

8. Khew. P. T. Modulation of Wound healing after glaucoma / P. T. Khaw, L. Chang, T. T. Wong // Curr. Opin. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 12, N 2. – P. 143–148.
9. Tanimoto, S. A. Options in pediatric glaucoma after angle surgery has failed / S. A. Tanimoto, J. D. Brandt // Curr. Ophthalmol. – 2006. – Vol. 17, N 2. – P. 132–137.
10. Прокофьева, М. И. Современные хирургические подходы к лечению рефрактерной глаукомы (обзор литературы) / М. И. Прокофьева // Русский мед. журн. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.rmj.ru/articles\_7296.htm.
11. Melo, A. B. A new, safer method of applying antimetabolites during glaucoma filtering surgery / A. B. Melo, G. L. Spaeth // Ophthalmic. Surg. Lasers Imaging. – 2010. – Vol. 41. – P. 383–385.
12. Малиновский, Г. Ф. Практическое руководство по лечению заболеваний слезных органов / Г. Ф. Малиновский, В. В. Моторный. – Минск, 2000. – С. 126–136.
13. Таги-заде, Н. С. Эффективность применения митомыцина-С в дакриохирургии / Н. С. Таги-заде, П. В. Мусейбова-Оджак, Ч. Ф. Курбанова // Oftalmologiya. – 2010. – № 2. – С. 116–121.
14. Азнабаев, М. Т. К вопросу о профилактике рецидивов дакриоцистита после хирургического лечения / М. Т. Азнабаев, Я. Н. Мунирова // Вестн. Офтальмологии. – 2008. – № 3. – С. 42–43.
15. Dacryocystorhinostomy with intraoperative mitomycin C / S. C. Kao [et al.] // Ophthalmology. – 1997. – Vol. 104, N 1. – P. 86–91.
16. External dacryocystorhinostomy with mitomycin C. Clinical and anatomical evolution with helical computed tomography / E. F. J. Ibanez [et al.] // Arch. Soc. Esp. Ophthalmol. – 2000. – Vol. 75, N 9. – P. 611–617.
17. Alanon Fernandez, M. A. Results the application of mitomycin during endonasal and endocanalicular dacryocystorhinostomy by diode laser / M. A. Alanon Fernandez, F. J. Alanon Fernandez, F. A. Martinez // Acta Otorinolaringol Esp. – 2006. – Vol. 57, N 8. – P. 355–358.

**Abstract.** In this article considered the possibility of using antimetabolites in ophthalmology on the example of two anticancer drugs – Mitomycin–C and 5-fluorouracil. Analyzed the use of antimetabolites in combination with glaucoma filtering operations, considered the possible complications, their causes and possible prevention. Also considered the possibility of using these drugs in dakryosurgery and particularly after dacryocystorhinostomy conducted dacryocystitis.

**Ключевые слова:** *glaucoma, dacryocystorhinostomy, Mitomycin–C, 5-fluorouracil, antimetabolites.*



**Л. Д. Газиумарова, Л. П. Титов, Н. Н. Левшина, А. А. Богуш, И. В. Стрижак, Т. А. Рогачева,  
Л. И. Белановская, С. С. Филипенко, Е. В. Федорович, Т. А. Канашкова**

## ИСПЫТАНИЕ НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИСТЕРИЙ С ЦЕЛЬЮ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

**Реферат.** Цель исследования. Испытание новых питательных сред для накопления и выделения листерий с целью микробиологического мониторинга. *Материал и методы.* В работе использованы тест-штаммы, биологические изоляты бактерий рода *Listeria* и их возможные ассоцианты в клиническом материале, наборы сред для накопления и выделения листерий. *Результаты.* Приведены результаты апробации новых сухих питательных сред для накопления и выделения листерий на базах различных клинических и научных учреждений города Минска по единой, утвержденной Центром экспертиз и испытаний, программе. Среды прошли испытания по всем физико-химическим и бактериологическим показателям, рекомендованы для использования в лабораторной практике.

**Ключевые слова:** *листерии, питательные среды, контроль качества.*

### Введение

Листерии относятся к эмерджентным инфекциям преимущественно пищевым путем передачи. Начиная с 1980-х годов, листериоз привлек к себе внимание в связи с регистрацией крупных вспышек заболеваний людей, связанных с употреблением продуктов питания, контаминированных этим возбудителем [1; 2]. Летальность в целом больных листериозом очень высока и достигает в среднем 40–50%: у новорожденных – 24,8% (тяжелая септическая форма – до 60%), у лиц старше 60 лет – 35% (септическая форма – 30% и выше) и т. д. В США и стра-

нах Европы осуществляется мониторинг за лабораторно подтвержденными случаями инфекции.

