

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Борисова О.Ю.¹, Чагина И.А.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Полосенко О.В.², Храмов М.В.², Требунских И.П.³, Сидорова Н.А.³, Алексеева И.Н.⁴, Миронов А.Ю.^{1,5}

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СРЕДЫ ПИЗУ В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДИФТЕРИИ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

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

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Московская область, п. Оболенск, Россия;

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Роспотребнадзора, 129626, г. Москва, Россия;

⁴КГБУЗ «Краевая клиническая психиатрическая больница имени профессора И.Ю. Галанта» Минздрава Хабаровского края, 680015, Хабаровск, Россия;

⁵Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Россия

Цель. Для разработки адаптированного к современным условиям алгоритма лабораторной диагностики дифтерийной инфекции и подготовки нового нормативного документа проведены исследования по постановке пробы Пизу с 9 токсигенными штаммами *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*.

Материал и методы. Постановку пробы Пизу осуществляли с колониями, выращенными на кровяной теллуритовой среде (КТА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и Коринебакагара (КБА) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Использована среда Пизу согласно МУ 4.2.3065-13 на основе АГВ среды (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск) с добавлением 10 мл сыворотки крупного рогатого скота (НПО «Лейтран», Москва), среда Пизу (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск), среда Пизу (НПО «Питательные среды», Микроген), среда Пизу «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород). Всего проведено 648 постановок.

Результаты. При постановке пробы на всех четырёх видах коммерческих сред Пизу с 0,5-3 колониями *C. diphtheriae*, выросшими в течение 24 часов на КТА и КБА, положительный результат отсутствовал, при постановке с 4-7 колониями отмечен не стабильный результат, с 8 колониями - стабильный положительный результат. Положительный результат пробы на лабораторно-приготовленной среде Пизу отмечен с 0,5 колониями. При постановке пробы Пизу с колониями, выросшими на 10% сывороточном агаре, стабильный положительный результат отмечен с 0,5 колоний.

Заключение. Для повышения диагностической эффективности выявления возбудителя дифтерии в адаптированном алгоритме лабораторной диагностики (МУК 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции») постановка пробы Пизу для оценки цистиназной активности проводится с бактериальной культурой, выросшей на 10% сывороточном агаре.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; бактериологическая диагностика; проба Пизу; дифтерийная инфекция; колонии.

Для цитирования: Борисова О.Ю., Чагина И.А., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Полосенко О.В., Храмов М.В., Требунских И.П., Сидорова Н.А., Алексеева И.Н., Миронов А.Ю. Особенности применения среды Пизу в бактериологической диагностике дифтерии в современных условиях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 68(10): 620-626.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-620-626>.

Для корреспонденции: Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского; e-mail: olgaborisova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 05.09.2023

Принята к печати 09.09.2023

Опубликовано 00.10.2023

Borisova O. Yu.¹, Chagina I. A.¹, Gadua N. T.¹, Pimenova A. S.¹, Polosenko O. V.², Khramov M. V.², Trebunsky I. P.³, Sidorova N. A.³, Alekseeva I. N.⁴, Mironov A. Yu.^{1,5}

PECULIARITIES OF APPLICATION OF PISA MEDIUM IN BACTERIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF DIPHTHERIA IN MODERN CONDITIONS

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

²FBIS «State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology» Rosпотребнадзор, 142279, Moscow Region, Obolensk, Russia;

³FBUZ «Center for Hygiene and Epidemiology in Moscow» Rosпотребнадзор, 129626, Moscow, Russia;

⁴Regional State Budgetary Health Institution «Regional Clinical Psychiatric Hospital» of the Ministry of Health of the Khabarovsk Territory, 680015, Khabarovsk, Russia;

⁵Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia.

Aim. In order to develop an algorithm adapted to the current conditions for laboratory diagnostics of diphtheria infection and to prepare a new regulatory document, we conducted experiments on Pizu medium with 9 toxigenic strains of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*.

Material and methods. The Pizu test was set with colonies grown on Tellurite agar based on GRM-agar (FBIS SRC AMB, Obolensk) and *Corynebacterium* (CBA) (FBIS SRC AMB, Obolensk). The study used Pizu medium according to MU 4.2.3065-13 based on AGV medium (FBIS SRC AMB, Obolensk) with the addition of 10 ml bovine serum (Leitran, Moscow), Pizu medium (FBIS SRC AMB, Obolensk), Pizu medium (Microgene), Pizu medium «DS-DIF-KORINE» (Diagnostics, N. Novgorod). A total of 648 productions were carried out.

