

УДК 579.843.1:57.083.13:579.61

DOI 10.17021/2021.16.2.62.70

© О.С. Чемисова, А.Б. Мазрухо, Г.Д. Харабаджахан, И.К. Савельева,
Е.М. Санамянц, М.М. Сагакянц, Д.И. Каминский, Е.П. Ульрих, 2021

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ

Чемисова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, и. о. заведующего Музеем живых культур с центром патогенных для человека вибрионов, ведущий научный сотрудник, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, д. 117/40, тел.: (863) 240-35-94, e-mail: chemisova@inbox.ru.

Мазрухо Алексей Борисович, кандидат медицинских наук, и. о. заведующего лаборатории питательных сред, ведущий научный сотрудник, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, д. 117/40, тел.: (863) 240-35-94, e-mail: alexey-mazrukho@rambler.ru.

Харабаджахан Георгий Давидович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории питательных сред, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, д. 117/40, тел.: (863) 240-35-94, e-mail: harabad_gd@antiplague.ru.

Савельева Ирина Константиновна, научный сотрудник лаборатории питательных сред, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, д. 117/40, тел.: (863) 240-35-94, e-mail: plague@aaanet.ru.

Санамянц Елена Михайловна, научный сотрудник Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, д. 117/40, тел.: (863) 240-35-94, e-mail: plague@aaanet.ru.

Сагакянц Маргарита Мардиросовна, научный сотрудник Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, д. 117/40, тел.: (863) 240-35-94, e-mail: margasagak@rambler.ru.

Каминский Денис Игоревич, научный сотрудник лаборатории питательных сред, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, д. 117/40, тел.: (863) 240-35-94, e-mail: kaminsky_di@antiplague.ru.

Ульрих Елена Павловна, младший научный сотрудник лаборатории питательных сред, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, д. 117/40, тел.: (863) 240-35-94, e-mail: Lenchik_rnd_3000@mail.ru.

Цель исследования – изучение основных биологических свойств разработанной питательной среды («Набор ПГСВ») для выделения и первичной идентификации *V. Parahaemolyticus* и селективного тиосульфат-цитратного агара с сахарозой и желчью. **Материалы и методы.** В исследованиях использованы 25 штаммов представителей рода *Vibrio* и 5 тест-штаммов – представителей семейства *Enterobacteriaceae*. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что по чувствительности, показателю прорастания и морфологическим признакам на тест-штаммах, среда для выделения и первичной идентификации *V. parahaemolyticus* не уступает отечественным и зарубежным селективным тиосульфат-цитратным агарам с сахарозой и желчью. Ряд парагемолитических штаммов лучше росли на питательной среде для выделения и первичной идентификации *V. parahaemolyticus*. По селективным свойствам в отношении *E. coli* 18 и *P. vulgaris* HX 19 N 222 новая среда превосходила отечественный селективный тиосульфат-цитратный агар с сахарозой и желчью. В лабораторных испытаниях на модельных смесях показатели селективности всех испытанных сред были схожи, однако возможность идентификации выделенных культур по признаку галофильности с использованием питательной среды для выделения и первичной идентификации *V. parahaemolyticus* указывала на значительные преимущества новой среды. **Заключение.** Изученная среда для выделения и первичной идентификации *V. parahaemolyticus* не уступает промышленным средам аналогичного назначения, обладает необходимыми ростовыми, ингибирующими и дифференцирующими свойствами для выделения парагемолитических вибрионов из объектов окружающей среды и клинического

материала и таким образом обеспечивает свое назначение. Среда зарегистрирована в установленном порядке как изделие медицинского назначения 10.06.2019 г. (№ РЗН 2019/8472). Впервые отечественная бактериология получила возможность обследования людей с помощью специализированной питательной среды, позволяющей значительно повысить диагностическую эффективность и способствовать получению объективных результатов лабораторного контроля.

Ключевые слова: питательные среды, TCBS-агар, *V. parahaemolyticus*, тест-штаммы, модельные смеси, диагностическая эффективность.

ESTIMATION OF DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF A NEW NUTRIENT ENVIRONMENT FOR ISOLATION AND PRIMARY IDENTIFICATION OF PARAHEMOLYTIC VIBRIONS

Chemisova Olga S., Cand. Sci. (Biol.), Acting Head of the Museum of Living Cultures with the Center for Vibrio pathogens for humans, Leading Researcher, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 117/40 Maksima Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia, tel.: (863) 240-35-94, e-mail: chemisova@inbox.ru.

Mazrukho Aleksey B., Cand. Sci. (Med.), Acting Head of the Laboratory of Nutrient Solutions, Leading Researcher, Federal Government Health Institution Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, 117/40 Maksima Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia, tel.: (863) 240-35-94, e-mail: alexey-mazrukho@rambler.ru.