В Республике Беларусь статистические данные по заболеваемости листериозом практически отсутствуют. В ряде микробиологических лабораторий (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, городской центр гигиены и эпидемиологии, детской и взрослой инфекционных больниц, Гродненском, Могилевском областных центрах гигиены и общественного здоровья и др.) выделяются патогенные штаммы листерий, что указывает на их циркуляцию и необходимость проведения мониторинга данной ин-

фекции. В пользу этого свидетельствует стабильно высокая заболеваемость ОКИ, значительный процент ОКИ неустановленной этиологии.

Низкий уровень выявления больных листериозом у нас в стране не отражает истинной картины заболеваемости и во многом объясняется неудовлетворительным качеством лабораторной диагностики этой инфекции и отсутствием эффективной системы санитарно-эпидемиологического надзора за ее распространением. Значительный рост числа заболеваний листериозом явился серьезным толчком к разработке новых методов диагностики этой инфекции. Важнейшим элементом современных схем выделения листерий стало использование сухих селективных питательных сред [3–6]. Их применение значительно повысило эффективность выделения листерий из клинического материала и продуктов питания по сравнению с ранее применявшимися средами (кровяной агар, мясо-пептонный агар или агар Хоттингера с теллуридом калия и полимиксином).

В связи с этим нами разработаны отечественные сухие питательные среды для обогащения и выделения листерий из различных клинических источников, пищевых продуктов и объектов внешней среды.

**Цель работы** – анализ результатов испытания новых питательных сред на базах различных клинических и научных учреждений г. Минска с целью микробиологического мониторинга.

#### Материалы и методы исследования

На каждую исследовательскую базу нами представлены по 1 комплекту сред, содержащих пита-

тельную основу и селективную добавку [7–8]. Разработанные среды (ТУ BY 100558032.242–2013, ТУ BY 100558032.235–2013) зарегистрированы Министерством здравоохранения Республики Беларусь, имеют регистрационные удостоверения [9–10].

Для контроля разработанных сред использовали тест-штаммы *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* и их возможные ассоцианты в клиническом материале – *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*. Указанные штаммы были переданы испытательным базам из коллекции лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии и должны были использоваться своими штаммами. Двухсуточные агаровые культуры листерий стандартизировали по стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича в 10 ед., разводя физиологическим раствором до  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  и высевали по 0,1 мл микробной взвеси в 10 мл накопительного бульона и на чашки с селективной средой. Учет сева ассоциативной микробной флоры проводили тем же методом из разведения  $10^{-4}$ . Учет результатов осуществляли через 24–30 ч инкубации при температуре 30 °С (на среде обогащения) и через 48 ч при 37 °С (на среде выделения) по показателям специфической активности и ингибирующим свойствам согласно требованиям ТУ на среды аналогичного значения [11–15]. Для сравнительной оценки испытываемых сред использовали коммерческие среды на основе бульона Фрайзера, агар для идентификации листерий (Palcam) производства фирмы Himedia.

Статистическую обработку данных проводили методом непараметрической статистики с расчетом медианы и 1-го и 3-го квартилей (25-го и 75-го центиля) [16].

Таблица 1 – Результаты сравнительных испытаний среды обогащения для листерий

Показатель	Характеристика нормативно-технических показателей			Соответствие ко- показателям
	РЦГЭ и ОЗ	УЗГКИБ	МГЦГЭ	
Внешний вид	Порошок бледно-желтого цвета			Соответствует
Растворимость	Полная при кипячении в течение 2–3 минут			Соответствует
Концентрация водородных ионов среды (pH)	7,0	7,0	7,0	7,0 ± 0,2
Специфическая активность				
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7973	наличие роста при посеве не ниже $10^{-7}$	наличие роста при посеве не ниже $10^{-7}$	наличие роста при посеве не ниже $10^{-7}$	Соответствует
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 1144	наличие роста при посеве не ниже $10^{-7}$			Соответствует
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19111			наличие роста при посеве не ниже $10^{-7}$	Соответствует
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119		наличие роста при посеве не ниже $10^{-7}$		Соответствует
Ингибирующие свойства				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	нет роста $10^{-4}$	нет роста $10^{-4}$	нет роста $10^{-4}$	Соответствует
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	нет роста $10^{-4}$	нет роста $10^{-4}$	нет роста $10^{-4}$	Соответствует

Таблица 3 – Результаты сравнительных исследований сред для накопления и выделения листерий с контролем