Results. It was shown that when testing all four types of commercial of Pizu medium with 0.5-3 colonies of *C. diphtheriae*, which grew within 24 hours on Tellurite agar and CBA, there was no positive result, when testing with 4-7 colonies - non stable result and with 8 colonies there was a stable positive result. While the positive result of the test on the laboratory-prepared medium of Pizu was noted with 0.5 colonies. When testing Pizu medium with colonies grown on 10% serum agar, a stable positive result was observed with colony 0.5.

Conclusion. For increase the diagnostic efficiency of detecting the *C. diphtheriae* in an adapted algorithm for laboratory diagnosis (4.2.3852-23 «Laboratory diagnosis of diphtheria infection») the Pizu test for assessing cystinase activity is performed with a bacteriological culture that grew by 10% serum agar.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; bacteriological diagnostics; Pizu test; diphtheria infection; colonies.

For citation: Borisova O. Yu., Chagina I. A., Gadua N. T., Pimenova A. S., Polosenko O. V., Khramov M. V., Trebunsky I. P., Sidorova N. A., Alekseeva I. N., Mironov A. Yu. Peculiarities of application of Pizu medium in bacteriological diagnostics of diphtheria in modern conditions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (10): 620-626. (in Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-620-626>.

For correspondence: Borisova Olga Yurievna, Dr. Sci. Med., Professor, Head of laboratory for the diagnosis of diphtheria and pertussis infections G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: olgborisova@mail.ru

Information about authors:

Borisova O. Yu.,	https://orcid.org/0000-0001-6316-5046 ;
Chagina I.A.,	https://orcid.org/0000-0003-2867-9548 ;
Gadua N. T.,	https://orcid.org/0000-0001-6247-6176 ;
Pimenova A. S.,	https://orcid.org/0000-0002-6914-3531 ;
Polosenko O.V.,	http://orcid.org/0000-0001-5961-9041 ;
Khramov M.V.,	https://orcid.org/0000-0002-4553-3826
Trebunsky I.P.	https://orcid.org/0009-0005-5581-6191 ;
Sidorova N.A.,	https://orcid.org/0009-0000-9868-7805 ;
Alekseeva I.N.,	https://orcid.org/0009-0003-8409-9529 ;
Mironov A. Yu.,	https://orcid.org/0000-0002-8544-5230 .

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

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

Received 05.09.2023

Accepted 09.09.2023

Published 00.10.2023

Введение. Цистиназа является индуцибельным экзoферментом, вырабатываемым при наличии субстрата, то есть цистина или цистеина в составе белковых комплексов. При росте *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans* благодаря ферменту цистиназе расщепляют цистин. Образующийся при этом сероводород вступает в реакцию с имеющимся в среде уксуснокислым свинцом, в результате чего последний переходит в сернистый свинец - соединение тёмно-коричневого цвета. При посеве уколом в столбик питательной среды *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* образуют интенсивное потемнение по ходу укола и вокруг него, и характерное «облачко» тёмно-коричневого цвета на расстоянии 1 см от поверхности [1]. Такая способность *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* легла в основу разработок дифференциально-диагностических питательных сред, позволяющих выявлять эти микроорганизмы. В 1940-х годах в России разработана пропись лабораторного приготовления питатель-

ной среды Пизу, позволяющей выявлять возбудителя дифтерии по образованию этого характерного коричнево-чёрного «облачка» вокруг роста культуры [5]. За рубежом предложена цистин-теллуриновая питательная среда Tinsdale's с многочисленными последующими модификациями [2, 11, 14], которая использовалась для выявления возбудителя дифтерии. Авторы отмечали трудности в приготовлении питательной среды Tinsdale's, необходимость практического опыта в приготовлении и коротком сроке хранения, что ограничивало её использование в качестве питательной среды первичного посева, предложено применение этой питательной среды для оценки цистиназной активности возбудителя [2, 3, 12]. С 1990-х годов питательная среда Tinsdale's используется для выявления цистиназной активности с чистой культурой возбудителя [2, 3, 12, 15].