Kharabadzkhakhyan Georgiy D., Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of the Laboratory of Nutrient Solutions, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 117/40 Maksima Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia, tel.: (863) 240-35-94, e-mail: harabad_gd@antiplague.ru.

Savelieva Irina K., Researcher of the Laboratory of Nutrient Solutions, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 117/40 Maksima Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia, tel.: (863) 240-35-94, e-mail: plague@aaanet.ru.

Sanamyants Elena M., Researcher of the Museum of Living Cultures with the Center for Vibrio pathogens for humans, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 117/40 Maksima Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia, tel.: (863) 240-35-94, e-mail: plague@aaanet.ru.

Sagakyants Margarita M., Researcher of the Museum of Living Cultures with the Center for Vibrio pathogens for humans, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 117/40 Maksima Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia, tel.: (863) 240-35-94, e-mail: margagak@rambler.ru.

Kaminskiy Denis I., Researcher of the Laboratory of Nutrient Solutions, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 117/40 Maksima Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia, tel.: (863) 240-35-94, e-mail: kaminsky_di@antiplague.ru.

Ul'rikh Elena P., Junior Researcher of the Laboratory of Nutrient Solutions, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, 117/40 Maksima Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia, tel.: (863) 240-35-94, e-mail: Lenchik_rnd_3000@mail.ru.

The research **aims** to study the main biological properties of the developed nutrient medium for the isolation and primary identification of *V. Parahaemolyticus* and selective thiosulfate citratnogoagar with sucrose and bile. **Materials and methods.** The studies used 25 strains of representatives of the genus *Vibrio* and 5 test strains - representatives of the Enterobacteriaceae family. **Results and discussion.** It was found that by sensitivity, germination index and morphological features on test strains, the medium for isolation and primary identification of *V. parahaemolyticus* is not inferior to domestic and foreign selective thiosulfate-citrate agars with sucrose and bile. Several paragemolytic strains grew better on the nutrient medium for isolation and primary identification of *V. parahaemolyticus*. In terms of selective properties for *E. coli* 18 and *P. vulgaris* HX 19 N 222, the new medium was superior to domestic selective thiosulfate citrate agar with sucrose and bile. In laboratory tests on model mixtures, the selectivity of all tested media was similar, but the possibility of identifying isolated cultures by halophilicity using a nutrient medium for isolation and primary identification of *V. parahaemolyticus* indicated significant advantages of the new medium. **Conclusion.** The studied environment for the isolation and primary identification of *V. parahaemolyticus* is not inferior to industrial media of the same purpose, has the necessary growth, inhibitory and differentiating properties for the isolation of paragemolytic vibrios from objects of the environment and clinical material, and thus provides its purpose. The medium is registered following the established procedure as a medical product of 10.06.2019 (No. RZN 2019/8472). For the first time, domestic bacteriology got the opportunity to examine people with the help of a specialized nutrient medium, which allows to significantly increase diagnostic efficiency and contribute to obtaining objective laboratory control results.

Key words: nutrient medium, TCBS-агар, *V. parahaemolyticus*, test strains, model mixtures, diagnostic efficiency.

Введение. Эпидемиологическая ситуация с пищевыми токсикоинфекциями (ПТИ) в последние годы по-прежнему вызывает оправданные опасения, о чем свидетельствуют ежегодные обращения Роспотребнадзора [9]. Немаловажную роль в поддержании уровня заболеваемости ПТИ играет повышение употребления населением России морепродуктов, в том числе – без термической обработки. Ряд отечественных исследователей констатирует значительное распространение галофильных вибрионов в морских промысловых объектах Дальневосточного региона и пищевых продуктах, производимых из них [2, 4, 8, 10, 14].

Одним из возбудителей, вызывающих острые кишечные заболевания по типу ПТИ и протекающих в виде спорадических случаев и эпидемических вспышек, является *Vibrio parahaemolyticus*. Вызываемые данным патогеном заболевания протекают по типу ПТИ и не передаются непосредственно от человека к человеку, однако в связи с глобальным характером вспышек и их внушительными масштабами в зарубежной литературе принято говорить о «пандемических» штаммах [17, 18]. Патогенность *V. parahaemolyticus* связывают главным образом с продукцией прямого термостабильного (TDH – thermostable direct hemolysin) и родственного ему (TRH – TDH-related hemolysin) гемолизина и уреазы [16, 17, 19, 20, 21].

