



Быстрее, надежнее, экономичнее - все вместе или врозь?

Современные технологии в традиционных микробиологических исследованиях

Несмотря на широкое внедрение в микробиологическую практику современных методов исследования (ПЦР в режиме реального времени, иммунобиологических методов и др.), бактериологический метод остается «золотым стандартом» санитарной микробиологии, дающим наиболее достоверную оценку санитарного состояния исследуемых объектов. Тем не менее, бактериологический метод обладает рядом недостатков. Прежде всего, это длительность исследования. Рутинный бактериологический анализ по определению общих колиформных бактерий (ОКБ), термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) и *E.coli* занимает, по меньшей мере, 48-72 часа. Особенно значим этот аспект для контроля качества водоподготовки, при котором традиционные методы бактериологического контроля имеют фактически ретроспективный характер. Не последнее место занимает и трудозатратность метода, связанная с обеспечением выполнения анализа и, прежде всего, с приготовлением, стерилизацией, разливкой и хранением готовых питательных сред.

Ведущие производители питательных сред прилагают значительные усилия для разработки новых подходов и методов, нивелирующих недостатки бактериологического анализа. Можно выделить, по меньшей мере, два направления перспективных разработок в этой области.

Одно из них направлено на ускорение процедуры анализа за счет введения в состав питательных сред специальных добавок, позволяющих определять маркеры, высокоспецифичные для той или иной группы целевых микроорганизмов. Использование таких добавок позволяет облегчить учет и сократить время анализа за счет сокращения этапа иденти-

■ Рис. 1. Сухая питательная среда CompactDry®



Актуальными задачами совершенствования традиционных методик санитарно-бактериологических анализов остаются: сокращение времени и трудозатрат получения результата, повышение достоверности за счет большей объективности идентификационных признаков, стандартизация условий и этапов выполнения методик. Эти задачи решаются несколькими способами: разработкой питательных сред с маркерами специфичной ферментативной активности; исключением этапов подтверждающих биохимических тестов; разработкой готовых к применению форм расходных материалов, исключающих необходимость автоклавирования, варки, розлива питательных сред; увеличением срока годности готовых к применению расходных материалов. Однако успехи в каком-либо из направлений сопровождаются возникновением проблем в других. Поэтому лаборатории должны с осторожностью подходить к замене традиционных методик на усовершенствованные, проводя сравнительные испытания, целью которых является доказательство преимущества результатов.

Так, для облегчения учета общего микробного числа (ОМЧ) многие производители добавляют в питательную среду редокс-индикатор ТТХ - трифенилтетразолиумхлорид, который при развитии микроорганизмов восстанавливается, окрашивая колонию в розово-красный цвет, что делает их более заметными [5, 11, 17].

Среды, предназначенные для ускоренной идентификации, основаны на выявлении специфических или уникальных ферментов микроорганизмов. К таким ферментам относятся, например, бета-D-глюкуронидаза *Escherichia coli* или бета-D-глюкозидаза энтерококков. Среды указанного типа принято в литературе называть хромогенными, хотя, на наш взгляд, это название спорно. Наверное, более правильно называть их хромогенными средами нового поколения, так как традиционные дифференциальные среды также хромогенны, т.е. о наличии или отсутствии признака мы судим по изменению цвета колоний или среды в целом. Глобальное отличие традиционных сред и хромогенных сред нового поколения заключается в том, что последние позволяют определять не признак (результат действия совокупности ферментов), например, утилизацию лактозы, а конкретные ферменты, например, β -галактозидазу.