Цель - проследить в историческом аспекте использование питательной среды Пизу и определить её при-

менение в адаптированном алгоритме лабораторной диагностики дифтерии в России на современном этапе.

Материал и методы. В исследовании использованы контрольные токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, *C. ulcerans* № 675 (из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»), токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* №№ 1-18, 30-15, токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis* №№ 89-18, 57-18, 55-18, токсигенные штаммы *C. ulcerans* №№ 258-03, 85-18 (из рабочей коллекции лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора). Культивирование штаммов проводилось согласно МУ 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Исследуемый материал засеивали на кровяную теллуритовую среду (КТА) на основе 2% агара (ГРМ-агар, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (НПО «Лейтран», Москва) и теллуриката калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и Коринебакагар (КБА) согласно инструкции производителя (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Культуры термостатировали в течение 24-48 часов при температуре 37 °С. В работе использована среда Пизу, приготовленная в лабораторных условиях согласно МУ 4.2.3065-13 на основе АГВ среды (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением сыворотки крупного рогатого скота (НПО «Лейтран», Москва), коммерческая среда Пизу (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), коммерческая среда Пизу (НПО «Питательные среды», Микроген), среда Пизу из коммерческого набора реагентов «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород).

Результаты. С целью разработки адаптированного к современным условиям алгоритма лабораторной диагностики дифтерийной инфекции и подготовки нового нормативного документа проведена постановка пробы Пизу с токсигенными штаммами *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* при использовании коммерческих питательных сред Пизу и питательной среды Пизу лабораторного приготовления.

Изучено разное количество колоний токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*. Постановку пробы Пизу осуществляли с 0,5-1-2-3-4-5-6-7-8 колониями токсигенных штаммов, выращенных на двух видах питательных сред первичного посева - КТА и КБА. Культуру засеивали уколом в столбик агара. В исследование включены колонии коринебактерий, выросшие на чашках Петри первичного посева в течение 24 и 48 часов и на 10% сывороточном агаре в течение 24 часов. Используются четыре вида питательной среды Пизу: 1) питательная среда Пизу, приготовленная в лабораторных условиях согласно МУ 4.2.3065-13 на основе питательной среды АГВ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 мл сыворотки крупного рогатого скота (НПО «Лейтран», Москва); 2) коммерческая питательная среда Пизу (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск); 3) коммерческая питательная среда Пизу (НПО «Питательные среды», Микроген); 4) питательная среда Пизу из коммерче-

ского набора реагентов «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород). Каждая проба (количество колоний) на каждом виде среды Пизу (три коммерческие питательные среды) с двух видов питательных сред первичного посева (КТА/КБА) тестировалась в трёх повторах. Всего проведено 648 постановок. Исследования проведены в четырёх государственных учреждениях: ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Роспотребнадзора; ГБУЗ «Краевая клиническая психиатрическая больница» Министерства здравоохранения Хабаровского края, в каждом учреждении разными специалистами. Положительным результатом считалось образование интенсивного потемнения по ходу укола и вокруг него в виде характерного «облачка» тёмно-коричневого цвета. Учёт результатов производился следующим образом: положительным результатом считали характерное образование «облачка», отрицательным - отсутствие «облачка» во всех повторах. Результаты исследований представлены в табл.

Исследования показали, что при постановке пробы на всех четырёх видах коммерческих сред Пизу с 0,5-1-2-3 колониями *C. diphtheriae*, выросшими в течение 24 часов на КТА и КБА, положительный результат отсутствовал. При постановке пробы Пизу с 4-7 колониями *C. diphtheriae* зарегистрирован не стабильный результат - положительный результат с колоний, выросших на КТА, зарегистрирован в 4,2±2,3%, 13,8±4,06%, 22,2±4,89%, 23,6±5,0% случаев соответственно; положительный результат с колоний, выросших на КБА, зарегистрирован в 4,2±2,3%, 11,1±3,7%, 19,44±4,6%, 21,75±4,7% случаях соответственно. Только с 8 колониями *C. diphtheriae* отмечен стабильный положительный результат (см. таблицу, рис. 1, А).

