

8. Yanushevich O.O., Dmitrieva L.A., Grudyanov A.I. *Periodontitis XXI Century. [Parodontit XXI vek]*. Moscow; 2012. (in Russian)
9. Ashimoto A., Chen C., Bakker I., Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 1996; 11 (4): 266–73.
10. Ezzo P.J., Culter C.W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol.* 2000. 2003; 32: 24–35.
11. Le H., Theilade E., Jensen S.B. Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 1965; 36: 177–87.
12. Grande S.R., Imbroni A.V., Okuda O.S., Lotufo R.F., Magalhães M.H., Nunes F.D. Herpes viruses in periodontal compromised sites: comparison between HIV-positive and -negative patients. *J. Clin. Periodontol.* 2008; 35 (10): 838–45.
13. Mombelli A., Meier C. On the symmetry of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 2001; 28 (8): 741–5.

Received 27.05.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 579.871.1.083.12

Шепелин А.П.<sup>1</sup>, Полосенко О.В.<sup>1</sup>, Борисова О.Ю.<sup>2</sup>, Пименова А.С.<sup>2</sup>, Гадуа Н.Т.<sup>2</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Московская обл., пос. Оболенск; <sup>2</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва

*Проведены сравнительные испытания питательных сред для выделения и накопления дифтерийных бактерий: шести серий питательной среды Коринебакагар производства ФБУН ГНЦ ПМБ и трех серий кровяного теллуритового агара. Представлены итоговые результаты по определению биологических показателей всех серий питательных сред. Коринебакагар рекомендуется к использованию в практике здравоохранения для первичного посева патологического материала при проведении культурального исследования на дифтерию.*

**Ключевые слова:** питательные среды; коринебактерии; специфическая активность; ингибирующие свойства.

**Для цитирования:** Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (1): 59–64.

Shepelin A.P.<sup>1</sup>, Polosenko O.V.<sup>1</sup>, Borisova O.Yu.<sup>2</sup>, Pimenova A.S.<sup>2</sup>, Gadua N.T.<sup>2</sup>

TMOSKOVNE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF GROWTH MEDIUMS FOR SEPARATION OF CORYNEBACTERIA

<sup>1</sup>The state research center of applied microbiology and biotechnology of Rospotrebnadzor, 142279 village of Obolensk, the Moskovskaia oblast, Russia; <sup>2</sup>G.N. Gabrichevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212 Moscow, Russia

*The comparative tests of growth mediums for isolation and accumulation of diphtheria bacteria were implemented. The testing consisted of six series of growth medium "Corynebacaagar" produced by the state research center of applied microbiology and biotechnology and three series of blood tellurite agar. The concluding results of identification of biological indicators of all series of growth nutrient mediums are presented. The "Corynebacaagar" is recommended for application in health care practice for primary inoculation of pathological material during implementation of cultural analysis on diphtheria.*

**Key words:** growth medium; Corynebacteria; specific activity; inhibiting characteristics

**Citation:** *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2016; 61 (1): 59–64. (in Russ.)

**Введение.** Несмотря на очевидные успехи проводимой массовой иммунизации детского населения, дифтерия по-прежнему остается актуальной инфекцией как для детского, так и для взрослого населения. До настоящего времени сохраняются основные эпидемиологические особенности поддержания эпидемического процесса этой инфекции.

Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции имеет большое значение для установления диагноза, принятия решения о проведении специфической терапии, оценки и прогнозирования эпидемиологической ситуации. Бактериологический метод является основным. Он используется в диагностических, профилактических и эпидемиологических целях. Задача бактериологического исследования – выявление возбудителя дифтерии с помощью минимального количества диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа

в максимально сжатые сроки: не менее 3 сут – отрицательный ответ, 3–4 сут – выделение токсигенных коринебактерий дифтерии (возбудителя дифтерии), 4–5 сут – выделение нетоксигенных коринебактерий дифтерии или других представителей данного рода [1]. Применение питательных сред, обеспечивающих оптимальные условия для накопления и выделения дифтерийных бактерий при минимальном их содержании в анализе, является актуальной проблемой бактериологической диагностики дифтерии.

Для выделения коринебактерий из инфицированного материала в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» [2] в практике здравоохранения широко используются селективные дифференциально-диагностические кровяные теллуритовые среды лабораторного приготовления – кровяной теллуритовый агар (КТА), среда Клауберга II.