Показатель	Среда для накопления		Среда для выделения	
	ГУ РНПЦ ЭМ	Коммерческая	ГУ РНПЦ ЭМ	Коммерческая
Внешний вид	Порошок бледно-желтого цвета, светочувствителен и гигроскопичен		Порошок темно-желтого цвета	
Растворимость	Полная при кипячении в течение 2–3 минут			
Концентрация водородных ионов среды (pH)	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2
Специфическая активность				
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7973	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-7</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-7</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-11</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-11</sup>
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19111	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-7</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-7</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-5</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-5</sup>
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-7</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-7</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-5</sup>	наличие роста при посеве не ниже 10 <sup>-5</sup>
Ингибирующие свойства				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	нет роста при посеве 10 <sup>-1</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-4</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-4</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-1</sup>
<i>Streptococcus faecalis</i> (клинич.)	нет роста при посеве 10 <sup>-4</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-4</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-4</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-1</sup>
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	нет роста при посеве 10 <sup>-4</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-4</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-4</sup>	нет роста при посеве 10 <sup>-1</sup>

Таблица 4 – Результаты статистической обработки данных на трех базах (среднее значение) по удобству применения используемых питательных сред

Параметр	Результаты испытаний			Референтное значение	Заключение
	Медиана	1-й квартиль	3-й квартиль		
Удобство применения	5 баллов	4 балла	5 баллов	Не менее 4 баллов	Соответствует

**Заключение по результатам испытаний:** комиссия рассмотрела протоколы приемочных клинических испытаний по каждой из сред и установила, что испытываемые изделия производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии соответствуют требованиям ТУ, удобны в применении и могут быть рекомендованы для серийного выпуска и использования в бактериологических лабораториях организаций здравоохранения, пищевой промышленности, в санитарной и ветеринарной бактериологии.

По утвержденной технической документации нами проведен выпуск опытных партий сухих сред (по 10 комплектов каждой), которые были использованы в учебном процессе и для выполнения НИР на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии БГМУ.

В Акте о внедрении, полученном из этой организации указано, что разработанные среды соответствуют своему целевому назначению и относятся к современным методам выделения возбудителей листериозов.

**Выводы**

Проведены сравнительные испытания новых диагностических сред для накопления и выделения листерий в различных клинических и научных учреждениях микробиологического профиля. Как показали эти испытания, разработанные среды отличаются высокой специфической активностью, хорошими ингибирующими свойствами, диагностической надежностью и удовлетворяют требованиям, предъявляемым к заявляемой продукции.

**Результаты и их обсуждение**

В таблице 1 представлены результаты сравнительных испытаний среды обогащения по физико-химическим и бактериологическим показателям, проверенные в 3 диагностических лабораториях г. Минска

Как следует из данных таблицы 1, испытуемые образцы, независимо от используемых для их контроля тест-штаммов, показали одинаковые результаты. При посеве по 0,1 мл суспензии культур листерий из разведения  $10^{-7}$  во всех испытуемых пробах наблюдался рост культур в виде равномерного помутнения в пробирках. Рост ассоциативной микробной флоры подавлялся полностью при посеве из разведения  $10^{-4}$ , что соответствует требованиям контрольных показателей ТУ.

Результаты сравнительных испытаний качества среды для культивирования и выделения листерий (таблица 2) также свидетельствуют об идентичности полученных данных: специфическая активность при высеве культуры по 0,1 мл из разведения  $10^{-6}$  на чашки с селективной средой – не ниже, чем в заявляемых требованиях при полной ингибиции роста ассоциативной микробной флоры (показатель ингибиции –  $10^{-4}$ ). Культуры рода *Listeria* росли на испытуемом агаре в виде зеленовато-серых колоний с черным ореолом диаметром от 1,0 до 1,5 мм. В клинических образцах возбудитель листериоза морфологически может быть сходен с различными кокками (например, энтерококками) и дифтероидами. Но высокие ингибирующие свойства среды в отношении ассоциативной микробной флоры позволяют выделить искомую культуру практически в чистом виде.

Определение ростовых свойств испытуемых сред с помощью типовых АТСС-штаммов, оценка их эксплуатационных характеристик осуществлялась в параллельных опытах с контрольными средами – бульоне Фрайзера и Палкам-агаре производства фирмы Himedia (таблица 3).

Как видно из данных таблицы 3, разработанные среды не уступали по своим качественным показателям контрольным. Однако они проще по компонентному составу, содержат всего 1 гидролизат по сравнению с контролем, а следовательно, и более экономичны в производстве.

Для оценки параметров удобства и безопасности в работе, возможности практического применения, полученные результаты обрабатывались методом вариационной статистики (метод Турки). Метод Турки для нахождения квартилей (верхнего и нижнего) является наиболее простым и не требует каких-либо расчетов. Он основан на использовании медианы в качестве опорного пункта расчетов. Чтобы найти квартили по этому методу нужно:

1. Произвести ранжирование ряда по 5-бальной шкале.
2. Разделить этот ряд на две части. Если число вариантов четное, то просто ряд делится пополам. Если нечетное, то ряд делится на две части, причем медиана входит в каждую из частей.
3. Найти медиану для каждой половины. Полученное число и будет являться соответственно верхним и нижним квартилем.