При эпидемиологическом исследовании случаев ПТИ, связанных с импортными морепродуктами, особое значение приобретает использование унифицированных диагностических методов и применение препаратов, зарегистрированных в Государственном реестре медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения [3]. В настоящее время отсутствуют зарегистрированные специальные отечественные питательные среды, предназначенные для выделения и идентификации парагемолитических вибрионов. Основной питательной средой, рекомендованной за рубежом для выделения и культивирования патогенных для человека вибрионов (в том числе и холерных), является селективный тиосульфат-цитратный агар с сахарозой и желчью (TCBS – Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar) [1, 6, 8, 11, 12, 15]. Отечественный TCBS-агар производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) позиционирован как среда для выделения и культивирования возбудителя холеры и других энтеропатогенных вибрионов [5, 13].

Одним из решений поставленной проблемы является разработка комплексной питательной среды для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов. Принцип действия питательной среды «Набора для приготовления питательной среды для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов» (питательная среда «Набор ПГСВ») основан на селекции микроорганизмов с целью их выделения и последующей первичной идентификации парагемолитических вибрионов по признаку галофильности.

Цель: оценить диагностическую эффективность новой питательной среды для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов (питательная среда «Набор ПГСВ») и TCBS-агара российского и зарубежного производства.

Материалы и методы исследования. Использовано 30 штаммов микроорганизмов, из них 10 тест-штаммов вибрионов (*V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. cholerae* O1 P-1 (145), *V. cholerae* O1EIToM-878, *V. cholerae* O139 MO-45, *V. cholerae* non O1/ non O139P-9741, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. mimicus* ATCC 33653, *V. furnissii* ATCC35016, *V. vulnificus* ATCC27562, *V. damsela* ATCC33539), 5 тест-штаммов представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* 18, *Proteus vulgaris* HX 19 N222, *Salmonella typhi* H 901, *Shigella sonnei* “Sform”, *Sh. Flexneri* 1a 8516) и 15 штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных из объектов внешней среды и от больных людей (из коллекции ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора». Установочные серии питательной среды «Набор ПГСВ» (серия 1, серия 2, годен до 05.2019 г.), полученные в лаборатории питательных сред ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», сравнивали с TCBS-агаром ФБУН ГНЦ ПМБ (серия 15, годен до 06. 2019 г.) и TCBS-Agar Selective HiMedia (lot 0000344200, годен до 01. 2023 г.).

В качестве контрольной среды был использован мясо-пептонный агар с 3 % натрия хлорида (МПА + 3 % NaCl) (серия 27, годен до 05.2019 г.), приготовленный по прописи МУК 4.2.2046-06 [7].

Среды характеризовали по биологическим показателям, регламентированным действующими нормативными документами: чувствительность среды, скорость роста тест-штаммов микроорганизмов, показатель стабильности основных биологических свойств тест-штаммов микроорганизмов,

показатель прорастания тест-штаммов микроорганизмов (в % к контрольной среде), ингибирующие свойства в отношении тест-штаммов микробов-ассоциантов (*E. coli* 18, *P. vulgaris* НХ 19 N 222, *S. typhi* Н 901, *Sh. sonnei* “Sform”, *Sh. flexneri* 8516), дифференцирующие свойства по морфологии и окраске колоний, идентифицирующие свойства между вибрионами на основании теста на галофильность. Подготовку культур тест-штаммов производили в соответствии с принятыми методиками [7]. Дополнительно испытываемые среды были использованы для выделения парагемолитических вибрионов из модельных смесей, искусственно контаминированных тест-штаммом *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Модельные смеси формировали из штаммов *V. parahaemolyticus* с водой открытых водоемов, рыбой свежей, рыбой замороженной и замороженными мидиями; в качестве материала от людей – штаммы *V. parahaemolyticus* и faeces здорового человека. Тест-штамм *V. parahaemolyticus* вносили в материал в трех концентрациях – 10^4 , 10^3 и 10^2 КОЕ/мл.

На первом этапе определяли чувствительность, скорость роста и стабильность основных биологических свойств, тест-штаммов вибрионов, их дифференцирующие свойства и возможность идентификации в тесте на галофильность, в том числе на широком наборе штаммов *V. parahaemolyticus*. На втором этапе устанавливали показатель ингибиции в отношении кишечной палочки, протей, шигелл и сальмонелл, а также возможность выделения возбудителя из модельных смесей. Результаты исследования на первом и втором этапах сравнивали с показателями, указанными в технических условиях (ТУ) на среду «Набор ПГСВ». В заключение среды испытывали на возможность обеспечения роста различных патогенных вибрионов.

Статистическую обработку проводили с использованием программ «Microsoft Excel 2013» («Microsoft», США) и «Statistica 6.0» («StatSoft», США). Критической величиной уровня значимости считали 0,005.

