



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/00 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2024108049, 26.03.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.03.2024

Дата регистрации:
02.10.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.03.2024

(45) Опубликовано: 02.10.2024 Бюл. № 28

Адрес для переписки:
344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/
40, Ростовский-на-Дону противочумный
институт Роспотребнадзора

(72) Автор(ы):

Писанов Руслан Вячеславович (RU),
Каминский Денис Игоревич (RU),
Ковалевич Алексей Александрович (RU),
Водопьянов Алексей Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное казенное учреждение
здравоохранения "Ростовский-на-Дону
ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт" Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: КАЛИНА, Г.П. Среды
узконаправленного действия для обнаружения
клебсиелл, ЖМЭИ. 1980, N 6, с. 28-32. RU
2265056 C2, 27.11.2005. СНОВУ, J.E.
Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical
and molecular perspectives (Review), J. Intern.
Med, 2020, N 287, p. 283-300.

(54) Элективно-дифференциальная питательная среда для выделения *Klebsiella* spp.

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и является элективно-дифференциальной питательной средой. Питательная среда содержит в качестве азотистой питательной основы пептон ферментативный сухой (для бактериологических целей); L-Арабинозу - в качестве источника углерода; мочевины для выявления уреазной активности; железо (II) сернокислое семиводное - в качестве ингибитора роста посторонней микрофлоры; крезоловый красный водорастворимый - в

качестве индикатора изменения pH среды; агар-агар микробиологический, воду дистиллированную. Изобретение позволяет повысить эффективность выделения *Klebsiella* spp., сократить срок их идентификации по принципу биохимической активности и специфической окраски колоний. Таким образом, изобретение сокращает время лабораторной диагностики микроорганизмов рода *Klebsiella*. 1 табл., 6 пр.

RU 2 827 840 C1

RU 2 827 840 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/00 (2024.01)

(21)(22) Application: **2024108049, 26.03.2024**

(24) Effective date for property rights:
26.03.2024

Registration date:
02.10.2024

Priority:

(22) Date of filing: **26.03.2024**

(45) Date of publication: **02.10.2024** Bull. № 28

Mail address:

**344002, g. Rostov-na-Donu, ul. M. Gorkogo, 117/
40, Rostovskij-na-Donu protivochumnyj institut
Rospotrebnadzora**

(72) Inventor(s):

**Pisanov Ruslan Vyacheslavovich (RU),
Kaminskij Denis Igorevich (RU),
Kovalevich Aleksej Aleksandrovich (RU),
Vodopyanov Aleksej Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe kazennoe uchrezhdenie
zdravookhraneniya "Rostovskij-na-Donu ordena
Trudovogo Krasnogo Znameni
nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj
institut" Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere
zashchity prav potrebitelej i blagopoluchiya
cheloveka (RU)**

(54) **ELECTIVE-DIFFERENTIAL NUTRIENT MEDIUM FOR KLEBSIELLA SPECIES RECOVERY**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and is an elective differential nutrient medium. Nutrient medium contains fermentative dry peptone (for bacteriological purposes) as a nitrogenous nutrient base; L-arabinose – as a carbon source; urea for detecting urease activity; iron (II) sulphate heptahydrate – as an inhibitor of growth of foreign microflora; cresol red water-soluble – as an indicator of pH change of the

medium; microbiological agar-agar, distilled water. Invention allows increasing efficiency of Klebsiella spp. isolation, reducing the period of their identification based on the principle of biochemical activity and specific colony colour.

EFFECT: invention reduces the time for laboratory diagnosis of microorganisms of the genus Klebsiella.

1 cl, 1 tbl, 6 ex

RU 2 827 840 C1

RU 2 827 840 C1

Предлагаемое изобретение относится к области медицинской микробиологии и является селективно-дифференциальной питательной средой, которая может быть использована в лабораторной практике при выделении штаммов *Klebsiella* spp. (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*) из клинического материала, пищевых продуктов и объектов окружающей среды. Питательная среда содержит в качестве азотистой питательной основы пептон ферментативный сухой (для бактериологических целей); L-Арабинозу - в качестве источника углерода; мочевины для выявления уреазной активности; железо (II) сернокислое семиводное - в качестве ингибитора роста посторонней микрофлоры; крезоловый красный водорастворимый - в качестве индикатора изменения pH среды; агар-агар микробиологический, воду дистиллированную. Изобретение позволяет повысить эффективность выделения *Klebsiella* spp., сократить срок их идентификации по принципу биохимической активности и специфической окраски колоний. Таким образом, изобретение сокращает время лабораторной диагностики микроорганизмов рода *Klebsiella*.

