

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Борисова О.Ю.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Шепелин А.П.², Домотенко Л.В.², Миронов А.Ю.¹,
Афанасьев С.С.¹, Афанасьев М. С.³, Алёшкин В. А.¹

ВНЕШНИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОВЕДЕНИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, п. Оболensk, г. о. Серпухов, Московская обл., Россия;

³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия

Представлены результаты сравнительных исследований по выделению и идентификации нетоксигенного штамма *C. diphtheriae*, проведённых тремя различными коммерческими лабораториями. Использован типовой нетоксигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *mitis*. Для проведения исследований готовились три линейки серийных десятикратных разведений чистой бактериальной культуры с последующим контрольным высевом на среды первичного посева и подсчётом КОЕ/мл. Произведено пулирование тампонов 24-часовой бактериальной культурой нетоксигенного штамма *C. diphtheriae*. Тампоны предоставлены из трёх различных лабораторий – тупферы Σ -Transwab® с жидкой средой Эймса и аппликатором с тонким удлинённым тампоном Σ -Swab® для отбора проб из узких полостей (из первой и второй лабораторий) и вискозный тампон-зонд в комплекте с пробиркой с агаризованной транспортной средой Эймса с активированным углём (из третьей лаборатории). После пулирования тампоны доставлены в коммерческие лаборатории. В лабораториях выделены в чистой культуре и идентифицированы: *Corynebacterium* spp. (не менее 10³ КОЕ/тмп) (первая лаборатория), *S. epidermidis* (10² КОЕ/мл) (вторая лаборатория), *C. diphtheriae* биовар *gravis* нетоксигенный (третья лаборатория). Проведённое исследование свидетельствует о том, что необходимо усилить надзор за культуральными исследованиями, проводимыми в различных лабораториях. Это позволит повысить качество исследований на дифтерийную инфекцию и выявлять скрытое бактерионосительство, которое является резервуаром возбудителя дифтерийной инфекции, и будет способствовать поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения России в отношении дифтерии.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; бактериологическая диагностика.

Для цитирования: Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Миронов А.Ю., Афанасьев С. С., Афанасьев М. С., Алёшкин В. А. Внешний контроль качества проведения бактериологического исследования при выделении *Corynebacterium diphtheriae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (8): 509-512.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-509-512>

Borisova O.Yu.¹, Gadua N.T.¹, Pimenova A.S.¹, Shepelin A.P.², Domotenko L.V.², Mironov A.Yu.¹, Afanasiev S.S.¹,
Afanasiev M.S.³, Aleshkin V.A.¹

COMPARATIVE TESTS OF QUALITY OF BACTERIOLOGICAL INVESTIGATION WITH *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* ISOLATION

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Russian Federation;

³I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russian Federation

The results of comparative experimental studies of identification of nontoxigenic *C. diphtheriae* strain by three different commercial laboratories are presented. A typical nontoxigenic strain of *C. diphtheriae* biovar *mitis* was used. For the studies, three lines of ten-fold dilutions of bacterial culture were prepared, followed by control planting on the medium and counting CFU/ml. In the experiment, tampons were pooled with a 24-hour bacterial culture of a nontoxigenic *C. diphtheriae* strain. Tampons were provided from three different laboratories – Σ -Transwab® with Ames liquid medium (from the first and second laboratories) and a viscose tampon with coal medium (from the third laboratory). After pooled, tampons were delivered to commercial laboratories. And as a result of the experiment, *Corynebacterium* spp. was identified in first laboratory (10³ CFU/tamp), *S. epidermidis* (10² CFU/ml) – in second laboratory and nontoxigenic *C. diphtheriae* biovar *gravis* – in third laboratory. The study indicates that there is a need to the supervision of bacteriological investigations conducted in various laboratories. This will improve the quality of investigations on diphtheria infection and identify of diphtheria carrier, which is a reservoir of the causative agent of diphtheria, and will contribute to the maintenance of sanitary and epidemiological well-being in our country.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; bacteriological diagnosis.

For citation: Borisova O. Yu., Gadua N. T., Pimenova A. S., Shepelin A. P., Domotenko L. V., Mironov A. Yu., Afanasiev S. S., Afanasiev M. S., Aleshkin V. A. Comparative tests of quality of bacteriological investigation with *Corynebacterium diphtheriae* isolation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (8): 509-512 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-8-509-512>

Information about authors:

Borisova O. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Gadua N. T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;
Pimenova A. S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Shepelin A. P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>;
Domotenko L. V., <http://orcid.org/0000-0002-4785-6418>;
Mironov A. Yu. <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Afanasiev S. S., <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>;
Afanasiev M. S., <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>;
Aleshkin V. A., <https://orcid.org/0000-0002-2701-431X>.