Для обнаружения специфических ферментов в состав среды включают хромогенные субстраты - вещества, являющиеся объектом действия соответствующего фермента, при расщеплении которых образуются окра-

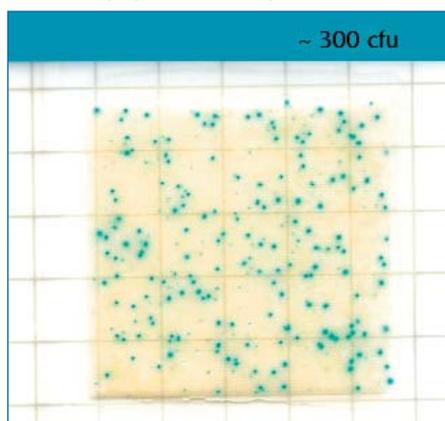
шенные или флюоресцирующие продукты (светятся в УФ-свете). В результате хромогенная среда или колония контрастно изменяет свой цвет или флюоресцирует при наличии у микроорганизма искомого фермента. Большинство хромогенных сред содержат также селективные добавки, подавляющие рост нежелательных бактерий. Использование хромогенных сред позволяет ускоренно (в течение суток), в один этап выделить и одновременно идентифицировать целевые бактерии без проведения дальнейших, дополнительных тестов (или используя 1-2 теста, выполняемых в течение нескольких часов в пределах первых суток, например, капельный тест на индол с реактивом Ковача для *E. coli*).

По таксономическому уровню различают хромогенные питательные среды групповой, родовой, видовой и внутривидовой идентификации. По завершенности исследования среды одноэтапной прямой идентификации подразделяют на среды первичной и окончательной идентификации [8].

На сегодняшний день большинство ведущих производителей питательных сред, таких как Merck, BioMerieux, Oxoid, HiMedia и многие другие, выпускают большой ассортимент хромогенных питательных сред как для клинических исследований, так и для санитарного мониторинга объектов окружающей среды (воды, пищевых продуктов, фармацевтической продукции, косметики). С недавнего времени в НПО «Питательные среды» (г. Махачкала) также стали



■ **Рис. 2.** Подложки серии RIDA® COUNT фирмы - R-Biopharm AG



такого решения может служить продажа готовых жидких и плотных питательных сред, которые предлагает большинство фирм-производителей. Лимитирующим фактором служат относительно небольшие сроки хранения готовых питательных сред, значительно уступающие срокам хранения сухих сред. Кроме того, использование готовых сред ставит лабораторию в зависимость от компании поставщика и оправдано только при эффективно работающей службе доставки, что мало реально для условий РФ.

Перспективным решением также является использование питательных сред на подложках. Срок хранения таких сред не уступает традиционным, а способ применения заметно проще, так как исключаются этапы приготовления, стерилизации и разлива, нет необходимости в подготовке посуды, а инокуляция пробы в большинстве случаев заключается в простом нанесении 1 мл материала на подложку. На рынке питательных сред представлен широкий ассортимент подобной продукции. Принципы использования сред на подложках разных производителей схожи. Продукция разных фирм отличается, в основном, носителем питательной среды и техникой инокуляции пробы.

Такой известный производитель оборудования для мембранной фильтрации как Sartorius производит линейку питательных сред на «питательных картонных подложках» [14]. Питательные картонные подложки (ПКП) - это диск из сорбирующего материала, пропитанный селективной питательной средой, а затем высушенный в специальных условиях и стерильно упакованный в чашку Петри. Активация питательной среды проводится непосредственно перед использованием путем смачивания подложки стерильной водой. Использование таких подложек подразумевает использование мембранных фильтров, которые идут в комплекте с каждой подложкой.

Подобное решение использовано и фирмой Millipore в «сэмплерах» для

отбора проб при оценке микробной загрязненности жидких объектов [15]. Они представляют собой пластмассовый держатель, в котором закреплен мембранный фильтр с сеткой. Под фильтром находится адсорбирующая подложка с высушенной питательной средой, которая при опускании в воду впитывает в себя ровно 1 мл жидкости.

Продукция компании HyServe GmbH & Co., выпускаемая под маркой CompactDry®, представляет собой специальную пористую пластину на пластиковой подложке с крышкой, содержащую соответствующую сухую питательную среду (рис. 1). 1 мл подготовленной пробы наносится в центр пластины и благодаря ее уникальным капиллярным свойствам равномерно распределяется. Дальнейшее исследование не отличается от традиционного [10].