Экологическими резервуарами бактерий рода *Klebsiella* (в том числе, вирулентных) служат воды поверхностных водоемов, сточные воды, растения, промышленные стоки (Пай Г.В. с соавт., 2020) [10]. Они являются представителями нормальной транзитной микрофлоры человека, но, в то же время, возбудителями различных инфекционных заболеваний потому, что обладают выработанной устойчивостью ко многим факторам внешней среды, в частности, к большинству антибактериальных препаратов (Меджидов М.М., 2008; Рахманин Ю.А. с соавт., 2016) [5, И]. Это приводит к возникновению острых кишечных инфекций, сепсисов, конъюнктивитов, поражениям легких, печени у людей с ослабленной иммунной системой (Анганова Е.В. с соавт., 2010; Choby J.E. et al., 2020) [1, 14]. Последние обстоятельства указывают на то, что клебсиеллы из окружающей среды могут представлять угрозу для здоровья человека (Lightfoot N., 2003) [15].

Бактериологические исследования, направленные на обнаружение клебсиелл и других энтеробактерий, проводят по одной схеме. При этом используются селективно-дифференциальные среды типа Эндо, Левина, Плоскирева, Мак-Конки. Принцип их работы основан на утилизации бактериями кишечной группы лактозы. Это не позволяет отличить *Klebsiella* spp. от других представителей *Enterobacteriaceae*.

Такого же рода обстоятельства возникают при использовании селективно-дифференциальных сред с рамнозой или инозитом, в состав которых наряду с вышеуказанными соединениями входят ингибиторы роста посторонней микрофлоры (желчь, желчные соли, кристаллвиолет, бриллиантовый зеленый, антибиотики), когда, например, дифференциация *K. pneumoniae* от *Serratia* spp. очень затруднительна. К тому же эти среды (модифицированный агар Мак-Конки, М-Агар FC для клебсиелл, дифференциально-селективная питательная среда для выделения клебсиелл и др.) являются слабоселективными. В связи с этим требуется постановка дополнительных тестов и манипуляций для выделения чистых культур клебсиелл.

Изобретение относится к области медицинской микробиологии и может быть использовано для выделения *Klebsiella* spp. из клинического материала, пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

В основе предлагаемого способа лежит применение питательной среды, которая содержит в %:

1. Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей - 0,9-1,4;
2. L-Арабиноза - 0,2-1,0;
3. Железо (II) сернокислое семиводное - 0,01-0,06;
4. Мочевина - 0,2-1,0;

5. Крезоловый красный водорастворимый - 0,00005-0,004;

6. Агар-агар микробиологический - 1,0-1,5;

7. Вода дистиллированная - до 100%,

pH готовой среды $7,2 \pm 0,2$.

5 Бактерии рода *Klebsiella* - грамотрицательные микроорганизмы, принадлежащие к семейству Enterobacteriaceae порядка Enterobacterial. Род *Klebsiella* представлен более чем 12 видами, из которых чаще встречаются *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* (Бардашева А.В. с соавт., 2021) [2].

10 Известна питательная среда «Хромогенная питательная среда для выделения и идентификации клебсиелл», предложенная М.М. Меджидовым с соавт. [6]. Данная среда имеет следующий состав (г/л):

1. Питательный агар сухой - 35,0-40,0;

2. Глюкоза - 5,0-6,0;

3. 5-аминосалициловая кислота - 2,0-3,0;

15 4. Экстракт кормовых дрожжей - 3,0-5,0;

5. Парааминобензойная кислота - 0,01-0,02;

6. Бромтимоловый синий - 0,08-0,09;

7. Трис-буфер - 1,0-1,5;

8. Натрий углекислый - 0,6-0,7;

20 9. Бриллиантовый зеленый - 0,0001-0,0002;

10. Агар микробиологический - 2,5-3,0;

11. Вода дистиллированная - до 1 литра.