Результаты исследования и их обсуждение. Принцип действия среды «Набор ПГСВ» основан на использовании двух этапов: селекции микроорганизмов с целью выделения, дифференциации и первичной идентификации парагемолитических вибрионов. На первом этапе используется вариант среды «Набор ПГСВ», включающий в себя основу, селективную (алкилсульфаты натрия) и идентифицирующую (натрия хлорид) добавки. С помощью данного варианта питательной среды «Набор ПГСВ» в пробе клинического материала или объекта окружающей среды выявляют наличие *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae non O1/non O139* по характерным морфологическим признакам выросших колоний: желтых, плоско-выпуклых полупрозрачных – у *V. alginolyticus*, *V. cholerae non O1/non O139*; бесцветных или голубоватых плоско-выпуклых – у *V. parahaemolyticus*. На втором этапе выросшие колонии указанных микроорганизмов высевают на вариант среды «Набор ПГСВ», включающий в себя основу и селективную добавку (без идентифицирующей добавки – натрия хлорида) с целью идентификации указанных микроорганизмов по признаку галофильности. На варианте среды «Набор ПГСВ» без идентифицирующей добавки (натрия хлорида) вырастают только негалофильные вибрионы (в частности, *V. cholerae non O1/non O139*).

Установлено, что по основным биологическим показателям среда «Набор ПГСВ» не отличалась от среды TCBS отечественного и зарубежного производства: чувствительность составляла 10^{-7} , показатель прорастания – от 65 до 114 % в зависимости от тест-штамма (табл. 1). Среднее время образования колоний на всех средах составляло 18–20 ч. Колонии по диаметру, цвету и морфологии соответствовали нормативам.

Таблица 1

Биологические показатели среды «Набор ПГСВ» и сред сравнения для тест-штаммов вибрионов

Штаммы	Показатели	Значение по ТУ	Среды			
			«Набор ПГСВ»	TCBS HiMedia	TCBS (Оболенск)	Контроль МПА+3 % NaCl
<i>V. cholerae non O1/non O139</i> -9741	Чувствительность	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}
	Показатель прорастания, %	$\geq 30\%^1$	75,0	111,8	109,2	100,0
	Дифференцирующие свойства	+	+	+	+	–
	Идентифицирующие свойства	+	+	–	–	–

Продолжение таблицы 1

<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Показатель прорастания, %	≥ 30% ¹	79,2	80,0	65,3	100,0
	Дифференцирующие свойства	+	+	+	+	-
	Идентифицирующие свойства	+	+	-	-	-
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Показатель прорастания, %	≥ 30 % ¹	111,9	110,4	114,3	100,0
	Дифференцирующие свойства	+	+	+	+	-
	Идентифицирующие свойства	+	+	-	-	-

Примечание: ¹ – ≥ 30 % от засеянной дозы; «-» – отсутствие возможности обеспечивать проявление данных свойств, «+» – обеспечивает проявление данных свойств

Сравнительные испытания среды «Набор ПГСВ» и сред TCBS на тест-штаммах представителей основных видов патогенных вибрионов дают основания констатировать, что разработанная новая среда не уступает по ростовым свойствам препаратам промышленного производства как по количеству выросших колоний при посеве 100 микробных клеток (м.к.) на агаровую пластинку в чашке Петри, так и по чувствительности при посеве 10 м.к. (табл. 2). Морфология и диаметр выросших колоний были типичными для роста на селективных средах: сахарозопозитивные вибрионы образовывали колонии желтого цвета, сахарозонегативные были голубовато-зеленоватыми. *V. damsela*, в отличие от других представителей рода *Vibrio*, является медленнорастущим микроорганизмом, в связи с чем и было получено наименьшее количество колоний.

Таблица 2

Ростовые свойства среды «Набор ПГСВ» и сред сравнения для штаммов патогенных вибрионов