Подложки серии RIDA® COUNT другой немецкой фирмы - R-Biopharm AG - содержат готовые питательные среды на подложке под специальным нетканым материалом (рис. 2), обеспечивающим впитывание и распределение исследуемых проб по поверхности подложки. Прозрачная пленка предохраняет подложку от перекрестного загрязнения при инкубации [17]. Данный продукт обладает важным преимуществом, которое выражается в гибком подходе к способам посева материала. При использовании данной тест-системы доступны посевы жидких образцов в объеме 1 мл, мембранных фильтров при исследовании объектов с низкими уровнями контаминации, тампонов со смывами, а также ее использование для непосредственного взятия отпечатков при контроле микробной обсемененности поверхностей.

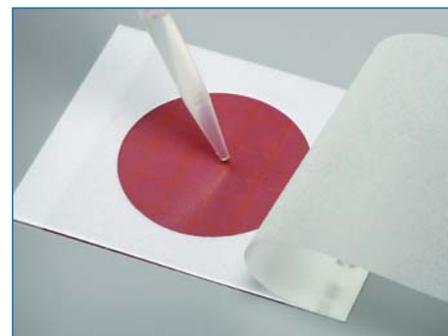
Американская фирма 3M выпускает две линейки сред «быстрого приготовления» - Redigel® и Petrifilm®. В их основе лежит использование в качестве гелеобразующего агента - метоксил пектина (methoxyl pectin). При взаимодействии с ионами Ca²⁺ во влажной среде метоксил пектин образует гель при комнатной температуре [2]. Использование системы Redigel достаточно трудоемко, поскольку подразумевает предварительную подготовку специальных подложек в чашках Петри из питательного агара, обогащенного ионами кальция. Проба смешивается с сухими компонентами питательной среды и выливается на подложку, где после взаимодействия с ионами кальция образуется плотная селективная питательная среда. Преимущество данной системы перед традиционными средами сомнительно. Система Petrifilm лишена данного недостатка и по способу исполнения напоминает продукцию двух предыдущих немецких фирм. Проба в объеме 1 мл нано-

сится на поверхность сухой среды, расположенной на специальной пластиковой подложке (рис. 3), накрывается сверху прозрачной пленкой и специальным распределителем (spreader) распределяется по всей поверхности среды. В течение короткого времени образуется гелеобразная среда, плотно прилегающая к поверхности покровной пленки. Данный аспект исполнения немаловажен, так как сообщает данной системе уникальную способность, выделяющую Petrifilm из перечня подобных тест систем. В отличие от других, тест система Petrifilm позволяет учитывать газообразование, возникающее при утилизации лактозы в процессе первичной инкубации в течение 24-48 часов. Эта особенность является значимой для отечественных лабораторий, поскольку образование газа при сбраживании лактозы в нашей нормативной базе является обязательным признаком при идентификации общих и термотолерантных колиформных бактерий (ОКБ и ТКБ). Таким образом, использование системы Petrifilm для определения колиформных бактерий позволяет на 24-48 часов сократить время исследования.

Очевидным недостатком вышеперечисленных систем является ограниченный и жестко лимитируемый объем исследуемой пробы - 1 мл. Исключение составляют среды на картонных подложках фирмы Sartorius и линейка сред RIDA® COUNT, предусматривающие при необходимости использование метода мембранной фильтрации. Следствием ограничения исследуемого объема является снижение чувствительности метода. С учетом статистических правил учета результата пределом обнаружения для тест-систем, исследующих 1 мл подготовленного образца, является 15 целевых КОЕ/мл образца.