pH $7,4 \pm 0,2$. Данную питательную среду получают следующим образом. В 1 литр дистиллированной воды вносят навески сухого питательного агара, экстракта кормовых дрожжей, парааминобензойной кислоты, трис-буфера, натрия углекислого, бриллиантового зеленого. Смесь тщательно перемешивают, трехкратно кипятят 1-2 мин при помешивании, не допуская пригорания агара, до появления крупнопузырчатой пены. Среду охлаждают до $45-50^{\circ}\text{C}$ и разливают в стерильные чашки Петри. После застывания и подсушивания чашек со средой на нее наносят исследуемый материал, затем инкубируют при 37°C в течение 24 ч. Через 24 ч от начала культивирования *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. mobilis* образуют типичные колонии коричневого цвета, диаметром 1,5-2,0 мм в S-форме с коричневым преципитатом вокруг них из-за воздействия на 5-аминосалициловую кислоту фермента 5-аминосалицилатдекарбоксилазы, наличие которого характерно только для *Klebsiella* spp. Остальные энтеробактерии вырастают в виде типичных для каждого вида колоний желтого цвета на фоне бутылочно-зеленого цвета питательной среды. Коричневый преципитат вокруг этих колоний отсутствует. Рост грамположительных микроорганизмов подавляется благодаря внесению в эту среду бриллиантового зеленого. Данная питательная среда является хромогенной и не может позволить выделить только лишь представителей рода *Klebsiella*, а также имеет довольно сложный с дорогостоящими ингредиентами состав, в который необходимо вводить стимуляторы роста - экстракт кормовых дрожжей и парааминобензойную кислоту. Таким образом, назначение указанной среды не совпадает с назначением (решением задач) предлагаемой нами.

45 Разработанная нами среда является хромогенной, содержит селективную добавку в виде соли железа валентностью 2, позволяющую задерживать, блокировать рост посторонней микрофлоры и других энтеробактерий кроме представителей рода *Klebsiella*, а также являющуюся стимулятором гиперкапсулообразования у *K. pneumoniae*, что позволяет разделять гипермукоидные и классические варианты клинических

штаммов *K. pneumoniae*, что невозможно на других селективных средах.

Кроме того, в состав среды не входят ионы натрия и калия (в отличии большинства сред), что также является селективным фактором для роста посторонней микрофлоры и других энтеробактерий, нуждающихся в этих ионах, за исключением представителей рода *Klebsiella*. В качестве индикатора и селективного фактора нами использован крезоловый красный блокирующий рост других энтеробактерий, но не активный в отношении представителей рода *Klebsiella*.

Известен способ выделения и идентификации бактерий рода *Klebsiella* с помощью среды, предложенной Сиволодским Е.П. [12]. Данная среда имеет следующий состав (г/л):

1. L-пролин - 2,0-2,5;
2. L-глутамат натрия - 5,0-6,0;
3. L-арабиноза - 10,0;
4. 5-аминосалициловая кислота - 3,0-5,0;
5. $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ - 2,0-3,3;
6. NaCl - 5,0;
7. KH_2PO_4 - 0,5;
8. MgSO_4 - 0,1;
9. Агар микробиологический - 12,0;
10. Вода дистиллированная - до 1 литра;
pH 7,2±0,2.

Эту питательную среду готовят путем внесения порошка смеси ингредиентов кроме суплементов 5-аминосалициловой кислоты и углекислого натрия в дистиллированную воду, растворяют при нагревании, добавляют суплементы, кипятят в течение 5 минут, разливают в стерильные чашки Петри. Посевы инкубируют при 35°C в аэробных условиях 24-48 ч, после чего определяют принадлежность выросших колоний микроорганизмов к роду *Klebsiella* по образованию вокруг последних зоны темно-коричневой окраски питательной среды. Хотя, по заявлению автора, данная среда позволяет выделять клебсиеллы с высокой долей вероятности и на ней подавляется рост грамположительных бактерий (например, рода *Bacillus*); она является хромогенной и синтетической. Применение этой питательной среды не дает возможности выявлять исключительно *Klebsiella* spp. из-за штаммовых различий по питательным потребностям последних. Некоторые ингредиенты, входящие в ее состав (L-пролин, L-глутамат натрия, 5-аминосалициловая кислота) дороги. Таким образом, назначение указанной среды не совпадает с назначением (решением задач) предлагаемой нами.

Наиболее близкой к предлагаемой питательной среде является питательная среда К-2 (Калина Г.П., 1980) [4]. В состав этой среды входят натрий хлористый, магний сернокислый, двузамещенный фосфат калия, однозамещенный фосфат калия, сульфат калия, раффиноза, мочевины, бромтимоловый синий, кристаллический фиолетовый, агар микробиологический, дистиллированную воду. На этой среде *Klebsiella* spp. образуют округлые, блестящие слизистые, желтые, зеленые с желтым центром или голубые колонии.

Недостатком прототипа является слабая селективность в отношении бактерий родов *Enterobacter*, *Citrobacter* и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*; отсутствие четкого отличия колоний клебсиелл по цвету.