При постановке пробы Пизу с 0,5-1-2 колониями *C. ulcerans* положительный результат отсутствовал. При постановке пробы с 3-5 колониями отмечен не стабильный результат - положительный результат с колоний, выросших на КТА, зарегистрирован в 6,94±2,99%, 16,6±4,38%, 22,22±4,89% случаев соответственно; положительный результат с колоний, выросших на КБА, зарегистрирован в 6,94±2,99%, 18,05±4,53%, 25±5,0% случаях соответственно. Стабильный положительный результат отмечен при постановке пробы с 6-8 колониями *C. ulcerans* (см. таблицу, рис. 1Б).

Аналогичный результат получен с колониями *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*, выросшими в течение 48 часов на КТА и КБА, за исключением того, что положительный результат в пробе Пизу зарегистрирован с 7-8 колониями *C. diphtheriae* (см. таблицу).

Положительный результат пробы на лабораторно-приготовленной среде Пизу отмечен с 0,5 колониями *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*, выросшими на КТА и КБА в течение 24 и 48 часов (рис. 2, А, Б).

Постановка пробы Пизу с использованием металлической бактериологической петли даёт более чёткие

Эффективность получения положительного результата при постановке пробы на трёх коммерческих питательных средах Пизу и лабораторно-приготовленной питательной среде Пизу (на основе АГВ среды) с колониями *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*, выросшими на КТА и КБА в течение 24 и 48 часов

Количество колоний, выросших на КТА/КБА	Коммерческие среды Пизу				Лабораторно-приготовленная среда Пизу (на основе АГВ среды)			
	<i>C. diphtheriae</i>		<i>C. ulcerans</i>		<i>C. diphtheriae</i>		<i>C. ulcerans</i>	
	24 ч на КТА/КБА (%±m)	48 ч КТА/КБА (%±m)	24 ч КТА/КБА (%±m)	48 ч КТА/КБА (%±m)	24 ч КТА/КБА (%±m)	48 ч КТА/КБА (%±m)	24 ч КТА/КБА (%±m)	48 ч КТА/КБА (%±m)
0,5	- / -	- / -	- / -	- / -	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
1	- / -	- / -	- / -	- / -	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
2	- / -	- / -	- / -	- / -	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
3	- / -	- / -	6,94±2,99 / 6,94±2,99	8,33±3,25 / 8,33±3,25	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
4	4,2±2,3/4, 2±2,3	5,55±2,69 / 6,94±2,99	16,66±4,38 / 18,05±4,53	23,61±5,0 / 33,33±5,55	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
5	13,8±4,06 / 11,11±3,7	26,38±5,19 / 33,33±5,55	22,22±4,89 / 25±5,0	37,5±5,7 / 31,0±5,83	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
6	22,2±4,89 / 19,44±4,6	36,11±5,66 / 34,72±5,6	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
7	23,6±5,0 / 21,75±4,7	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100
8	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100	100 / 100

Примечание. Прочерк - отрицательный результат.

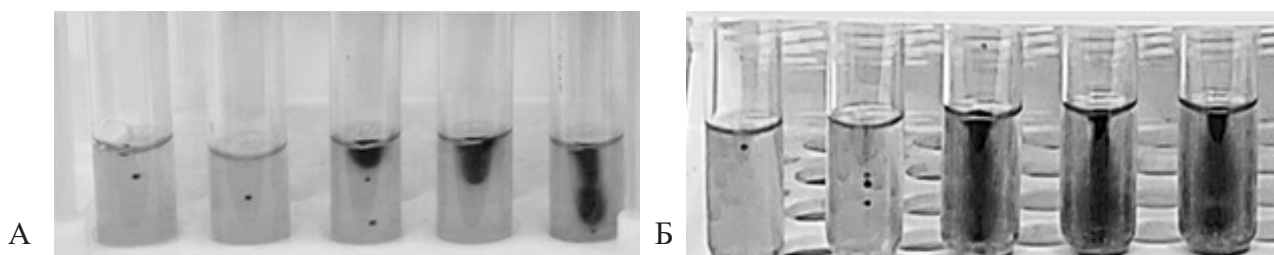


Рис. 1. Постановка пробы Пизу (коммерческая среда) со штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 через 24 часа (1-2-3-4-5 колоний) (А), со штаммом *C. ulcerans* через 24 часа (1-2-3-4-5 колоний)