Фирма 3M попыталась расширить диапазон чувствительности, выпустив тест-систему Petrifilm для определения ОКБ в двух модификациях CC и HSCC. Petrifilm CC типичной компоновки предназначена для посева 1 мл пробы, тогда как Petrifilm HSCC позиционируется как система с повышен-

■ **Рис. 3.** Сухая среда на специальной пластиковой подложке Petrifilm





СИСТЕМНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ВОДЫ

- ▶ Детекция и идентификация **ЦИСТ ЛЯМБЛИЙ** и **ООЦИСТ КРИПТОСПОРИДИЙ** по МУК 4.2.1884-04, МУК 4.2.2314-08 и МУК 4.2.2959-11
- ▶ Определение **МИКРОЦИСТИНОВ**
- ▶ Определение **ЭКОТОКСИКАНТОВ, ПАУ, ПЕСТИЦИДОВ** и **ПАВ**
- ▶ Ускоренный контроль **САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ, УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ** и **ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Подключаем к межлабораторным сравнительным испытаниям FAPAS®

123022, Москва, Звенигородское ш., 5, СТАЙЛАБ
тел./факс (495) 662-64-15, 707-28-68, (499) 256-23-13
телефон (495) 729-17-04
info@stylab.ru

ной чувствительностью (High Sensitive), которая достигается за счет посева большего объема пробы (5 мл) и предназначена для проб с низкими уровнями контаминации.

Однако пятикратное повышение чувствительности не решает вопроса при исследовании объектов с низкими уровнями микробного загрязнения, например воды.

В связи с ограниченной чувствительностью метода фирмы, производящие тест-системы, использующие сухие среды на подложках, в основном предлагают их использование для микробиологического контроля пищевых продуктов, в ряде случаев фармацевтической продукции и косметики, то есть объектов, в которых нормативными документами допускаются относительно высокие уровни контаминации.

Выходом из создавшегося положения является использование посева методом мембранной фильтрации, как в случаях ПКП фирмы Sartorius и продуктов RIDA® COUNT. Фирма 3М разработала тест-системы Petrifilm Aqua в четырех вариантах, предназначенные для определения общего микробного числа, колиформных бактерий, дрожжей и плесеней, и энтеробактерий методом мембранной фильтрации. Анонсируемые производителем результаты сравнительных испытаний с традиционными методами определения перечисленных показателей требуют независимой проверки, но заявляют о хорошей сходимости.

Не обязательной, но приятной опцией, сопровождающей среды на подложках, является возможность автоматического учета результата. Для

RIDA® COUNT выпускается специальный переходник-адаптер для возможности использования подложек с существующими автоматическими счетчиками колоний. Дальше всех пошла фирма 3М, которая выпускает специальное устройство 3М™ Petrifilm™ Plate Reader.

Еще одно значимое преимущество тест-систем на подложках заключается в том, что в качестве питательных сред для их изготовления применяются современные хромогенные среды. Это позволяет сочетать положительные аспекты обоих направле-

ний развития технологии микробиологических питательных сред.

Несколько особняком стоит продукция фирмы Idexh [13]. Она выпускает линейку тест-систем для исследования воды, в которых также используются хромогенные среды и «плашечный» формат, однако принципиально отличающихся от всех предыдущих способом учета результата. В основу тест-систем этой фирмы положен принцип НВЧ (Наиболее Вероятного Числа), аналогичный титрационному (бродильному) методу, присутствующему в отечественных методических документах. Однако, в отличие от отечественного метода, тест-системы фирмы Idexh максимально избавлены от недостатков титрационного метода (низкая достоверность, длительность, необходимость постановки подтверждающих тестов). Достоверность метода повышается за счет исследования большого количества объемов образца (повторностей), а длительность исследования сокращается за счет отсутствия этапа постановки подтверждающих тестов. Например, Colilert®-18 позволяет получить результат по показателю ОКБ и E.coli уже через 18 часов. Идентификацию обеспечивает использование хромогенных сред. В средах этой фирмы широко используются флюоресцирующие хромогенные добавки. Кроме того, специалисты фирмы заявляют, что в продукте Colisure® решена проблема специфичности при определении ОКБ за счет внесения добавок, ингибирующих рост посторонних микроорганизмов и, в частности, аэромонад. Также интересно использование флюоресцирующих хромогенных добавок в тест-системе

РОСА АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

- **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ, РАДИОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ ВОДЫ, ПОЧВЫ, ОСАДКОВ, РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВОДОПОДГОТОВКИ**
- **МЕТОДИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ**
- **МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ**
- **ШКОЛЫ-СЕМИНАРЫ ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ЛАБОРАТОРИЙ**

ЗАО «РОСА», 119297, Москва, ул. Родниковая, д. 7, стр. 35
Тел.: (495) 502-44-22 E-mail: mail@rossalab.ru www.rossalab.ru



SimPlate®, предназначенной для определения ОМЧ [14].