Технической задачей предлагаемого изобретения является создание новой питательной среды для выделения чистых культур *Klebsiella* spp. из клинического

материала, пищевых продуктов и объектов окружающей среды путем применения селективно-дифференциальной питательной среды, позволяющей сократить сроки дифференциации клебсиелл.

5 Поставленная задача достигается путем применения селективно-дифференциальной питательной среды, позволяющей дифференцировать клебсиеллы по наличию ферментации L-арабинозы и уреазной активности.

Цель изобретения достигается при использовании питательной среды, содержащей (в %):

1. Пептон ферментативный для бактериологических целей - 0,9-1,4;
 - 10 2. L-Арабиноза ЧДА или ХЧ - 0,2-1,0;
 3. Мочевина ЧДА или ХЧ - 0,2-1,0;
 4. Железо (II) сернокислое семиводное - 0,01-0,06;
 5. Крезоловый красный водорастворимый ЧДА или ХЧ - 0,0005-0,004;
 6. Агар-агар микробиологический - 1-1,5;
 - 15 7. Вода дистиллированная - до 1 литра.
- РН 7,2±0,2.

Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет среды в области роста колоний становится малиновым.

Способ приготовления питательной среды осуществляется по следующей технологии.

20 В стеклянную термостойкую вносят навески пептона сухого ферментативного для бактериологических целей, мочевины, крезолового красного водорастворимого, агар-агара. Добавляют дистиллированную воду до 1000 мл. Устанавливают рН 7,2±0,2 при помощи 20% водного раствора гидроксида натрия и 12% водного раствора соляной кислоты. Нагревают в паровом стерилизаторе текучим паром в течение 45-65 минут

25 или кипятят на электроплитке при постоянном помешивании, не допуская пригорания агаровых частиц, в течение 2-3 минут после полного растворения агара. Вносят навески L-арабинозы и железа (II) сернокислого семиводного с последующим перемешиванием до их полного растворения. Питательную среду стерилизуют кипячением в течение 2-3 минут.

30 Питательную среду асептично разливают в стерильные чашки Петри по 20-30 мл и оставляют застывать на ровной поверхности. Цвет питательной среды - желтый. Готовая питательная среда, разлитая в чашки Петри может храниться не более 15 дней при температуре от 2 до 8°C.

35 Качество предлагаемого способа выделения *Klebsiella* spp. из объектов окружающей среды и биологического материала проверяют следующим образом.

Перед проверкой качества предлагаемого способа тест-штаммы *K. pneumoniae* 3446, *K. pneumoniae* 3347, *K. oxytoca* 3955, *K. aerogenes* 4206, *E. coli* 18, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* P-5810, *S. aureus* ATCC 25925, *P. vulgaris* НХ19 (222) подготавливают к контролю в соответствии с требованиями МУК 4.2.2316-08 [].

40 Пример 1

Готовят питательную среду следующего состава: в чистую 2-литровую колбу вносят:

1. Пептон ферментативный для бактериологических целей - 0,9%;
2. L-Арабиноза ЧДА или ХЧ - 0,2%;
3. Мочевина ЧДА или ХЧ - 0,2%;
- 45 4. Железо (II) сернокислое семиводное - 0,01%;
5. Крезоловый красный водорастворимый ЧДА или ХЧ - 0,0005%;
6. Агар-агар микробиологический - 1,0%;
7. Вода дистиллированная - до 1 литра.

Устанавливают рН $7,2 \pm 0,2$ при помощи 20% водного раствора гидроокиси натрия и 12% водного раствора соляной кислоты. Смесь кипятят на электроплитке при постоянном помешивании, не допуская пригорания агаровых частиц, в течение 2-3 минут после полного растворения агара или в паровом стерилизаторе (в режиме текучего пара) в течение 45 - 65 мин. Затем добавляют навески L-арабинозы - 0,2% и железа (II) сернокислого семиводного - 0,01% с последующим перемешиванием до полного растворения ингредиентов. Питательную среду асептично разливают в стерильные чашки Петри по 20-30 мл и оставляют застывать на ровной поверхности. Цвет полученной питательной среды - желтый.