For correspondence: Borisova O. Yu., doctor of medicine (MD), professor, head of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections; e-mail: olgborisova@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Received 25.04.2021

Accepted 21.05.2021

Введение. Дифтерия является воздушно-капельной бактериальной инфекцией, управляемой средствами массовой иммунизации, которая в России проводится с 1959 г. с целью снижения заболеваемости и летальности. Достигнутые результаты подтвердили значимость массовой специфической иммунопрофилактики среди населения для поддержания в стране санитарно-эпидемиологического благополучия по данной инфекции [1-3].

В течение первого десятилетия XXI века заболеваемость дифтерией остаётся на спорадическом уровне с ежегодным снижением числа заболевших. Согласно данным государственной статистической отчётности, в 2017 г. заболевших дифтерией не зарегистрировано и выявлено 2 бактерионосителя, в 2018 г. – зарегистрировано 4 случая заболевания и 3 случая бактерионосительства, в 2019 г. – зарегистрировано 3 случая заболевания и 2 случая бактерионосительства. В течение последних пяти лет не регистрируются вторичные случаи в очагах инфекции и летальные исходы. В структуре клинических форм преобладают лёгкие локализованные формы дифтерии [4-6].

В условиях единичных случаев сохраняется актуальность проблемы дифтерийной инфекции [4-6]. Поддержанию эпидемического процесса при дифтерии способствует наличие скрытых источников инфекции, спорты восприимчивых лиц, бактерионосительство, которое является резервуаром возбудителя инфекции и поддерживает его существование как биологического вида [2, 3, 4-6]. Существует риск завоза дифтерии с неблагополучных территорий в результате сезонной миграции туристов [7-9] и трансграничной трудовой миграции, что может привести к ухудшению эпидемиологической ситуации за счёт распространения возбудителя инфекции среди восприимчивых лиц. В условиях спорадической заболеваемости и роста числа непривитых лиц, главная роль в распространении инфекции отводится бактерионосителям токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*.

Система лабораторной диагностики дифтерии, используемая на территории России, создавалась и разрабатывалась на протяжении многих лет несколькими поколениями исследователей и практических микробиологов, среди которых ведущая роль принадлежит сотрудникам МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Согласно СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной ин-

фекции», культуральное исследование проводят с целью лабораторной диагностики дифтерии, выявления источников инфекции, подтверждения эпидемиологических связей и наблюдения за распространением токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Качество лабораторной диагностики зависит как от преаналитического этапа – взятие и доставка патологического материала, так и от аналитического этапа – культуральное исследование, проводимое в микробиологических лабораториях. Учитывая, что на территории России исследования на дифтерийную инфекцию проводятся бактериологическими лабораториями различных форм собственности (государственными, коммерческими), расширяется рынок транспортных сред, применяются автоматизированные бактериологические комплексы, целесообразно оценить эффективность выделения и идентификации *C. diphtheriae* при исследовании микрофлоры ротоглотки.

Цель работы – провести внешний контроль качества по выделению и идентификации нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* различными лабораториями.

Материал и методы. В исследовании использован типовой нетоксигенный штамм *C. diphtheriae* биовара mitis В-7816, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК». Восстановление жизнеспособности лиофилизированной бактериальной культуры осуществлено в соответствии с инструкцией, предоставленной правообладателем. *C. diphtheriae* выращивали на кровяно-теллуритовом агаре (КТА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (ЛейТран, Москва) и 0,02% теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с инкубацией при температуре 37° С в течение 24 и 48 часов.

В качестве контаминируемого субстрата использованы транспортные системы Σ -Transwab® с жидкой средой Эймса и пластиковым аппликатором с тонким удлинённым тампоном Σ -Swab® из пенистого полиуретана на конце для отбора проб из узких полостей (Medical Wire, Англия) и сухие стерильные одноразовые тампон-зонды из вискозы с пластиковым аппликатором в индивидуальной упаковке (Сорап, Италия) в комплекте с пробиркой с агаризованной транспортной средой Эймса с активированным углём.

Подсчёт колониеобразующих единиц (КОЕ) осуществляли с помощью счётчика колоний Scan® 500

(Interscience, Франция) с использованием полуавтоматического режима.

