системы крови, в разные периоды исследования. Онкогематология. 2021;16(1):54-63. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-1-54-63
21. Růžičková M, Vítězová M, Kushkevych I. The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. *Open Medicine*. 2020;15(1):211224. DOI: 10.1515/med-2020-0032
22. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3:46-65.
23. Домотенко, ЛВ, Шепелин АП. Лабораторная диагностика чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Справочник заведующего КДЛ. 2017;8. [Электронный ресурс]. URL: <https://e.zavkdl.ru/577849> (дата обращения: 20.06.2022).
24. Maheux AF, Bissonnette L, Boissinot M, Bernier JL, Huppé V, Bérubé E, et al. Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Res*. 2011 Mar;45(6):2342-54. DOI: 10.1016/j.watres.2011.01.019
25. Maheux AF, Huppé V, Bissonnette L, Boissinot M, Rodrigue L, Bérubé È, Bergeron MG. Comparative analysis of classical and molecular microbiology methods for the detection of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in well water. *J Environ Monit*. 2012 Nov;14(11):2983-9. DOI: 10.1039/c2em30565h

26. Wei L, Wu Q, Zhang J, Guo W, Chen M, Xue L, et al. Prevalence and Genetic Diversity of *Enterococcus faecalis* Isolates from Mineral Water and Spring Water in China. *Front Microbiol.* 2017 Jun 16;8:1109. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01109
27. Devajani D, Dutta TK, Ralte L, et al. Molecular detection of *Enterococcus* with special reference to *Enterococcus faecalis* from water sources and its antimicrobial resistance. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 2021;9(2):287-94.
28. Adeniji OO, Sibanda T, Okoh AI. Molecular detection of antibiotic resistance and virulence gene determinants of *Enterococcus* species isolated from coastal water in the Eastern Cape Province, South Africa. *International Journal of Environmental Studies.* 2021;78(2):208-27. DOI: 10.1080/00207233.2020.1785759
29. Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Siponen S, Vepsäläinen A, et al. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol.* 2013;47(23):13611-20. DOI: 10.1021/es403489b
30. Guidance on the use of Enterococci as an Indicator in Canadian Drinking Water Supplies. Ottawa: Ontario Health Canada. 2020. 25 p.
31. Adcock PW, Saint CP. Development of glucosidase agar for the confirmation of water-borne *Enterococcus*. *Water Res.* 2001 Dec;35(17):4243-6. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00125-7
32. Kinzelman J, Ng C, Jackson E, Gradus S, Bagley R. Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: comparison of two methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jan;69(1):92-6. DOI: 10.1128/AEM.69.1.92-96.2003
33. Maheux AF, Picard FJ, Boissinot M, Huppé V, Bissonnette L, Bernier JL, et al. Analytical limits of three beta-glucosidase-based commercial culture methods used in environmental microbiology, to detect enterococci. *Water Sci Technol.* 2009;60(4):943-55. DOI: 10.2166/wst.2009.428
10. Water quality. Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2. Membrane filtration method: GOST ISO 7899-2-2018 (GOST RB, not valid in the Russian Federation). (In Russian).
11. Life support systems on railway rolling stock. Part 6 Methods for hygienic assessment of the water supply system: GOST 33463.6-2016. Date of introduction 01.01.2017. (In Russian).
12. Water. Methods of sanitary and bacteriological analysis for field conditions: GOST 24849-2014 Date of introduction 01.01.2016. (In Russian).
13. Methods of sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of coastal waters of the seas in places of water use of the population. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 114 p. (In Russian).
14. Bondarenko VM, Suvorov AN. Symbiotic enterococci and problems of enterococcal opportunistic infection. Moscow: "Medicine" Publ., 2007. 30 p. (In Russian).
15. Nikonov EL, Popova EN (eds.). Microbiota. Moscow: "Media Sfera" Publ.; 2019, 256 p. (In Russian).
16. Protocol for the management of patients. Intestinal dysbacteriosis: industry standard (OST 91500.11.0004-2003). Order of the Ministry of Health of Russia No. 231 dated 09.06.03 (In Russian).
17. Lyubimova AV, Chalyapina NA, Kolodzieva VV, et al. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in departments of various profiles. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2016;15(4):48-52. (In Russian).
18. Daniel DS, Lee SM, Gan HM, Dykes GA, Rahman S. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. *J Infect Public Health.* 2017 Sep-Oct;10(5):617-623. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.02.006
19. De Filippis ML, McKee, eds. Molecular typing in bacterial infections, infectious disease. New York: Springer Science. 2012, p. 17-23.
20. Fedorova AV, Klyasova GA, Frolova IN, Khrolnova SA, Vetokhina AV, Kaporskaya TS, Molchanova IV. Antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, isolated from blood culture of patients with hematological malignancies during different study periods. *Oncohematology.* 2021;16(1):54-63. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-1-54-63 (In Russian).
21. Růžičková M, Vítězová M, Kushkevych I. The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. *Open Medicine.* 2020;15(1):211224. DOI: 10.1515/med-2020-0032
22. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:46-65.
23. Domotenko LV, Shepelin AP. Laboratory diagnostics of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. *Directory of the head of the CDL.* 2017;8. URL: <https://e.zavkdl.ru/577849> (дата обращения: 20.06.2022). (In Russian).
24. Maheux AF, Bissonnette L, Boissinot M, Bernier JL, Huppé V, Bérubé E, et al. Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Res.* 2011 Mar;45(6):2342-54. DOI: 10.1016/j.watres.2011.01.019
25. Maheux AF, Huppé V, Bissonnette L, Boissinot M, Rodrigue L, Bérubé É, Bergeron MG. Comparative analysis of classical and molecular microbiology methods for the detection of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in well water. *J Environ Monit.* 2012 Nov;14(11):2983-9. DOI: 10.1039/c2em30565h
26. Wei L, Wu Q, Zhang J, Guo W, Chen M, Xue L, et al. Prevalence and Genetic Diversity of *Enterococcus faecalis* Isolates from Mineral Water and Spring Water in China. *Front Microbiol.* 2017 Jun 16;8:1109. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01109
27. Devajani D, Dutta TK, Ralte L, et al. Molecular detection of *Enterococcus* with special reference to *Enterococcus faecalis* from water sources and its antimicrobial resistance. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 2021;9(2):287-94.
28. Adeniji OO, Sibanda T, Okoh AI. Molecular detection of antibiotic resistance and virulence gene determinants of *Enterococcus* species isolated from coastal water in the Eastern Cape Province, South Africa. *International Journal of Environmental Studies.* 2021;78(2):208-27. DOI: 10.1080/00207233.2020.1785759