Штаммы холерных вибрионов	Дозы посева (м.к.)	Количество выросших колоний вибрионов на средах			
		«Набор ПГСВ»	TCBS HiMedia	TCBS (Оболенск)	Контроль МПА+3% NaCl
<i>V. cholerae</i> O1 classical P-1 (145)*	100	93,48 ± 4,12	99,53 ± 6,19	101,51 ± 7,94	88,70 ± 04,81
	10	9,52 ± 0,37	5,47 ± 0,23	13,90 ± 0,68	9,76 ± 0,48
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor M-878*	100	47,87 ± 2,13	46,22 ± 2,17	53,66 ± 3,84	49,18 ± 1,85
	10	5,46 ± 0,39	5,81 ± 0,19	7,93 ± 0,22	5,68 ± 0,26
<i>V. cholerae</i> O139 MO-45*	100	42,36 ± 2,04	40,16 ± 1,83	47,64 ± 1,98	53,08 ± 2,30
	10	3,18 ± 0,12	3,27 ± 0,11	2,43 ± 0,11	4,13 ± 0,23
<i>V. cholerae</i> non O1/non O139 P-9741*	100	38,57 ± 2,88	42,54 ± 1,19	41,46 ± 1,11	37,91 ± 1,55
	10	5,48 ± 0,22	4,53 ± 0,20	6,49 ± 0,27	4,86 ± 0,19
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802**	100	56,66 ± 3,14	61,08 ± 1,89	46,73 ± 2,65	72,06 ± 2,08
	10	1,03 ± 0,07	2,01 ± 0,13	1,04 ± 0,06	0,93 ± 0,04
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749**	100	23,47 ± 1,07	25,84 ± 1,13	24,25 ± 1,73	20,71 ± 0,83
	10	3,89 ± 0,20	4,83 ± 0,19	3,08 ± 0,10	4,65 ± 0,27
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653**	100	72,03 ± 3,60	38,51 ± 1,13	61,47 ± 2,89	77,9 ± 4,02
	10	1,34 ± 0,07	1,66 ± 0,08	1,24 ± 0,06	2,18 ± 0,08
<i>V. furnissii</i> ATCC 35016**	100	111,6 ± 3,87	98,36 ± 5,02	90,68 ± 4,13	146,21 ± 8,17
	10	2,07 ± 0,04	2,32 ± 0,11	1,37 ± 0,06	3,09 ± 0,15
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562**	100	40,47 ± 2,13	46,34 ± 2,19	25,51 ± 1,19	41,04 ± 1,77
	10	1,08 ± 0,06	1,14 ± 0,05	1,03 ± 0,04	2,33 ± 0,10
<i>V. damsela</i> ATCC 33539***	100	20,20 ± 1,09	23,74 ± 0,98	24,51 ± 1,10	18,89 ± 1,03
	10	1,03 ± 0,05	1,11 ± 0,05	1,04 ± 0,06	2,16 ± 0,09

Примечание: * – минимально допустимое значение показателя количества выросших колоний из посевной дозы 100 м.к. для вида *V. cholerae* – 30,0 [8]; ** – минимально допустимое значение показателя количества выросших колоний из посевной дозы 100 м.к. для видов вибрионов *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. furnissii*, *V. vulnificus* – 20,0; *** – минимально допустимое значение показателя количества выросших колоний из посевной дозы 100 м.к. для вида *V. damsela* – 15,0

Селективные свойства испытуемых сред обеспечивали полное подавление роста *E. coli* 18, *Sh. Sonnei* "Sform", *Sh. Flexneri* 1a 8516, *S. typhi* H 901. Роение *P. vulgaris* HX 19 N 222 также угнеталось на всех средах, однако на среде TCBS-агар формировались колонии протей диаметром 0,2–0,7 мм, что вызывало затруднение при выделении *V. parahaemolyticus* (табл. 3). На отдельных чашках с «Набором ПГСВ» и TCBS-агаром наблюдался пылевидный рост протей, не влияющий на выделение вибрионов. Количественно на чашках всех испытуемых сред при параллельном посеве тест-штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 P-9741 и *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 из разведения 10^{-6} фиксировалось формирование от 25 до 32 колоний типичной морфологии. Высокая эффективность среды «Набор ПГСВ» была продемонстрирована при посевах модельных смесей из штамма *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 с водой открытых водоемов, рыбой свежей, рыбой замороженной, замороженными мидиями и faeces здорового человека. Контрольная среда (МПА + 3 % NaCl) селективными свойствами не обладала.

Результаты испытаний среды «Набор ПГСВ» на наборе штаммов *V. parahaemolyticus* (15 штаммов) из коллекции патогенных вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», выделенных из объектов внешней среды и материалов от людей, показали, что все испытанные штаммы обеспечивают прорастание на среде «Набор ПГСВ» при высевах из разведения 10^{-7} степени (м.к.). Практически все вибрионы формировали через 18–20 ч культивирования типичные голубоватые колонии диаметром 1,2–2,8 мм. Различий между штаммами, выделенными из объектов внешней среды и от больных людей, не наблюдалось.

Таблица 3

Ингибирующее действие среды «Набор ПГСВ», среды сравнения на микробы-ассоцианты и модельные смеси

Виды микроорганизмов	Значение по ТУ	Рост микроорганизмов-ассоциантов на средах (высев по 0,1 мл из разведений 10^7 м.к./мл)			
		«Набор ПГСВ»	TCBS HiMedia	TCBS (Оболенск)	Контроль МПА+3% NaCl
<i>E. coli</i> 18	«-»	–	–	–	++++
<i>P. vulgaris</i> HX 19 N 222	«±»	±	±	+	++++
<i>Sh. Sonnei</i> "S form"	нет	–	–	–	++++
<i>Sh. Flexneri</i> 1a 8516	нет	–	–	–	++++
<i>S. typhi</i> H 901	нет	–	–	–	++++
Модельные смеси	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802+вода открытых водоемов	нет	–	±	++++
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 + рыба свежая	нет	–	±	+
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802+рыба замороженная	нет	–	±	++++
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802+замороженные мидии	нет	–	±	++++
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802+faeces здорового человека	нет	±	±	++++