Для контроля качества полученной селективной питательной среды используют тест-штаммы *K. pneumoniae* 3446, *K. pneumoniae* 3347, *K. oxytoca* 3955, *K. aerogenes* 4206, *E. coli* 18, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* P-5810, *S. aureus* ATCC 25925, *P. vulgaris* НХ19 (222), хранящиеся и подготовленные к посеву согласно МУК 4.2.2316-08 [7]. Суточную культуру каждого из них суспендируют в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия, забуференного 1/150 М калий-натрий фосфатным буфером рН ($7,1 \pm 0,1$) до концентрации 1×10^9 м.к./мл по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-85П (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). Приготовленные взвеси тест-штаммов *K. pneumoniae* 3446, *K. pneumoniae* 3347, *K. oxytoca* 3955, *K. aerogenes* 4206 последовательно разводят в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия, забуференного 1/150 М калий-натрий фосфатным буфером рН ($7,1 \pm 0,1$) с десятикратным интервалом до разведения 10^{-6} (1000 м.к./мл). Взвеси тест-штаммов, используемые в качестве микробов-ассоциантов: *E. coli* 18, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* P-5810, *S. aureus* ATCC 25925, *P. vulgaris* НХ19 (222) также разводят с десятикратным интервалом последовательно до разведений 10^{-2} (1000000 м.к./мл) и до 10^{-3} (1000000 м.к./мл) - *P. vulgaris* НХ19 (222).

Посев тест-штаммов осуществляют по 0,1 мл из каждого разведения с последующей инкубацией при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-24 ч, затем проводят учет результатов.

Как видно из таблицы 1, осуществление предлагаемого способа при применении среды указанного состава не соответствует требованиям Методических указаний по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями МУ 04-723/3 [9], МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» [8], т.к. присутствует рост микробов-ассоциантов. Искомые микроорганизмы выявить практически невозможно.

Пример 2

Готовят питательную среду следующего состава: в чистую 2-литровую колбу вносят:

1. Пептон ферментативный для бактериологических целей - 1,0%;
2. L-Арабиноза ЧДА или ХЧ - 0,3%;
3. Мочевина ЧДА или ХЧ - 0,3%;
4. Железо (II) сернокислое семиводное - 0,015%;
5. Крезоловый красный водорастворимый ЧДА или ХЧ - 0,001%;
6. Агар-агар микробиологический - 1,1%;
7. Вода дистиллированная - до 1 литра.

Устанавливают рН $7,2 \pm 0,2$ при помощи 20% водного раствора гидроокиси натрия и 12% водного раствора соляной кислоты.

В ходе приготовления и испытания среды использованы методические приемы, как в примере 1.

Как видно из таблицы 1, осуществление предлагаемого способа при применении среды указанного состава не соответствует требованиям Методических указаний по

микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями МУ 04-723/3 [9], МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» [8], т.к. присутствует рост микробов-ассоциантов. Искомые микроорганизмы выявить было практически невозможно.

5 Пример 3

Готовят питательную среду следующего состава: в чистую 2-литровую колбу вносят:

1. Пептон ферментативный для бактериологических целей - 1,1%;
2. L-Арабиноза ЧДА или ХЧ - 0,4%;
3. Мочевина ЧДА или ХЧ - 0,4%;
- 10 4. Железо (II) сернокислое семиводное - 0,025%;
5. Крезоловый красный водорастворимый ЧДА или ХЧ - 0,0015%;
6. Агар-агар микробиологический - 1,2%;
7. Вода дистиллированная - до 1 литра.

15 Устанавливают рН $7,2 \pm 0,2$ при помощи 20% водного раствора гидроокиси натрия и 12% водного раствора соляной кислоты.

В ходе приготовления и испытания среды используют методические приемы, как в примере 1.

Как видно из таблицы 1, осуществление предлагаемого способа при применении среды указанного состава соответствует требованиям Методических указаний по 20 микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями МУ 04-723/3 [9], МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний [8]» и позволяет выявлять *Klebsiella spp.*

Пример 4

Готовят питательную среду следующего состава: в чистую 2-литровую колбу вносят:

- 25 1. Пептон ферментативный для бактериологических целей - 1,2%;
2. L-Арабиноза ЧДА или ХЧ - 0,5%;
3. Мочевина ЧДА или ХЧ - 0,5%;
4. Железо (II) сернокислое семиводное - 0,03%;
5. Крезоловый красный водорастворимый ЧДА или ХЧ - 0,002%;
- 30 6. Агар-агар микробиологический - 1,3%;
7. Вода дистиллированная - до 1 литра.

Устанавливают рН $7,2 \pm 0,2$ при помощи 20% водного раствора гидроокиси натрия и 12% водного раствора соляной кислоты.

35 В ходе приготовления и испытания среды используют методические приемы, как в примере 1.