В качестве основы для этих сред используют сухой питательный агар, питательный агар на основе панкреатического гидролизата рыбной муки (ГРМ), АГВ, в которую *ex tempore* добавляют кровь либо любые гемолизированные кровяные добавки, глицериновую смесь, теллурит калия. Теллурит

Для корреспонденции: Шепелин Анатолий Прокопьевич, shepelin.rabota@rambler.ru

For correspondence: Shepelin A.P. rabota@rambler.ru

калия включен в питательные среды в качестве ингибитора сопутствующей микрофлоры, так как он в определенных концентрациях не препятствует росту подавляющего большинства штаммов коринебактерий дифтерии. *C. diphtheriae* формирует на средах, содержащих теллурит калия, колонии темно-серого или черного цвета, так как за счет продукции теллуритредуктазы происходит восстановление металлического теллура и его накопление в клетках бактерий [1].

Для выделения коринебактерий дифтерии выпускается коммерческая питательная среда Коринебакагар (КБА) производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, широко используемая в практике российских бактериологических лабораторий, в которую, согласно прописи по приговлению, не нужно добавлять кровь [2]. В качестве заменителя крови в данной среде содержится стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ), полученный путем ферментативного гидролиза суспензии черного альбумина с последующей сушкой методом распыления [3]. Введение в состав СРГМ позволило получить питательную среду, биологические свойства которой находятся на уровне КТА и среды Клауберга II. Выявляемость коринебактерий на КБА по сравнению с контрольными средами (среда Клауберга II) составляет 90,3% [4].

В КБА регламентируется отсутствие роста стафилококка и стрептококка из разведения  $10^{-4}$ . Отличием питательных сред лабораторного приготовления по МУК 4.2.3065–13 является наличие роста единичных колоний стафилококка в высеве из разведения  $10^{-7}$  (что довольно часто встречается на КТА). Такая среда может использоваться для посева, но в журнале контроля питательных сред отмечают снижение ингибирующих свойств питательной среды данной серии. В то же время повышение концентрации теллурита калия в питательной среде не допускается.

КБА выпускается в России более 20 лет, оформлен патент РФ на изобретение № 2041947 [5]. Объем производства питательной среды составляет 2 т в год (1 800 000 анализов).

С целью подготовки информационно-методического письма Роспотребнадзора «Организация исследований на дифтерию и коклюш» представляет интерес на базе Референс-центра по мониторингу за возбудителями дифтерии и коклюша ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора определить соответствие ростовых свойств питательной среды КБА требованиям МУК 4.2.3065–13 с использованием контрольных тест-штаммов возбудителя дифтерии.

Цель работы – межучрежденческие испытания питательной среды для выделения коринебактерий (КБА) производства ФБУН ГНЦ ПМБ по биологическим показателям на соответствие требованиям ТУ 9398-019-78095326-2006 и МУК 4.2.3065-13 для определения возможности использования среды в практике здравоохранения для первичного посева патологического материала при проведении культурального исследования на дифтерию.

**Материалы и методы.** В период с 25.05.14 по 28.05.15 на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского совместно с сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ проведены межучрежденческие испытания биологических свойств шести серий питательной среды КБА: с. 294 (изг. 02.2015 г., годен до 02.2018 г.); с. 295 (изг. 02.2015 г., годен до 02.2018 г.); с. 296 (изг. 02.2015 г., годен до 02.2018 г.); с. 297 (изг. 03.2015 г., годен до 03.2018 г.); с. 298 (изг. 03.2015 г., годен до 03.2018 г.); с. 299 (изг. 03.2015 г., годен до 03.2018 г.); а также трех серий КТА на основе ГРМ-агара: с. 387, с. 728 и с. 1033.

Для контроля питательной среды КБА использованы тест-штаммы микроорганизмов *C. diphtheriae gravis* 665, *C. diphtheriae mitis* 6765, *C. ulcerans* 675, *C. xerosis* 1911, *S. aureus* Wood-46, *S. pyogenes* Dick I из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», а также тест-штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* токсигенный № 665 из коллекции ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского и *S. aureus*

№ 25923 из коллекции ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России.