Примечание: «-» – отсутствие роста контаминантов; «±» – наличие единичных колоний контаминантов, не мешающих выделению; «+» – значительный рост контаминантов, создающий сложности при выделении вибрионов; «++++» – сливной рост на поверхности агаровой пластинки

Новый препарат продемонстрировал возможность проведения идентификации галофильных вибрионов от негалофильного тест-штамма *V. cholerae* non O1/non O139 P-9741. Среда TCBS обладала схожими ростовыми и ингибирующими способностями в отношении тест-штаммов микробов-контаминантов и в модельных смесях, но не идентифицировала тест-штаммы в тесте на галофильность.

Таким образом, доказано полное соответствие параметров разработанной и исследованной среды показателям, указанным в ТУ. ТУ на препарат № 20.59.52-001-01898316-2018 и Инструкция по применению препарата утверждены Ученым советом и директором ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» (протокол № 3 от 5.06.18).

По результатам технических испытаний, проведенных на базе испытательной лаборатории медицинских изделий ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства» России и клинических испытаний в ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»

получены положительные решения. Среда «Набор ПГСВ» зарегистрирована в установленном порядке как изделие медицинского назначения 10.06.2019 г., № РЗН 2019/8472.

Заключение. В результате проведенных испытаний получено Регистрационное удостоверение и установлено, что испытываемая питательная среда для выделения парагемолитических вибрионов и их первичной идентификации «Набор ПГСВ» по своим физико-химическим и биологическим показателям соответствует Техническим условиям на препарат и инструктивным требованиям. Она не уступает промышленным средам аналогичного назначения – TCBS и обладает необходимыми ростовыми, ингибирующими и дифференцирующими свойствами для выделения парагемолитических вибрионов из объектов окружающей среды и клинического материала и таким образом обеспечивает свое назначение. Учитывая способность среды «Набор ПГСВ» идентифицировать выделенные с ее помощью парагемолитические вибрионы в тесте на галофильность, можно констатировать значительные ее преимущества перед используемыми в практике аналогами при мониторинге объектов окружающей среды и исследовании клинического материала на наличие *V. parahaemolyticus*. Впервые отечественная бактериология получила возможность обследования людей с помощью специализированной питательной среды, позволяющей значительно повысить диагностическую эффективность и способствовать получению объективных результатов лабораторного контроля.

Список литературы

1. Агар ТЦЖС (TCBS) щелочной (селективный). Режим доступа: <https://art-medika.com/catalog/mikrobiologia/nutrient/product-215.html>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. – Дата обращения: 21.02.2020.
2. Алленов, А. В. Микробиологическая и эколого-эпидемиологическая характеристика вибриозов в Приморском крае : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. В. Алленов. – Владивосток, 2000. – 27 с.
3. Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. – Режим доступа : <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. – Дата обращения: 21.02.2020.
4. Куликовский, А. В. Эмерджентные пищевые зоонозы / А. В. Куликовский. – М. : Крафт+, 2004. – 174 с.
5. Морозова, М. А. Экологические особенности формирования микробиоценоза рыб Таганрогского залива Азовского моря : автореф. дис. ... канд. биол. наук / М. А. Морозова. – Ростов-н/Д., 2017. – 24 с.
6. МУК 4.2.1793-03. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами: методические указания.– М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 26 с.
7. МУК 4.2.2046-06. Методы выявления и определения парагемолитических вибрионов в рыбе, нерыбных объектах промысла, продуктах, вырабатываемых из них, воде поверхностных водоемов и других объектах : методические указания. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 26 с.
8. МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред : методические указания. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.
9. О профилактике пищевых отравлений и инфекционных болезней, передающихся с пищей. Роспотребнадзор. 24.06.2021. – Режим доступа : https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/page1.php?ELEMENT_ID=18030, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. – Дата обращения: 24.06.2021.
10. Рыковская, О. А. Разработка комплексного метода оценки вирулентности парагемолитических вибрионов / О. А. Рыковская, О. А. Шалу, Е. В. Монахова, Л. М. Смоликова, О. С. Чемисова, Е. Н. Голенищева, Е. М. Санамянц, Г. В. Гальцева, А. В. Алленов, Г. П. Мурначев, Т. В. Хоменко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 2. – С. 38–41.
11. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Сан ПиН 2.3.2.1078–01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – М.: Минздрав России, 2001. – 23 с.
12. Скитович, Г. С. *Vibrio parahaemolyticus*: распространение, выявление и методы идентификации / Г. С. Скитович, Н. Б. Шадрова, О. В. Прунтова // Ветеринария сегодня. – 2015. – № 3 (14). – С. 66–70.
13. Среда типа TCBS (для выделения возбудителя холеры). Режим доступа: <https://art-medika.com/catalog/mikrobiologia/medium/product-7010.html>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. – Дата обращения: 12.03.2020.
14. Хунхеева, Ж. Ю. Роль галофильных вибрионов в структуре острых кишечных инфекций на территории Приморского края / Ж. Ю. Хунхеева, Л. В. Миронова, В. М. Воронок, Т. Т. Тарасенко, Е. В. Косенок, А. В. Алленов, Т. В. Хоменко, Н. С. Солодкая, С. В. Балахонов // Холера и патогенные для человека вибрионы: сборник статей проблемной комиссии (48.04). – Ростов-н/Д., 2017. – Вып. 30. – С. 95–98.
15. Kobayahi, T. A new selektive medium pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar) / T. Kobayahi, S. Enomoto, R. Sakazaki, S. Kuwahara // Japanese J. Bakteriол. – 1963. – Vol. 18. – P. 387–392.