Компактные тест-системы, использующие хромогенные среды, вполне жизнеспособны, о чем свидетельствуют многочисленные испытания, сравнивающие такие тест-системы разных производителей как между собой, так и с традиционными методами исследования, регламентированными действующей нормативной базой [2, 4, 11, 12, 18, 19]. Подтверждением практической значимости новых способов исследования является и немалое количество сообщений об их применении в самых различных областях микробиологии [1, 3, 7, 19]. Тем не менее, существуют и критические замечания в адрес питательных подложек. Так, фирма Millipore заявляет, что питательные подложки при определенном удобстве их применения не обеспечивают высокой эффективности прорастания микроорганизмов в колонии (в особенности, колиформ) и поэтому предлагает свою продукцию данного типа только для скрининговой ориентировочной оценки обсемененности объектов окружающей среды [15].

Несмотря на очевидные различия существующих современных компактных тест-систем, имеется еще один аспект, который их объединяет и который на первый взгляд незаметен. Унификация и автоматизация методов выполнения и учета результатов анализа, лежащая в основе тест-систем такого рода, направлена на исключение из производства рутинных микробиологических анализов высококвалифицированных специалистов-бактериологов. Выполнение максимально упрощенных алгоритмов анализа, не требующих специальной подготовки, будет доступно рядовому персоналу, и, следовательно, станет существенно дешевле. Основные производственные затраты будут пе-

ренесены с персонала на расходные материалы.

Суммируя все вышеизложенное, можно сказать, что компактные тест-системы для бактериологического анализа, использующие современные хромогенные среды, являются перспективным направлением развития современной микробиологии и, прежде всего, микробиологии санитарной, для которой ускорение получения результата бактериологическим методом является жизненно важной проблемой. Хотя внедрение подобных инноваций в отечественную практику крайне затруднено отсутствием нормативной базы, регламентирующей процедуру расширения перечня разрешенных методов и средств исследования для тех или иных объектов окружающей среды.

**Сергей Тымчук, кандидат
медицинских наук,
ведущий бактериолог;
Владимир Ларин, кандидат
биологических наук,
начальник отдела биологических
методов анализа.
ЗАО «РОСА» (г. Москва)**

Литература

1. «A Microbiological Evaluation of the Surface Cleaning and Disinfecting Properties of the Gates Mectrol PosiClean® Continuous Food Grade Belting» by Nelson S. Slavik, Ph.D., Environmental Health Management Systems, Inc.
2. Dry rehydratable film method for rapid enumeration of coliforms in foods (3M Petrifilm Rapid Coliform Count plate): collaborative study; Kinneberg KM et al. AOAC Int, 2002 Jan-Feb, 85(1), 56 - 71.
3. <http://mastitis.researchtoday.net/archive/6/9/1128.htm> «Evaluation of the University of Minnesota Tri-plate and 3M Petrifilm for the isolation of Staphylococcus aureus and Streptococcus species from clinically mastitic milk samples.» McCarron JL, Keefe GP, McKenna SL, Dohoo IR, Poole DE.
4. http://micrologylabs.mennonite.net/Food_Microbiology/Precollab_Study «The

Enumeration of Total Coliforms and Escherichia coli in Food and Dairy Products: A Comparative Study of The ColiChrome 2® Redigel® Method to MPN, Petrifilm® EC and VRB Redigel® Methods» J. N. Roth and G. L. Bontrager, RCR Scientific, Goshen.