Определение биологических показателей проводили следующими методами:

- специфической активности (показатели чувствительности среды, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов питательной среды для выделения коринебактерий КБА) – культуральным методом по п. 4.9 ТУ 9398-019-78095326-2006 и п. 7 МУК 4.2.2316-08 [6];

- ингибирующих свойств питательной среды КБА – культуральным методом по п. 4.10 ТУ 9398-019-78095326-2006 и п. 7 МУК 4.2.2316-08 [6];

- оценку всхожести клеток *C. diphtheriae* – культуральным методом по п. 10.1 МУК 4.2.3065-13 [2];

- оценку времени формирования колоний *C. diphtheriae*, интенсивности их роста, размера и культурально-морфологических свойств – культуральным методом по п. 10.1 МУК 4.2.3065-13 [2];

- оценку ингибирующей активности в отношении сопутствующей микрофлоры (рост колоний *S. aureus*) – культуральным методом по п. 10.1 МУК 4.2.3065-13 [2].

#### Результаты и обсуждение

Этап 1: испытания питательной среды для выделения коринебактерий КБА на соответствие ТУ 9398-019-78095326-2006. Суточные культуры тест-штаммов *C. diphtheriae gravis* 665, *C. diphtheriae mitis* 6765, *C. ulcerans* 675, *C. xerosis* 1911, выращенные на сыровоточном агаре, а также *S. aureus* Wood-46, *S. pyogenes* Dick I смывали физиологическим раствором с поверхности питательной среды № 1 ГРМ и готовили бактериальные суспензии. Методика разведения штаммов по ТУ 9398-019-78095326-2006 предусматривает использование стандарта оптической мутности. Испытания КБА и КТА в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского проводились с использованием денситометра для определения концентрации клеток по Мак-Фарланду DEN-1 (BioSan Ltd). Разведение соответствовало значению 3,2.

На 3 чашки Петри с КБА засеивали по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма *C. diphtheriae gravis* 665, *C. diphtheriae mitis* 6765, *C. ulcerans* 675, *C. xerosis* 1911 из разведений  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ . Для контроля правильности приготовления суспензий и выполнения разведений проводили контрольный высев на питательные среды: сыровоточный агар (питательный агар с добавлением 20% сыровотки крови крупного рогатого скота) и КТА на основе серий ГРМ-агара. Первичный учет результатов производили через 24 ч инкубации посевов при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , окончательный – через 48 ч.

Из разведения  $10^{-4}$  по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма *S. aureus* Wood-46 и *S. pyogenes* Dick I высевали на 3 чашки Петри с КБА. Одновременно производили аналогичный высев на контрольную питательную среду № 1 ГРМ. Результаты оценивали визуально через 48 ч инкубации.

Через 20–24 ч инкубации при визуальном просмотре чашек (в том числе под микроскопом при увеличении в 25 раз) колонии штаммов коринебактерий выглядели следующим образом:

***C. diphtheriae gravis* 665** на КБА – темно-серые, круглые, уплощенные, со слегка неровными краями и несколько шероховатой поверхностью; диаметр большинства колоний 1,5 мм. На сыровоточном агаре – круглые, бесцветные, диаметром 1,2–1,5 мм. На КТА – темно-серые, шероховатые, плосковатые, с неровными краями, незначительной радиальной исчерченностью, диаметром 1,5 мм;

***C. diphtheriae mitis* 6765** на КБА – темно-серые, круглые, выпуклые, блестящие, с ровными краями, диаметр большинства колоний 1,6 мм. На сыровоточном агаре – круглые, бесцветные, гладкие колонии диаметром 1,8 мм. На КТА – серовато-черные гладкие колонии диаметром 1,6 мм;

***C. ulcerans* 675** на КБА – темно-серые, круглые, выпуклые, блестящие, с серебристым ободком по краю, диаметр большинства колоний 0,4 мм. На сыровоточном агаре – круглые, бесцветные колонии диаметром 0,2–0,4 мм. На КТА рост отсутствовал;

Таблица 1

**Биологические показатели (специфическая активность: показатели чувствительности среды, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов) питательной среды для выделения коринебактерий КБА**