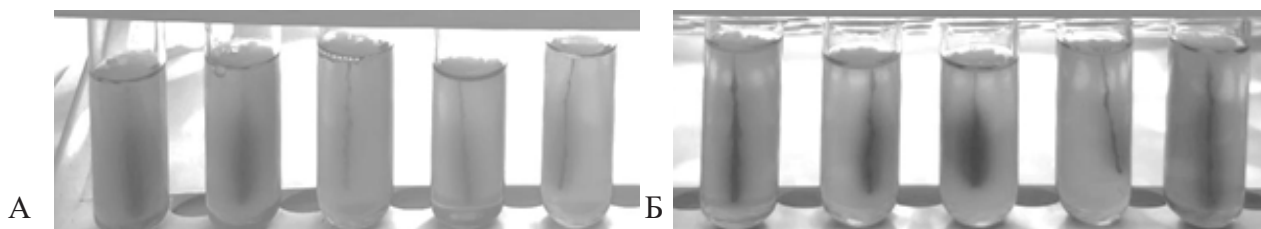


Рис. 2. Постановка пробы Пизу (на основе АГВ среды с 10 мл сыворотки крупного рогатого скота) со штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (0,5-1-2-3-4 колоний).

Постановка с колониями *C. diphtheriae*, выросшими в течение 24 ч (А) и 48 ч (Б) на КТА

положительные результаты, чем при использовании для постановки пластиковых одноразовых петлей на 1 мкл.

При постановке пробы на всех трёх видах коммерческих питательных сред Пизу с колониями *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*, выросшими в течение 24 ч на 10% сывороточном агаре, стабильный положительный результат получен с 0,5 колоний (см. таблицу, рис. 3). Для получения стабильного положительного результата в пробе Пизу при минимальном

количестве бактериальной культуры *C. diphtheriae* (0,5 колонии), выросшей на теллуритовых средах, где теллурит калия является ингибитором посторонней микрофлоры, необходимо добавление сыворотки крупного рогатого скота.

Прослежен временной интервал, в течение которого появляется положительный результат при постановке пробы Пизу на коммерческих питательных средах с колониями *C. diphtheriae*, выросшими в течение

24 часов на 10% сывороточном агаре. Формирование характерного «облачка» у *C. diphtheriae* начинается через 4-5 часов с момента постановки пробы (рис. 4).

То есть при постановке пробы Пизу с культурой, выросшей на сывороточном агаре, учёт результата можно производить уже в течение рабочего дня.

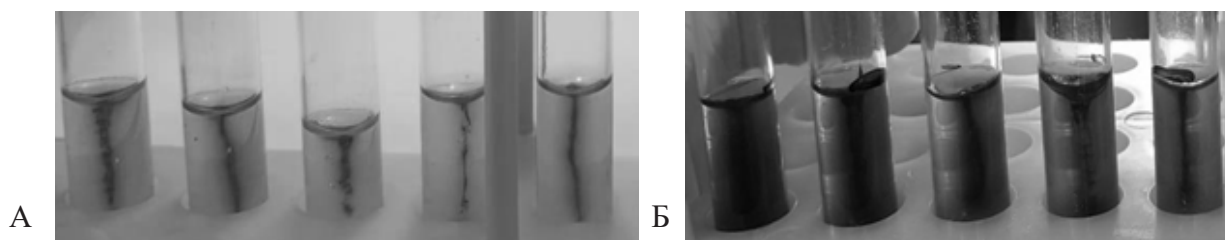


Рис. 3. Постановка пробы Пизу (коммерческая среда) со штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (0,5-1-2-3-4 колоний) с 10% сывороточного агара.