16. Makino, K. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae* / K. Makino, K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, T. Iida // *Lancet*. – 2003. – Vol. 361, № 9359. – P. 743–749.
17. Meador, C. E. Virulence gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates / C. E. Meador, M. M. Parsons, C. A. Bopp, P. Gerner-Smidt, J. A. Painter, G. J. Vora // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45, № 4. – P. 1133–1139.
18. Nair, G. B. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants / G. B. Nair, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, B. Dutta, Y. Takeda, D. A. Sack // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2007. – Vol. 20, № 1. – P. 39–48.
19. Okada, N. Identification and characterization of a novel type III secretion system in trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level / N. Okada, J. Iida, K. S. Park, N. Goto, T. Yasunaga, H. Hioshi, S. Matsuda, T. Kodama, T. Honda // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77, № 2. – P. 904–913.
20. Ottaviani, D. Nontoxicogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute gastroenteritis / D. Ottaviani, F. Leoni, R. Serra, L. Serracca, L. Decastelli, E. Rocchegiani, L. Masini, C. Canonico, G. Talevi, A. Carraturo // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – Vol. 50, № 12. – P. 4141–4143.
21. Park, K. S. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus* / K. S. Park, T. Ono, M. Rokuda, M. H. Jang, T. Iida, T. Honda // *Microbiol. Immunol.* – 2004. – Vol. 48, № 4. – P. 313–319.

References

1. Agar TTsZhS (TCBS) shchelochnoy (selektivnyy) [Agar TCBS alkaline (selective)]. Available at: <https://art-medika.com/catalog/mikrobiologia/nutrient/product-215.html> (accessed 21 February 2020).
2. Allenov A. V. Mikrobiologicheskaya i ekologo-epidemiologicheskaya kharakteristika vibrionozov v Primorskom krae. Avtoreferat dissertatsii kandidata meditsinskikh nauk [Microbiological and epidemiological characteristics of *Vibrio* in the Primorsky territory. Abstract of thesis of Candidate of Medical Sciences]. Vladivostok, 2000, 27 p.
3. Gosudarstvennyy reestr meditsinskikh izdeliy i organizatsiy (individual'nykh predprinimateley), osushchestvlyayushchikh proizvodstvo i izgotovlenie meditsinskikh izdeliy. Federal'naya sluzhby po nadzoru v sfere zdorovookhraneniya [State register of medical devices and organizations (individual entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices. Federal Service for Surveillance in Healthcare]. Available at : <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (accessed 21 February 2020).
4. Kulikovskiy A. V. Emerzhentnye pishchevye zoonozy [Emergent food zoonoses]. Moscow, Kraft+, 2004, 174 p.
5. Morozova M. A. Ekologicheskije osobennosti formirovaniya mikrobiotsenoza ryb Taganrogskogo zaliva Azovskogo morya. Avtoreferat dissertatsii kandidata biologicheskikh nauk [Abstract of thesis of Candidate of Biological Sciences]. Rostov-on-Don, 2017, 24 p.
6. MUK 4.2.1793-03. Laboratornaya diagnostika zabolevaniy, vyzyvaemykh paragemoliticheskimi i dru-gimi patogennymi dlya cheloveka vibrionami: Metodicheskie ukazaniya [Laboratory diagnostics of diseases caused by *V. parahaemolyticus* and other human pathogenic vibrios: Guidelines]. Moscow, Federal center of Gossanepidnadzor of the Ministry of health of Russia, 2004, 26 p.
7. MUK 4.2.2046-06. Metody vyyavleniya i opredeleniya paragemoliticheskikh vibrionov v rybe, neryb-nykh ob"ektakh promysla, produktakh, vyrabatyvaemykh iz nikh, vode poverkhnostnykh vodoemov i drugikh ob"ektakh: Metodicheskie ukazaniya [Methods for detecting and determining *V. parahaemolyticus* in fish, non-fish fishery objects, products produced from them, water of surface reservoirs and other objects: Guidelines]. Moscow, Federal center for hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor, 2006, 26 p.
8. MUK 4.2.2316-08. Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred. Metodicheskie ukazaniya [Methods of control of bacteriological nutrient media: Guidelines.]. Moscow, Federal center for hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor, 2008, 67 p.
9. O profilaktike pishchevykh otravleniy i infektsionnykh bolezney, peredayushchikh-sya s pishchey. Rospotrebnadzor [On the prevention of food poisoning and infectious diseases transmitted with food. Rospotrebnadzor]. 24.06.2021. Available at : https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/page1.php?ELEMENT_ID=18030 (accessed 24 June 2021).
10. Rykovskaya O. A., Shalu O. A., Monakhova E. V., Smlikova L. M., Chemisova O. S., Golenishcheva E. N., Sanamyants E. M., Gal'tseva G. V., Allenov A. V., Murnachev G. P., Khomenko T. V. Razrabotka kompleksnogo metoda otsenki virulentnosti paragemoliticheskikh vibrionov [The development of complex technique of evaluation of virulence of parahemolytic vibrio]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Russian Clinical Laboratory Diagnostics], 2013, no. 2, pp. 38–41.
11. Sanitarno-epidemiologicheskije pravila i normativy. San PiN 2.3.2.1078–01. Gigienicheskie tre-bovaniya bezopasnosti i pishchevoy tsennosti pishchevykh produktov [Hygienic requirements for the safety and nutritional value of food products]. Moscow, Ministry of Health of Russia, 2001, 23 p.