Показатель; характеристика и нормы по ТУ 9398-019-78095326-2006	Серия 294	Серия 295	Серия 296	Серия 297	Серия 298	Серия 299	Контроль роста тест-штаммов на сывороточном агаре	Контроль роста тест-штаммов на КТА
<b>Специфическая активность</b>								
Через 20–24 ч инкубации при температуре (37±1)°С при визуальном просмотре чашек колонии указанных штаммов коринебактерий должны выглядеть следующим образом:								
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis</i> 665 – темно-серые, круглые, несколько уплощенные, диаметр большинства колоний не менее 0,6 мм	10 <sup>-7</sup> 1,0–1,5	18 1,0–1,5	16 1,0–1,5	20 1,0–1,5	20 1,0–1,5	20 1,0–1,5	14 1,2–1,5	20 1,5
	10 <sup>-6</sup> 1,0–1,5	63 1,0–1,5	55 1,0–1,5	66 1,0–1,5	73 1,0–1,5	56 1,0–1,5	67 1,0–1,5	46 1,2–1,5
<i>C. diphtheriae</i> <i>mitis</i> 6765 – темно-серые, круглые, выпуклые, блестящие, диаметр большинства колоний не менее 0,5 мм	10 <sup>-7</sup> 1,2–1,6	17 1,2–1,6	15 1,2–1,6	16 1,2–1,6	11 1,2–1,6	17 1,2–1,6	15 1,2–1,6	7 1,8
	10 <sup>-6</sup> 1,2–1,6	50 1,2–1,6	61 1,2–1,6	50 1,2–1,6	51 1,2–1,6	51 1,2–1,6	60 1,2–1,6	50 1,8
<i>C. ulcerans</i> 675 – диаметр большинства колоний не менее 0,2 мм	10 <sup>-7</sup> 0,2–0,4	14 0,2–0,4	7 0,2–0,4	10 0,2–0,4	10 0,2–0,4	13 0,2–0,4	9 0,2–0,4	5 0,2–0,4
	10 <sup>-6</sup> 0,2–0,4	20 0,2–0,4	12 0,2–0,4	13 0,2–0,4	14 0,2–0,4	22 0,2–0,4	17 0,2–0,4	13 0,2–0,4
<i>C. xerosis</i> 1911 – темно-серые, круглые, выпуклые, блестящие, диаметр большинства колоний не менее 0,5 мм	10 <sup>-7</sup> 1,0	10 1,0	13 1,0	13 1,0	8 1,0	5 1,0	8 1,0	6 1,2
	10 <sup>-6</sup> 1,0	51 1,0	48 1,0	53 1,0	57 1,0	46 1,0	47 1,0	52 1,2
<b>Специфическая активность</b>								
Через 44–48 ч инкубации при температуре (37±1)°С при визуальном просмотре чашек колонии коринебактерий должны выглядеть следующим образом:								
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis</i> 665 – темно-серые, шероховатые, со складчатой поверхностью, неровными (изрезанными) краями (тип "маргаритки"), диаметром 2,0–3,5 мм (рис. 1)	10 <sup>-7</sup> 3,5	21 3,5	19 3,5	19 3,5	24 3,5	25 3,5	20 3,5	14 4,0
	10 <sup>-6</sup> 3,5	65 3,5	65 3,5	72 3,5	79 3,5	66 3,5	75 3,5	48 3,5
<i>C. diphtheriae</i> <i>mitis</i> 6765 – темно-серые, круглые, гладкие, блестящие, с ровными краями, диаметром 1,5–3,0 мм (рис. 2)	10 <sup>-7</sup> 3,0	19 3,0	17 3,0	21 3,0	19 3,0	23 3,0	23 3,0	8 4,0
	10 <sup>-6</sup> 3,0	51 3,0	61 3,0	50 3,0	54 3,0	55 3,0	61 3,0	50 4,0
<i>C. ulcerans</i> 675 – серовато-черные, круглые, выпуклые, блестящие, диаметром 0,5–1,5 мм (рис. 3)	10 <sup>-7</sup> 0,5–1,5	14 0,5–1,5	7 0,5–1,5	10 0,5–1,5	10 0,5–1,5	16 0,5–1,5	13 0,5–1,5	6 2,5
	10 <sup>-6</sup> 0,5–1,5	24 0,5–1,5	14 0,5–1,5	17 0,5–1,5	16 0,5–1,5	24 0,5–1,5	18 0,5–1,5	13 1,5
<i>C. xerosis</i> 1911 – серовато-черные, круглые, выпуклые, блестящие, диаметром 1,2–2,0 мм (рис. 4)	10 <sup>-7</sup> 1,2–2,0	10 1,2–2,0	13 1,2–2,0	13 1,2–2,0	7 1,2–2,0	5 1,2–2,0	7 1,2–2,0	6 2,5–2,8
	10 <sup>-6</sup> 1,2–2,0	54 1,2–2,0	48 1,2–2,0	61 1,2–2,0	58 1,2–2,0	46 1,2–2,0	47 1,2–2,0	52 2,5–2,8

Примечание. В числителе – количество колоний (среднее значение); в знаменателе – диаметр (мм). \* – Данные отсутствуют.