Результаты статистической обработки полученных данных (таблица 4) также свидетельствовали о соответствии качества сред заявленным характеристикам.

**Таблица 2 – Результаты сравнительных испытаний среды питательной сухой для культивирования и выделения листерий**

Показатель	Характеристика нормативно-технических показателей			Соответствие контроля показателям ТУ
	РЦЭ и ОЗ	УЗ ГКИБ	МГБТУ	
Соответствует	7,0 ± 0,2			Соответствует
Соответствует	внешний вид			Соответствует
Соответствует	Растворимость			Соответствует
Соответствует	7,2	7,2	7,2	Соответствует
Специфическая активность				
Соответствует	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7973	наличие роста при посеве не ниже $10^{-6}$	наличие роста при посеве не ниже $10^{-6}$	Соответствует
Соответствует	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19111	наличие роста при посеве не ниже $10^{-6}$	наличие роста при посеве не ниже $10^{-6}$	Соответствует
Соответствует	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	наличие роста при посеве не ниже $10^{-6}$	наличие роста при посеве не ниже $10^{-6}$	Соответствует
Ингибирующие свойства				
Соответствует	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	нет роста $10^{-4}$	нет роста $10^{-4}$	Соответствует
Соответствует	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	нет роста $10^{-4}$	нет роста $10^{-4}$	Соответствует

Литература

1. Джей, Д. М. Лаборатория знаний / Д. М. Джей, М. Д. Лесснер, Д. А. Гольден. – Бином, 2012. – Гл. 25. – С. 692–725.
2. Ефимочкина, Н. Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Н. Р. Ефимочкина; НИИ питания РАМН. – М., 2010.
3. Biosciences Catalogue. Microbiology, Animal Cell Culture, Plant & Insect Tissue Culture, Molecular Biology Products / Himedia Laboratories, 2008–2009 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.himedialabs.com/HML/Pages/default.aspx>. – Date of access: 20.06.2014.
4. Готовые питательные среды / Научно-исследовательский центр фармакотерапии (НИИЦФ). – СПб., 2005. – С. 14–15.
5. Храмов М. В. [и др.] // Актуальные вопросы разработки и производства диагностических питательных сред и тест-систем: материалы 3-й Междунар. науч.-практ. конф. – Махачкала, 2001. – С. 45.
6. Тартаковский И. С. // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2002. – № 2. – С. 20–30.
7. Газиумарова Л. Д. [и др.] // Современные проблемы инфекции патологической человека: сб. науч. тр. – Минск, 2011. – Вып. 4. – С. 250–254.
8. Газиумарова Л. Д. [и др.] // Здравоохранение. – 2012. – № 10. – С. 17–21.
9. Среда обогащения для листерий: рег. удостовер. № ИМ-7.100880. Рег. номер МН-7.117020-1303 от 02.12.2013.
10. Среда питательная сухая для культивирования и выделения листерий: рег. удостовер. № ИМ-7.100879. Рег. номер МН-7.117020-1303 от 02.12.2013.
11. Питательный бульон для выделения листерий (среда ПБЛ): ТУ 9398-053-78095326-2010 / ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. – Оболенск, 2010.
12. Питательный агар для выделения листерий (среда ПАЛ): ТУ 9398-052-78095326-2010 / ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. – Оболенск, 2010.
13. Рекомендации по организации и проведению контроля качества бактериологических исследований. – Минск, 1987.
14. Микробиологические методы исследования биологического материала: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 19.03.2010 № 075-0210 / Н. Д. Коломиец [и др.]. – Минск, 2010. – С. 68–72.
15. Государственный стандарт Республики Беларусь «Продукты пищевые. Методы выявления и выделения бактерий *Listeria monocytogenes*»: СТБ ГОСТ Р 51921–2011.
16. Шмойлова Р. А., Минашкин В. Г., Садовникова Н. А. Практикум по теории статистики. – 3-е изд. – М., 2011. – С. 131–416.

**Abstract.** *Research objective.* Test of new nutrient mediums for accumulation and allocation of *Listeria* for the purpose of microbiological monitoring. *Material and methods.* In work test-strains, clinical isolates of bacteria of the sort *Listeria* and their possible associates in a clinical material, sets of environments for accumulation and allocation of listeria were used. *Results.* Results of application of new dehydrated nutrient mediums for accumulation and allocation of listeria are given in bases of various clinical and scientific institutions of the city of Minsk on uniform to the Program approved by the Center of examinations and tests. Wednesdays passed tests on all physical and chemical and bacteriological indicators, are recommended for use in laboratory practice. Media have been tested on all physical and chemical and bacteriological parameters and recommended for use in laboratory practice.

**Keywords:** *listeria, nutrient mediums, quality control.*