Как видно из таблицы 1, осуществление предлагаемого способа при применении среды указанного состава соответствует требованиям Методических указаний по 40 микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями МУ 04-723/3 [9], МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний [8]» и позволяет выявлять *Klebsiella spp.*

Пример 5

Готовят питательную среду следующего состава: в чистую 2-литровую колбу вносят:

1. Пептон ферментативный для бактериологических целей - 1,3%;
2. L-Арабиноза ЧДА или ХЧ - 0,7%;
- 45 3. Мочевина ЧДА или ХЧ - 0,7%;
4. Железо (II) сернокислое семиводное - 0,05%;
5. Крезоловый красный водорастворимый ЧДА или ХЧ - 0,003%;
6. Агар-агар микробиологический - 1,4%;

7. Вода дистиллированная - до 1 литра.

Устанавливают рН $7,2 \pm 0,2$ при помощи 20% водного раствора гидроксида натрия и 12% водного раствора соляной кислоты.

В ходе приготовления и испытания среды используют методические приемы, как в примере 1.

Как видно из таблицы 1, осуществление предлагаемого способа при применении среды указанного состава не соответствует требованиям Методических указаний по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями МУ 04-723/3 [9], МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» [8]. Происходит снижение значений диаметра колоний и показателя прорастания (из посевной дозы 100 м.к.) электро-дифференциальной питательной среды в отношении использованных для контроля штаммов *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes*.

Пример 6

Готовят питательную среду следующего состава: в чистую 2-литровую колбу вносят:

1. Пептон ферментативный для бактериологических целей - 1,3%;
2. L-Арабиноза ЧДА или ХЧ - 0,7%;
3. Мочевина ЧДА или ХЧ - 0,7%;
4. Железо (II) сернокислое семиводное - 0,05%;
5. Крезоловый красный водорастворимый ЧДА или ХЧ - 0,003%;
6. Агар-агар микробиологический - 1,4%;
7. Вода дистиллированная - до 1 литра.

Устанавливают рН $7,2 \pm 0,2$ при помощи 20% водного раствора гидроксида натрия и 12% водного раствора соляной кислоты.

В ходе приготовления и испытания среды используют методические приемы, как в примере 1.

Как видно из таблицы 1, осуществление предлагаемого способа при применении среды указанного состава не соответствует требованиям Методических указаний по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями МУ 04-723/3 [9], МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» [8]. Происходит снижение значений диаметра колоний и показателя прорастания (из посевной дозы 100 м.к.) электро-дифференциальной питательной среды в отношении использованных для контроля штаммов *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes* за счет возрастания содержания ингибитора - железа (II) сернокислого семиводного и повышения плотности агарового геля.

Таким образом, приведенные данные позволяют сделать вывод, что осуществление предлагаемого способа выделения *Klebsiella* spp. с применением сред, составленных по примерам №1, №2, №5 и №6 не удовлетворяет требованиям

Осуществление указанного выше способа удовлетворяет требованиям МУ 04-723/3, МУК 4.2.3115-13 с применением сред, состав которых приведен в примерах №3 и №4. Использование среды, указанной в примере №3, является экономически более выгодным.

Источники информации

1. Анганова, Н.В. Характеристика условно-патогенных возбудителей острых кишечных инфекций / Е.В. Анганова, Н.Н. Чемезова, Н.В. Ермолаева, Л.А. Распопина // Журнал инфекционной патологии. 2010. - №19. - С. 12-23.
2. Бардашева, А.В. Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске / А.В. Бардашева, Н.В. Фоменко, Т.В. Калимбетова, И.В. Бабкин, С.О. Кретьен, Е.В. Жираковская, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т.25. - №2. - С. 234-245.

3. Ибрагимов Ф.Х., Журавлева Л.А., Бочановский В.А., Резаев А.А. Селективная питательная среда для выделения клебсиелл. Патент РФ № RU 2265056. Оpubл. 27.11.2005. Бюл. №33.

4. Калина, Г.П. Среды узконаправленного действия для обнаружения клебсиелл / Г.П. Калина // ЖМЭИ. 1980. - №6. - С. 28-32.

5. Меджидов, М.М. Региональные проблемы антибиотикорезистентности микроорганизмов // Антибиотикорезистентность и антимикробная химиотерапия: Материалы 2-ой Всероссийской практической конференции. - Махачкала, 2008. С. 5-7.