*C. xerosis* 1911 на КБА – темно-серые, круглые, выпуклые, блестящие, гладкие, с ровными краями, диаметр большинства колоний 1,0 мм. На сывороточном агаре – круглые бесцветные гладкие колонии диаметром 1,2 мм. На КТА – сероватые гладкие колонии диаметром 1,2 мм.

Через 44–48 ч инкубации при визуальном просмотре чашек колонии коринебактерий выглядели следующим образом:

*C. diphtheriae* *gravis* 665 на КБА – темно-серые, шероховатые, со складчатой поверхностью и неровными (изрезан-





Рис. 1. Рост тест-штамма *C. diphtheriae gravis* 665 на КБА через 48 ч инкубации (разведение  $10^{-6}$ ).

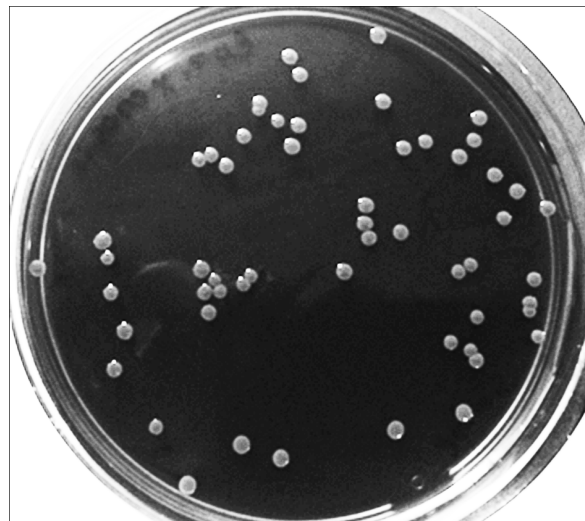


Рис. 3. Рост тест-штамма *C. ulcerans* 675 на КБА через 48 ч инкубации (разведение  $10^{-6}$ ).

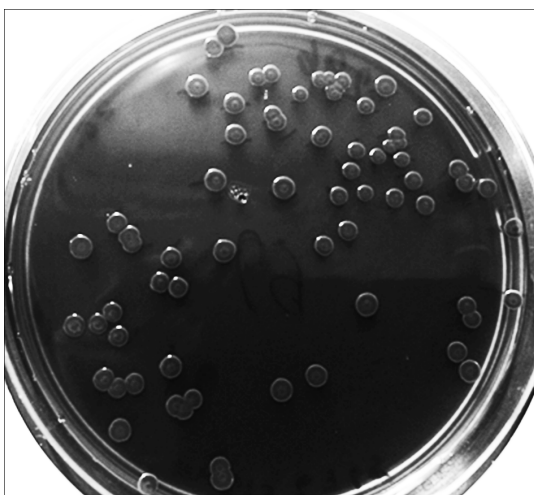


Рис. 2. Рост тест-штамма *C. diphtheriae mitis* 6765 на КБА через 48 ч инкубации (разведение  $10^{-6}$ ).

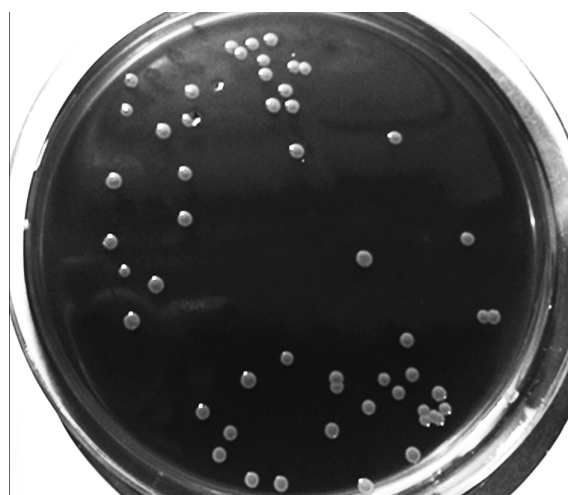


Рис. 4. Рост тест-штамма *C. xerosis* 1911 на КБА через 48 ч инкубации (разведение  $10^{-6}$ ).