12. Skitovich G. S., Shadrova N. B., Pruntova O. V. *Vibrio parahaemolyticus*: rasprostranenie, vyyavlenie i metody identifikatsii [Vibrio parahaemolyticus: spread, detection and identification techniques]. Veterinariya segodnya [Veterinary science today], 2015, no. 3 (14), pp. 66–70.
13. Sreda tipa TCBS (dlya vydeleniya vozbuditelya kholery) [A medium of the type TCBS (for isolation of the pathogen cholera). Available at: <https://art-medika.com/catalog/mikrobiologia/medium/product-7010.html> (accessed 12 March 2020).
14. Khunkheeva Zh. Yu., Mironova L. V., Voronok V. M., Tarasenko T. T., Kosenok E. V., Allenov A. V., Khomenko T. V., Solodkaya N. S., Balakhonov S. V. Rol' galofil'nykh vibriionov v strukture ostrykh kishechnykh infektsiy na territo-rii Primorskogo kraya [The role of halophilic vibriions in the structure of acute intestinal infections in the Primorsky territory]. Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony: Sbornik statey problemnoy komissii (48.04) [Cholera and human pathogenic vibriions: Collection of articles of the problem Commission (48.04)], Rostov-on-Don, 2017, issue 30, pp. 95–98.
15. Kobayahi T., Enomoto S., Sakazaki R., Kuwahara S. A new selektive medium pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). Japanese J. Bacteriol., 1963, vol. 18, pp. 387–392.
16. Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M., Iida T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. Lancet., 2003, vol. 361, no. 9359, pp. 743–749. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12659-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12659-1).
17. Meador C. E., Parsons M. M., Bopp C. A., Gerner-Smidt P., Painter J. A., Vora G. J. Virulence gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. J. Clin. Microbiol., 2007, vol. 45, no. 4, pp. 1133–1139. doi: 10.1128/JCM.00042-07.
18. Nair G. B., Ramamurthy T., Bhattacharya S. K., Dutta B., Takeda Y., Sack D. A. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. Clinical Microbiology Reviews, 2007, vol. 20, no. 1, pp. 39–48. doi: 10.1128/CMR.00025-06.
19. Okada N., Iida J., Park K.S., Goto N., Yasunaga T., Hioshi H., Matsuda S., Kodama T., Honda T. Identification and characterization of a novel tape III secretion system in trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. Infect. Immun, 2009, vol. 77, no. 2, pp. 904–913. doi: 10.1128/IAI.01184-08.
20. Ottaviani D., Leoni F., Serra R., Serracca L., Decastelli L., Rocchegiani E., Masini L., Canonico C., Talevi G., Carraturo A. Nontoxigenic *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute gastroenteritis. J. Clin. Microbiol., 2012, vol. 50, no. 12, pp. 4141–4143. doi: 10.1128/JCM.01993-12.
21. Park K. S., Ono T., Rokuda M., Jang M. H., Iida T., Honda T. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiol. Immunol., 2004, vol. 48, no. 4, pp. 313–319. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03512.x.