6. Меджидов М.М., Степанова Э.Д., Юнусова Р.Ю. Хромогенная питательная среда для выделения и идентификации клебсиелл. Патент РФ № RU 2416635. Оpubл. 20.04.2011. Бюл. №11.

7. Методические указания: Методы контроля бактериологических питательных сред: МУК 4.2.2316 - 08 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 18.01.2008) М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. - 52 с.

8. Методические указания: 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: МУК 4.2.3115-13 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 21.10.2013). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. - 39 с.

9. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями: МУ 04-723/3 (утверждены зам. министра здравоохранения СССР 17.12.1984). М.: МЗ СССР, 1985. - 32 с.

10. Пай, Г.В. сравнение патогенного потенциала изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кишечной микрофлоры человека, из поверхностных сточных вод // Г.В. Пай, Д.В. Ракитина, Н.Н. Пенькова, СМ. Юдин, А.В. Загайнова // Гигиена и санитария. 2020. Т. 99. - №19. - С. 1360-1364.

11. Рахманин, Ю.А. Распространение бактерий рода *Klebsiella* в водных объектах и их значение в возникновении водообусловленных острых кишечных инфекций / Ю.А. Рахманин, Л.В. Иванова, Т.З. Артемова, Е.К. Гипп, А.В. Загайнова, Т.Н. Максимкина, А.В. Красняк, П.В. Журавлев, В.В. Алешня, О.В. Панасовец // Гигиена и санитария. 2016. Т.95.- №4.- С. 397-406.

12. Сиволодский Е.П. Способ выделения и идентификации бактерий рода *Klebsiella*. Патент РФ № RU 2535881. Оpubл. 20.12.2014. Бюл. №35.

13. Шепелин А.П., Марчихина И.И., Полосенко О.В., Шолохова Л.П. Дифференциально-элективная питательная среда для выделения клебсиелл. Патент РФ № RU 2704854. Оpubл. 31.10.2019. Бюл. №31.

14. Choby, J.E. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives (Review) / J.E. Choby, J. Howard-Anderson, D.S. Weiss // J. Intern. Med. - 2020, № 287. - P. 283-300.

15. Lightfoot, N. Bacteria of potential health concern. In: World Health Organization (WHO). Heterotrophic Plate Counts and Drinking Water Safety. London; 2003:61-79.

Таблица 1. Особенности роста тест-штаммов микроорганизмов на испытываемых вариантах питательной среды для выделения *Klebsiella spp.* из клинического материала и объектов внешней среды в течение 18-24 ч от момента начала культивирования при (37±1)°С

Тест-штаммы микроорганизмов; посевная доза, м.к.	Диаметр колоний, количество колоний (М±m)*, морфология колоний						Контроль**
	Пример №1	Пример №2	Пример №3	Пример №4	Пример №5	Пример №6	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3446; 100 м.к.	1,5-1,8 мм Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, светло-малиновые на жёлтом фоне среды	2,5-3,4 мм 37,67±2,03 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, светло-малиновые на жёлтом фоне среды	4,1-5,2 мм 69,0±2,65 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	5,6-7,1 мм 79,67±2,33 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	5,5-6,9 мм 37,0±2,65 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	5,3-6,4 мм 22,0±2,52 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	5,4 - 7,2 мм 74,65±2,35 колоний. Колонии округлые, с ровным краем, розового цвета
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3447; 100 м.к.	1,6-1,9 мм 36,47±1,86 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, светло-малиновые на жёлтом фоне среды	2,7-3,9 мм 41,33±3,53 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, светло-малиновые на жёлтом фоне среды	4,3-5,6 мм 77,0±2,65 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	5,3-7,4 мм 69,67±1,20 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	5,1-6,7 мм 32,0±2,08 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	5,2-6,8 мм 22,33±0,75 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	4,9 - 6,4 мм 68,38±2,18 колоний. Колонии округлые, с ровным краем, розового цвета
<i>Klebsiella oxytoca</i> 3995; 100 м.к.	2,1-2,6 мм 28,0±1,73 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, светло-малиновые на жёлтом фоне среды	3,4-3,8 мм 47,33±2,03 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, светло-малиновые на жёлтом фоне среды	4,6-5,9 мм 78,67±2,60 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	5,1-7,3 мм 72,67±2,40 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	4,9-6,9 мм 30,67±1,76 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	4,5-6,6 мм 20,0±1,53 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, малиновые. Цвет колоний становится малиновым	4,3-5,8 мм 71,79±3,14 колоний. Колонии округлые, с ровным краем, розового цвета
<i>Klebsiella aerogenes</i> 4206; 100 м.к.	2,2-2,4 мм 37,0±2,08 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, бесцветные.	2,9-3,6 мм 45,0±4,32 мм Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, бесцветные.	4,8-6,2 мм 69,0±1,73 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, бесцветные. Вокруг колоний среда приобретает лимонно-жёлтый цвет.	6,2-7,5 мм 71,67±3,53 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, бесцветные. Вокруг колоний среда приобретает лимонно-жёлтый цвет.	6,1-7,3 мм 38,33±2,03 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, бесцветные. Вокруг колоний среда приобретает лимонно-жёлтый цвет.	6,0-7,4 мм 19,0±1,15 колоний. Колонии округлые, полупрозрачные, выпуклые, с ровным краем, слизистые, бесцветные. Вокруг колоний среда приобретает лимонно-жёлтый цвет.	4,1-6,1 мм 65,14±2,34 колоний. Колонии округлые, с ровным краем, розового цвета