ными) краями (тип «маргаритки»), диаметром 3,5 мм. На сыровоточном агаре – круглые, бесцветные, с неярко выраженным центром и неровными краями, диаметром 4,0 мм. На КТА – черные слегка уплощенные колонии с незначительной радиальной исчерченностью и неровными краями, диаметром 2,5–3,5 мм;

*C. diphtheriae mitis* 6765 на КБА – темно-серые, круглые, гладкие, блестящие, с ровными краями, диаметром 3,0 мм.

На сыровоточном агаре – круглые, гладкие, слегка выпуклые бесцветные колонии диаметром 4,0 мм. На КТА – черные блестящие колонии диаметром 2,5–2,8 мм;

*C. ulcerans* 675 на КБА – серовато-черные, круглые, выпуклые, блестящие колонии диаметром 0,5–1,5 мм. На сыровоточном агаре – круглые, блестящие, бесцветные, гладкие колонии диаметром 2,5 мм. На КТА рост отсутствовал;

*C. xerosis* 1911 на КБА – серовато-черные, круглые, вы-

Таблица 2

**Ингибирующие свойства питательной среды для выделения коринебактерий КБА**

Показатель; характеристика и нормы по ТУ 9398-019-78095326-2006	Серия 294	Серия 295	Серия 296	Серия 297	Серия 298	Серия 299	Контроль роста на питательной среде № 1 ГРМ
	разведение, количество колоний, морфология, диаметр						
Ингибирующие свойства среды. Питательная среда должна полностью подавлять рост тест-штаммов <i>S. aureus</i> Wood-46 и <i>S. pyogenes</i> Dick I на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси через 46–48 ч инкубации при температуре (37±1)°C							
<i>Staphylococcus aureus</i> Wood-46	$10^{-4}$	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Сплошной рост
<i>Streptococcus pyogenes</i> Dick I	$10^{-4}$	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Сплошной рост

Таблица 3

## Биологические показатели питательной среды для выделения коринебактерий (КБА)

Показатель	Количество колоний (среднее значение), диаметр													
	Серия 297		Серия 296		Серия 299		Серия 298		Серия 295		Серия 294			
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>		
Оценка всхожести клеток, времени формирования колоний <i>C. diphtheriae</i> биовара <i>gravis</i> токсигенный № 665 интенсивности их роста, размера и культурально-морфологических свойств:	через 20–24 ч	215	55	332	73	196	59	295	77	253	56	273	61	
		2 мм	2 мм	2,4 мм	1,9 мм	2,5 мм	2,25 мм	2,25 мм	2,15 мм	1,9 мм	2,25 мм	2,15 мм	2,1 мм	
	через 48 ч	225	57	301	74	197	58	299	78	260	56	283	62	
		4,5 мм	4,5 мм	5,25 мм	5,5 мм	4,0 мм	5,0 мм	4,0 мм	5,25 мм	4,0 мм	5,5 мм	4,25 мм	5,25 мм	
	Оценка ингибирующей активности в отношении сопутствующей микрофлоры <i>S. aureus</i> № 25923:	через 20–24 ч	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
		через 48 ч	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет

пуклые, блестящие, диаметром 1,2–2,0 мм. На сыровороточном агаре – круглые, блестящие, бесцветные выпуклые колонии диаметром 2,5–2,8 мм. На КТА – серовато-черные блестящие выпуклые колонии диаметром 2,2 мм.

При оценке ингибирующей активности всех серий питательной среды КБА отмечено отсутствие роста *S. aureus* Wood-46 и *S. pyogenes* Dick I на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10<sup>-4</sup> в течение 48 ч при температуре (37±1)°С. На контрольной питательной среде № 1 ГРМ наблюдался сплошной рост вышеуказанных культур.

Биологические свойства шести серий испытуемых образцов питательной среды на соответствие требованиям ТУ 9398-019-78095326-2006 представлены в табл. 1 и 2.

Таким образом, питательная среда для выделения коринебактерий (КБА) по биологическим показателям:

– соответствует требованиям ТУ 9398-019-78095326-2006.