References

1. Drinking-water. WHO fact sheet. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water> (accessed 20.06.2022).
2. Ignatieva LP, Potapova MO. Criteria for the quality of water from surface and underground sources. Ecological and hygienic assessment of the quality of drinking water, water reservoirs: a tutorial. Irkutsk, 2014, 20 p. (In Russian).
3. The human right to water and sanitation. Resolution adopted at the 64th session of the UN General Assembly on July 28, 2010. A/RES/64/292. URL: <https://undocs.org/ru/A/RES/64/292> (In Russian).
4. On the state and protection of the environment of the Russian Federation in 2020. State report. Moscow: Ministry of Natural Resources of Russia; Lomonosov Moscow State University; 2021, 864 p (In Russian).
5. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2020. State report. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; 2021, 256 p. (In Russian).
6. Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness of environmental factors for humans: SanPiN 1.2.3685-21. Approved by the Decree of the Chief Sanitary Doctor of the Russian Federation dated January 28, 2021 No 2 and put into effect on 03/01/2021 (In Russian).
7. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A. Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2012;76(4):685-706. DOI: 10.1128/mmb.00023-12
8. Rodrigues C, Cunha MÂ. Assessment of the microbiological quality of recreational waters: indicators and methods. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration.* 2017;2(1). DOI: 10.1007/s41207-017-0035-8
9. Drinking water. Methods for determining the total number of microorganisms, coliform bacteria, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and enterococci: GOST 34786-2021. Date of introduction 01.01.2022. (In Russian).

29. Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Siponen S, Vepsäläinen A, et al. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol.* 2013;47(23):13611-20. DOI: 10.1021/es403489b
30. Guidance on the use of Enterococci as an Indicator in Canadian Drinking Water Supplies. Ottawa: Ontario Health Canada. 2020. 25 p.
31. Adcock PW, Saint CP. Development of glucosidase agar for the confirmation of water-borne *Enterococcus*. *Water Res.* 2001 Dec;35(17):4243-6. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00125-7
32. Kinzelman J, Ng C, Jackson E, Gradus S, Bagley R. Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: comparison of two methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jan;69(1):92-6. DOI: 10.1128/AEM.69.1.92-96.2003.
33. Maheux AF, Picard FJ, Boissinot M, Huppé V, Bissonnette L, Bernier JL, et al. Analytical limits of three beta-glucosidase-based commercial culture methods

used in environmental microbiology, to detect enterococci. *Water Sci Technol.* 2009;60(4):943-55. DOI: 10.2166/wst.2009.428

Информация об авторах:

Морозова Татьяна Павловна, научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Information about authors:

Tatiana P. Morozova, Researcher, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

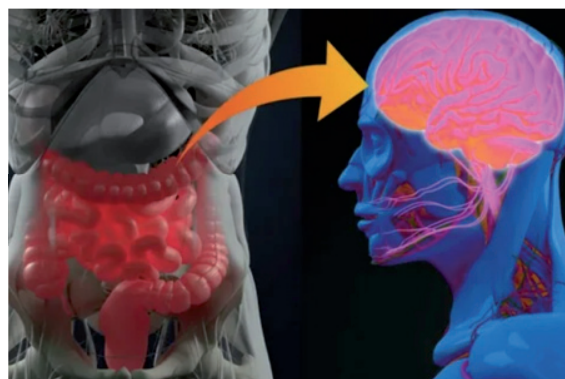
Кишечный бактериофаг связан с лучшей памятью у животных и людей

Триллионы микробов живут в нашем желудочно-кишечном тракте, и все эти клетки имеют свои собственные геномы и белки, многие из которых могут воздействовать на наш организм. Ученые узнают больше о различных способах влияния кишечных микробов на наш мозг и поведение. Новое исследование привлекло внимание к вирусам, живущим в кишечном микробиоме, который иногда называют кишечным вириомом.

Группа ученых показала, что бактериофаги, называемые *Caudovirales* и *Microviridae*, являются важными членами вириома кишечника и связаны с изменениями в тестах памяти и исполнительных функциях. Более высокие уровни фага под названием *Microviridae* были связаны с нарушением исполнительных функций, в то время как более высокие уровни *Caudovirales* были связаны с улучшением памяти. Эти тенденции сохранялись в моделях мышей и плодовых мух, а также в людях.

Это исследование также показало, что люди, которые потребляли больше молочных продуктов, имели более высокий уровень *Caudovirales* в микробиоме кишечника. Предыдущая работа других ученых показала, что люди, которые едят больше молочных продуктов, лучше справляются с когнитивными тестами, что, похоже, подтверждает эти выводы.

Это исследование выявило больше информации об одном аспекте взаимоотношений между микробиомом и мозгом, так называемой оси кишечник-мозг, но предстоит еще много работы, особенно если учесть, что в кишечнике обитает гораздо больше видов бактериофагов. и их воздействие может быть опосредовано бактериями, которые они заражают. Однако исследование показало, что изменения в диете могут улучшить когнитивные функции и память у людей.



Gut Bacteriophage Linked to Better Memory in Animals & Humans | Microbiology [Электронный ресурс]. URL: <https://www.labroots.com/trending/microbiology/22303/gut-bacteriophage-linked-memory-animals-humans> (дата обращения: 01.03.2022).