5. http://www.arrowscientific.com.au/component/page,shop.browse/option,com_virtuemart/Itemid,5/vmcchk,1/.
6. <http://www.biorosinfo.ru/Vcongress/Medshidov.pdf>
7. <http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3373>
- Академия Биотехнологии: Микробиологические экспресс-методы оценки безопасности продукции вермифтехнологий.
8. http://www.dntpasteur.ru/manual1_31.php.
9. <http://www.ecwatech.ru/abstracts/2008/10/896.doc>
10. http://www.hyserve.com/product_part.php?product=01
11. http://www.hyserve.com/docs/Evaluation_of_dryfilm_methods_for_aerobic_colony_counts-PHLS-2001.pdf
12. http://www.hyserve.com/docs/pub_050222_02.pdf «Compact dry for the Enumeration of Bacteria in Food». S.Mizuochi, H.Kamiya, H.Kodaka, H.Sengoku and K.Horigome. Nissui Pharmaceutical Co.,LTD. 1075-2 Hokunanmoro Yuuki Ibaraki, ?307-0036, Japan.
13. http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/water/comparison.jsf
14. http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/water/simplate.jsf
15. http://www.millipore.ru/m_microb/microb4.htm
16. <http://www.sartogosm.ru/production/265/>
17. <http://www.vostokbio.com/RIDACount.pdf>
18. «Organic Film & General Organic Fouling Indices: ATP, Dip Slides, and Agar Film» by Attila G. Relyeny, Ph.D., AMSA, Inc. Published in The «Analyst» in the April issue of 2001;
19. Repeatability of the petrifilm HECTM test and agreement with a hydrophobic grid membrane filter (HGMF) method for the enumeration of Escherichia Coli O157:H7 on beef carcasses. C.A.Power, S. DeGrandis, R. Johnson, K. Rahn, M. Griffiths and S. McEwen.

В 2011 году в Омской области построено и реконструировано 229 км водопроводных сетей

В 2011 году в рамках региональной долгосрочной программы «Чистая вода» и аналогичных муниципальных программ в Омской области было построено и реконструировано 228,7 км сетей водоснабжения, подключено к системам водоснабжения более 3,7 тыс. квартир. В частности, были построены водопроводы для жителей деревни Мешково Большереченского района и микрорайона комплексной застройки в Исылкуле. Проведена реконструкция водопроводных сетей в райцентрах Кормиловка, Тюкалинск и Черлак. Предприятием «Омскоблводопровод» проведена реконструкция более 10,4 км сетей Любино-Исылкульского и Таврического групповых водопроводов. На реализацию этих мероприятий из областного бюджета направлено более 33 млн. руб. Кроме того, на разработку схемы водоснабжения Омской области и проектно-изыскательские работы для строительства Горьковского группового водопровода выделено 10 млн. руб. Кроме того, в 2011 году за счет средств местных бюджетов и внебюджетных источников в области построено и реконструировано 6 км сетей водоотведения, 880 квартир подключено к системам водоотведения.

Утверждена программа развития фонтанов в Санкт-Петербурге на 2012-2015 гг.

Постановлением губернатора Санкт-Петербурга Георгия Полтавченко утверждена «Программа развития фонтанов и фонтанных комплексов в Санкт-Петербурге на 2012-2015 годы». В соответствии с программой до 2015 года должно быть восстановлено 20 фонтанов. Это, в частности, фонтан-поилка на Сенной пл., главный фонтан Московского парка Победы «Слава», фонтан на ул. Писарева, д. 3, фонтаны на Румянцевской пл., фонтаны на аллее Смольного, фонтан с четырьмя сфинксами на Пулковском шоссе, фонтаны возле площади Победы и другие. Суммарные затраты на реконструкцию фонтанов оцениваются в 508 млн. руб. Сейчас в хозяйственном ведении ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга» находится 55 фонтанов и 4 фонтанных комплекса (в том числе 20, подлежащих реконструкции). Всего в сезоне 2012 года будет работать 38 фонтанов.