– не уступает КТА на основе ГРМ-агара.

Этап 2. Испытания питательной среды для выделения коринебактерий (КБА) на соответствие МУК 4.2.3065-13

Суточные культуры *C. diphtheriae* биовара *gravis* токсигенный № 665 и *S. aureus* № 25923, выращенные на сыровороточном агаре, смывали физиологическим раствором и готовили бактериальные суспензии. Контроль оптической плотности осуществляли с помощью денситометра для определения концентрации клеток по Мак-Фарланду DEN-1 (Bio-San Ltd.) со значением 3,2. Из исходных взвесей готовили

Таблица 4

## Биологические показатели питательной среды для выделения коринебактерий (ГРМ-агар с 10% крови крупного рогатого скота и 2% теллурита калия)

Показатель	Количество колоний (среднее значение), диаметр						
	серия 387		серия 728		серия 1033		
	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
Оценка всхожести клеток, времени формирования колоний <i>C. diphtheriae</i> биовара <i>gravis</i> токсигенный № 665 интенсивности их роста, размера и культурально-морфологических свойств:	через 20–24 ч	209	87	311	77	353	77
		1,82 мм	2,00 мм	1,6 мм	1,5 мм	1,75 мм	1,65 мм
	через 48 ч (рис. 5)	209	89	329	74	363	77
		3,5 мм	3,75 мм	2,65 мм	2,5 мм	2,75 мм	2,6 мм
Оценка ингибирующей активности в отношении сопутствующей микрофлоры <i>S. aureus</i> № 25923:	через 20–24 ч	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
	через 48 ч	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет

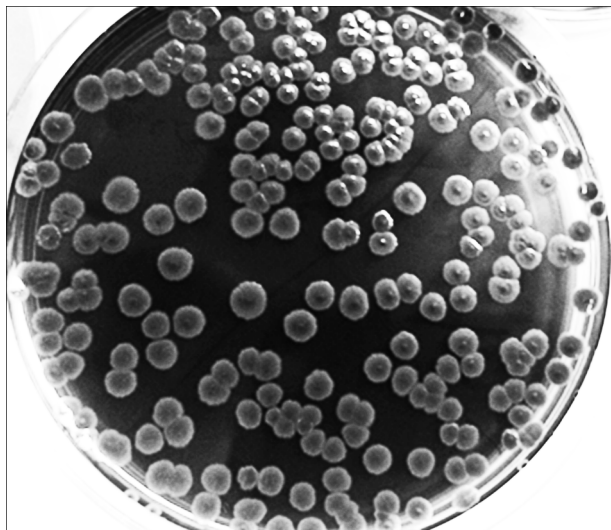


Рис. 5. Рост тест-штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* токсигенный № 665 на КБА через 48 ч инкубации (разведение  $10^{-6}$ ).

последовательные разведения в физиологическом растворе согласно п. 10.1 МУК 4.2.3065-13. Из двух последних разведений *C. diphtheriae* биовара *gravis* токсигенный № 665 и *S. aureus* № 25923 (6-е и 7-е разведения) по 0,1 мл культуры вносили на две чашки с испытуемой средой и досуха втирали стеклянным шпателем. В качестве контрольной питательной среды использовали ГРМ-агар (серии 297–294) с добавлением 10% крови крупного рогатого скота (НПО «Лейтран») и 2% теллурита калия. Для каждой серии испытуемой питательной среды – КБА и КТА на основе ГРМ-агара – делали три линейки последовательных разведений с последующим расчетом среднего значения.

При оценке всхожести клеток, времени формирования колоний *C. diphtheriae* биовара *gravis* токсигенный № 665, интенсивности роста, размера и культурально-морфологических свойств через 20–24 ч отмечено, что колонии этого штамма на всех шести сериях КБА имели одинаковую морфологию: серые с темно-серым центром, шероховатые, полублестящие, несколько уплощенные, с неровным краем, с незначительной радиальной исчерченностью, диаметром 1,9–2,4 мм, с намеком на приподнятость в центре, крошащиеся. На КТА – темно-серые, цвета асфальта, шероховатые, плосковатые, с неровным краем, незначительной радиальной исчерченностью, диаметром 1,6–2,0 мм, приподнятые в центре, крошащиеся.