Примечание: * - М – среднее значение определяемого показателя; m – ошибка среднего значения определяемого показателя;

** - Контроль - Агар МакКонки, приготовленный из препарата MacConkey AGAR (as per USP/EP/JP/BP) (HARMONIZED) Titan Biotech LTD. India. Lot/B.NO. H1B0AX01. Годен до: Декабрь 2026.

Таблица 1 - Продолжение

Тест-штаммы микроорганизмов; посевная доза, м.к.	Диаметр колоний, количество колоний (M±m)*, морфология колоний						Контроль**
	Пример №1	Пример №2	Пример №3	Пример №4	Пример №5	Пример №6	
<i>Escherichia coli</i> 18; 1000000 м.к.	2,4-3,3 мм 134,33±7,13 колоний. Колонии округлые, выпуклые с ровным краем, полупрозрачные, бесцветные. Вокруг колоний среда приобретает лимонно-жёлтый цвет.	0,5-1,2 мм 83,67±3,28 колоний. Колонии округлые, выпуклые с ровным краем, полупрозрачные, бесцветные. Вокруг колоний среда приобретает лимонно-жёлтый цвет.	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	0,9-1,1 мм Более 700 колоний. Колонии округлые, с ровным краем, розового цвета
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853; 1000000 м.к.	2,8-3,4 мм 53,0±3,21 колоний. Колонии плосковыпуклые, округлые, гладкие, полупрозрачные, жёлтого цвета.	1,3 - 2,5 мм 29,0±2,31 колоний. Колонии плосковыпуклые, округлые, гладкие, полупрозрачные, жёлтого цвета.	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	1,2-1,4 мм Более 500 колоний. Колонии округлые, с ровным краем, бесцветные
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P-5810; 1000000 м.к.	3,1-4,2 мм 62,0±2,65 колоний. Колонии плосковыпуклые, округлые, гладкие, полупрозрачные, жёлтого цвета.	1,6-2,4 мм 35,3±2,33 колоний. Колонии плосковыпуклые, округлые, гладкие, полупрозрачные, жёлтого цвета.	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	1,2-1,4 мм Более 500 колоний. Колонии округлые, с ровным краем, бесцветные
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923; 1000000 м.к.	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
<i>Proteus vulgaris</i> HX19 (222); 100000 м.к.	Роение. Среда приобретает малиновый цвет	1,5-2,5 мм 36,38±1,28 колоний. Колонии округлые, выпуклые, с ровным краем, полупрозрачные, малинового цвета	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	2,1-2,4 мм Более 500 колоний. Колонии округлые, с ровным краем, бесцветные

(57) Формула изобретения

Элективно-дифференциальная питательная среда для выделения *Klebsiella spp.*, содержащая в качестве азотистой питательной основы пептон сухой ферментативный для бактериологических целей, мочевины, агар-агар микробиологический, воду дистиллированную, отличающаяся тем, что в качестве источника углерода она дополнительно содержит L-Арабинозу, железо (II) сернокислое семиводное - в качестве ингибитора роста посторонней микрофлоры, крезоловый красный водорастворимый - в качестве индикатора изменения pH среды при следующем содержании компонентов:

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей - 0,9-1,4%;

L-Арабиноза - 0,2-1,0%;

Железо (II) сернокислое семиводное - 0,01-0,06%;

Мочевина - 0,2-1,0%;

Крезоловый красный водорастворимый - 0,00005-0,004%;

Агар-агар микробиологический - 1,0-1,5%;

Вода дистиллированная - до 100%,

pH готовой среды $7,2 \pm 0,2$.