Результаты. С целью оценки эффективности выделения и идентификации *C. diphtheriae* нами в трёх различных коммерческих лабораториях взяты тампоны для забора материала из ротоглотки. Две лаборатории (лаборатория 1 и лаборатория 2) предоставили транспортные системы Σ -Transwab[®], состоящие из пластикового аппликатора с тонким удлинённым тампоном Σ -Swab[®] из ячеистого пенополиуретана на конце и пробирки с резьбовой крышкой оранжевого цвета и коническим дном с юбкой устойчивости, содержащей 1,0 мл жидкой среды Эймса, предназначенные для отбора проб из узких полостей (уретра, носоглотка) и для отбора проб биологического материала у детей. Третья лаборатория (лаборатория 3) предложила сухой стерильный одноразовый тампон-зонд из вискозы с пластиковым аппликатором в комплекте с пробиркой с агаризованной транспортной средой Эймса с активированным углём.

Готовились три линейки серийных десятикратных разведений 24-часовой бактериальной культуры типового нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *mitis* В-7816 в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида в соответствии со стандартным образцом 10 ЕД мутности (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ, Москва). Каждое приготовленное разведение контролировалось путём посева в трёх повторностях по 100 мкл на чашки

Петри с плотными питательными средами двух видов – КТА на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и Коринебакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы инкубировались при 37° С в течение 24-48 ч и подсчитывалось число выросших колоний (КОЕ/мл) (табл. 1).

На каждый из трёх тампонов, предложенных лабораториями частной формы собственности, стерильным наконечником с аэрозольным барьером наносилось по 100 мкл бактериальной взвеси с концентрацией 10⁶ м.к./мл. Контаминированные и помещённые в транспортные среды тампоны доставлялись в лабораторные центры медицинских коммерческих организаций.

Одновременно, с целью контроля качества пулирования бактериальной суспензией тампонов, из каждого разведения (от -1 до -7) по 100 мкл пулировали на аппликатор с тонким удлинённым тампоном Σ -Swab[®] на конце (Medical Wire, Англия) и на сухой тампон-зонд из вискозы (Sorap, Италия). Потом материал, нанесённый на субстраты различного типа, одновременно засеивали на КТА и на Коринебакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), которые широко используются при проведении лабораторной диагностики дифтерийной инфекции. Через 24 и 48 ч подсчитывалось число выросших колоний (КОЕ/тампон) (табл. 2).

Как следует из табл. 2, при посеве материала с зонд-тампона из вискозы (Sorap, Италия) вне зависимости от используемой питательной среды рост колоний зафик-

Таблица 1

Приготовление разведений и учёт КОЕ/мл нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *mitis* В-7816

Разведение	Количество м.к. в 1 мл	Среднее количество КОЕ в 1 мл			
		Среда выращивания КТА		Среда выращивания Коринебакагар	
		24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
-1	10 ⁸	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий
-2	10 ⁷	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий
-3	10 ⁶	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий
-4	10 ⁵	Множественный рост бактерий	Множественный рост бактерий	Множественный рост бактерий	Множественный рост бактерий
-5	10 ⁴	8,23×10 ³	8,55×10 ³	5,73×10 ³	5,95×10 ³
-6	10 ³	6,50×10 ²	6,53×10 ²	4,33×10 ²	4,51×10 ²
-7	10 ²	5×10	5×10	2×10	2×10

Таблица 2

Высевы бактериальной суспензии с тампонов различных видов

Количество м.к. в 100 мкл суспензии	КОЕ/тампон							
	Тупфер Σ -Transwab [®]				Тампон-зонд из вискозы			
	Среда выращивания КТА		Среда выращивания Коринебакагар		Среда выращивания КТА		Среда выращивания Коринебакагар	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
10 ⁷	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий	Сплошной рост бактерий
10 ⁶	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий
10 ⁵	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	Густой рост бактерий	2 100	2 400	1 600	1 920
10 ⁴	100	120	97	127	4	4	4	4
10 ³	10	11	4	9	2	2	1	2
10 ²	3	5	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0

Результаты идентификации нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *mitis* В-7816

Лаборатория	Лаборатория 1	Лаборатория 2	Лаборатория 3
Вид тампона	Тупфер Σ -Transwab® для отбора проб из узких полостей	Тупфер Σ -Transwab® для отбора проб из узких полостей	Тампон-зонд из вискозы
Длительность	2 суток (48 ч)	5 суток (120 ч)	8 суток (192 ч)
Результат	<i>Corynebacterium spp.</i> (не менее 10 ³ КОЕ/тамп)	<i>S. epidermidis</i> (10 ² КОЕ/мл)	<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i> нетоксигенный

сирован с тампонов, содержащих не меньше 10³ м.к.. При работе с тонким удлинённым тампоном Σ -Swab® из транспортной системы Σ -Transwab® (Medical Wire, Англия) рост колоний отмечался с тампонов, содержащих не меньше 10² м.к..