Через 48 ч инкубации морфология *C. diphtheriae* биовара *gravis* токсигенный № 665 также не отличалась: на КБА колонии тест-штамма темно-серые, шероховатые, с неровным краем, радиальная исчерченность, «маргаритка», диаметром 4,0–5,5 мм, крошатся. На КТА – темно-серые, цвет асфальта, шероховатые, «маргаритка», с неровным краем, приподнятые (можно сказать, более выпуклые по сравнению с КБА), диаметром 2,5–3,7 мм, радиальная исчерченность, приподнятость в центре, крошатся.

Оценка ингибирующей активности в отношении сопутствующей микрофлоры показала отсутствие роста *S. aureus* № 25923 через 24–48 ч инкубации как на КБА, так и на всех сериях питательной среды ГРМ-агара с добавлением 10% крови крупного рогатого скота и 2% теллурита калия.

На протяжении всего эксперимента наблюдалась однородность культурально-морфологических признаков *C. diphtheriae* в сравнении с контрольными средами, что подтверждает росто-вую ценность испытуемых питательных сред (табл. 3, 4).

**Заключение.** По результатам совместных межучрежденческих испытаний можно сделать следующие выводы:

1) питательная среда КБА обладает гарантированной стабильностью при выделении токсигенных *C. diphtheriae*, а также нетоксигенных коринебактерий и других представителей этого рода при минимальном их содержании в анализе. Все шесть серий КБА обеспечивают визуальное обнаружение роста культур *Corynebacterium* в виде соответствующих колоний на поверхности питательной среды;

2) данная среда обеспечивает предварительную внутривидовую дифференциацию по морфологии выросших колоний;

3) на КБА подавляется рост стафилококков и стрептококков;

4) КБА выгодно отличается простотой приготовления в лабораторных условиях, исключая необходимость внесения *ex tempore* кровяных добавок;

5) процент выявляемости возбудителей дифтерии на КБА более 90%;

6) по биологическим показателям питательная среда КБА соответствует требованиям ТУ 9398-019-78095326-2006 и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Сравнительные испытания питательных сред для выделения и накопления дифтерийных бактерий показали высокое качество КБА. Использование данной питательной среды промышленного производства является важным условием успешной и своевременной диагностики дифтерии в практике здравоохранения.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Гасретова Т.Д., Дятлов И.А., Лабушкина А.В., Миронов А.Ю. и др. *Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты*. М.: Практическая медицина; 2014.
- Методические указания МУК 4.2.3065-13. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2013.
- Шепелин А.П. Отечественная питательная среда – Коринебакагар для выделения возбудителя дифтерии. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2012; 4: 108–10.
- Шепелин А.П. *Разработка технологии производства панкреатического гидролизата рыбной муки и конструирование на его основе бактериологических питательных сред*: Дисс. ... докт. биол. наук. М.; 2012.
- Шепелин А.П., Татаринцева Н.А., Бизяева Г.В., Артюхин В.И. Питательная среда для выделения дифтерийного микроба. Патент РФ № 2041947; 1995.
- Методические указания МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.

Поступила 23.09.15

#### REFERENCES

- Kharseeva G.G., Alutina E.L., Gasretova T.D., Dyatlov I.A., Labushkina A.V., Mironov A.Yu. et al. *Diphtheria: Microbiological and Immunological Aspects*. [Difteriya: mikrobiologicheskie i immunologicheskie aspekty]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2014. (in Russian)
- Methodical instructions MUK 4.2.3065-13. Laboratory diagnosis of diphtheria infection. Moscow: Federal center of hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor; 2013. (in Russian)
- Shepelin A.P. National nutrient medium – Corynebacterial to highlight the causative agent of diphtheria. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorov'e"*. 2012; 4: 108–10. (in Russian)
- Shepelin A.P. *Development of Technology for Production of Pancreatic Hydrolysate of Fish Meal and Designing on the Basis of Bacteriological Culture Media*: Diss. Moscow; 2012. (in Russian)
- Shepelin A.P., Tatarintseva N.A., Bizyaeva G.V., Artyukhin V.I. Nutrient Medium for Isolation of Diphtheria Microbe. Patent RF № 2041947; 1995. (in Russian)
- Methodical instructions MUK 4.2.2316-08. Control methods of bacteriological culture media. Moscow: Federal center of hygiene and epidemiology of Rospotrebnadzor; 2008. (in Russian)

Received 23.09.15