Проанализированы результаты исследования контаминированного материала, полученные из различных коммерческих лабораторий, которые предоставили результаты с различной продолжительностью выполнения (табл. 3).

Обсуждение. Результат, полученный в лаборатории 1, на наш взгляд, является недостаточно полным, поскольку у специалистов, проводивших исследования, не возникло настороженности в отношении выделенного микроорганизма. К роду *Corynebacterium* относится вид *C. diphtheriae*, среди штаммов которых имеются и токсигенные, являющиеся возбудителями дифтерийной инфекции. Такие штаммы могут быть выделены в лаборатории как при проведении микробиологического исследования с диагностической целью, так и случайно – при проведении профилактических обследований, которые мы имитировали в данном исследовании.

Результат, полученный в лаборатории 2, является абсолютно неприемлемым, поскольку в тупфер пулировали чистую культуру *C. diphtheriae*. Данный результат идентификации выделенной чистой культуры полностью дезориентирует, как врача-клинициста, так и эпидемиолога.

Результат, полученный в лаборатории 3, свидетельствует о том, что специалисты, проводившее исследование, имеют настороженность в отношении выделения *C. diphtheriae*. Они провели полную идентификацию выделенной чистой культуры, однако допустили ошибку при определении биовара штамма *C. diphtheriae*.

Заключение. Проведённое исследование свидетельствует о необходимости усилить надзор за исследованиями, проводимыми в различных лабораториях, в том числе необходимость прохождения специалистами, осуществляющими исследование мазков из ротоглотки и носа, тематического усовершенствования по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции и внешнего контроля качества бактериологических исследований на дифтерийную инфекцию. Усиление надзора позволит повысить не только качество исследований на дифтерийную инфекцию, но и, самое главное, выявлять скрытое бактерионосительство, которое является резервуаром возбудителя дифтерийной инфекции, и будет способствовать поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения России в отношении дифтерии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7-9 см. REFERENCES)

1. Маркина С.С., Максимова Н.М., Котова Е.А., Жилина Н.Я. Заболеваемость дифтерией в России в 1993-1995 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 1997; 4: 8-10.
2. Максимова Н.М., Маркина С.С., Яцковский К.А., Черкасова В.В., Корженкова М.П., Сафронова А.В. и др. Дифтерия в России в 2005-2009 годах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 3(52): 31-6.
3. Максимова Н.М., Якимова Т.Н., Маркина С.С., Яцковский К.А., Адугозелов С.Э. Дифтерия в России в 21 веке. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(5(96)): 4-15.
4. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 29.09.2017 г. № 01/13216-17-27.
5. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 19.12.2018 г. № 01/16590-2018-27.
6. О заболеваемости дифтерией и состоянии антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 10.10.2019 г. № 02/14390-2019-27.

REFERENCES

1. Markina S. S., Maximova N. M., Kotova E. A., Zhilina N. Ya. The incidence of diphtheria in Russia in 1993-1995. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni*. 1997; 4: 8-10. (in Russian)
2. Maksimova N.M., Markina S.S., Yatskovsky K.A., Cherkasova V.V., Korzhenkova M.P., Safronova A.V. et al. Diphtheria in Russia in 2005-2009. *Epidemiologiya I vaksinoprofilaktika*. 2010; 3(52): 31-6. (in Russian)
3. Maksimova N.M., Yakimova T. N., Markina S. S., Yatskovsky K.A., Aduguzelov S. E. Diphtheria in Russia in the 21st century. *Epidemiologiya I vaksinoprofilaktika*. 2017; 16(5(96)): 4-15. (in Russian)
4. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rospotrebnadzor dated 29.09.2017. No. 01/13216-17-27. (in Russian)
5. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rospotrebnadzor dated 19.12.2018. №. 01/16590-2018-27. (in Russian)
6. On the incidence of diphtheria and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rospotrebnadzor dated 10.10.2019. №. 02/14390-2019-27. (in Russian)
7. World Health Organization (2021). 2020 global summary. *WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system*. Available at: https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary (accessed 5 April 2021).
8. Centers for Disease Control and Prevention (2021). Chapter 1: Diphtheria. *Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases*. Available at: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/sur-manual/chpt01-dip.html> (accessed 5 April 2021).
9. Centers for Disease Control and Prevention (2021). Chapter 4: Travel-related infectious diseases. Diphtheria. *Yellow Book 2020: health information for international travel*. Available at: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/diphtheria> (accessed 5 April 2021).

Поступила 25.04.21

Принята к печати 21.05.21