А - учёт результата через 8 часов, Б — через 24 часа

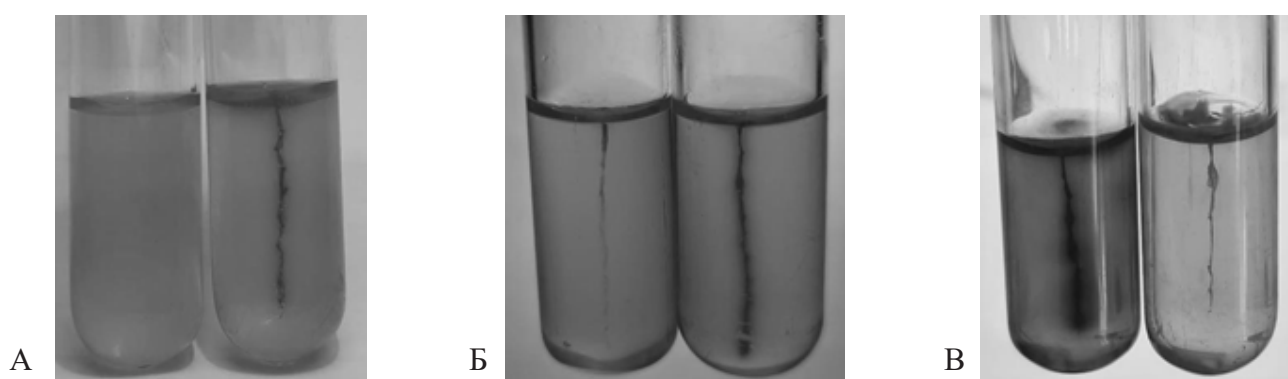


Рис. 4. Появление положительного результата пробы Пизу (коммерческая питательная среда) со штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, выросшим в течение 24 ч на 10% сывороточном агаре (пример).

А - через 5 ч, Б - через 6 ч, В - через 24 часа.

После постановки пробы на токсигенность (основного теста для выявления возбудителя дифтерии) с 0,5 колоний *C. diphtheriae*, выросших на теллуритовых питательных средах первичного посева, не прожигая петли биоматериала достаточно для отсева на 10% сывороточный агар, с которого через 18-24 часа можно ставить пробу Пизу для выявления цистинозной активности.

Интересным фактом является то, что некоторые представители семейства *Enterobacteriaceae* способны вызывать изменение окраски питательной среды Пизу в коричнево-чёрный цвет. При проведении исследований на дифтерию и изучения микрофлоры ротоглотки оказалось, что *Morganella morganii*, вызывающая инфекции полости рта, даёт положительный тест на цистиназу в виде диффузного изменения окраски питательной среды в чёрно-коричневый цвет. Штаммы *Proteus mirabilis* образуют сероводород на питательной среде Пизу с почернением по ходу укола. Данный факт следует учитывать при интерпретации результатов постановки пробы Пизу.

Обсуждение. В СССР в первой инструкции по бактериологическому исследованию на дифтерию¹

(1951 г.) лабораторное исследование проводилось путём посева биологического материала с тампона на свернутую кровяную сыворотку лошади, быка или человека, последующей микроскопии и идентификацией на дифференциально-диагностических средах Гисса с глюкозой, мальтозой, галактозой, сахарозой при добавлении в среды 10% нормальной лошадиной сыворотки. Вирулентность возбудителя оценивали на морских свинках путём внутрикожного введения материала и выявления некроза в месте укола.

В нашей стране в лабораторной диагностике дифтерии питательная среда Пизу впервые стала применяться в конце 1959 года в качестве дополнительного теста. Согласно этой инструкции², производился посев на свернутую сыворотку и теллуритовую агаровую питательную среду. Далее проводилась микроскопия выросших подозрительных колоний, которые отсеивались для постановки пробы на токсигенность, свернутую сыворотку для получения чистой культуры возбудителя и на дифференциально-диагностические среды Гисса с глюкозой и сахарозой. В случаях выделения сахарозоразлагающей чистой культуры микроорганизмов рекомендовалось ставить дополни-

1 Инструкция по бактериологическому исследованию на дифтерию от 05.03.1951 г. Минздрав СССР; 1951.

2 Инструкция по бактериологическому исследованию на дифтерию от 19.09.1959 г. № 303-59. Минздрав СССР; 1959.

тельные пробы - на цистиназу (проба Пизу) и уреазу. Питательную среду Пизу предлагалось готовить на основе 2% мясо-пептонного агара с добавлением 1% раствора цистина в 0,1 N растворе NaOH, 0,1 N раствора H₂SO₄ и последующем внесении в охлажденной питательной среде 9 мл нормальной лошадиной сыворотки. В качестве альтернативы мясо-пептонному агару предлагалось использовать перевар Хоттингера. Учет результатов производился через 20-24 часа от момента посева.

В инструкции по бактериологическому исследованию на дифтерию № 690-67³ и приказе Минздрава № 580⁴ питательная среда Пизу использовалась для выявления дифференцирующего признака возбудителя дифтерии. Подозрительные колонии, выросшие на питательных средах первичного посева, рекомендовалось пересевать на три питательные среды: 1) для определения токсигенности; 2) не прожигая бактериологический петли в столбик среды для определения цистиназы; 3) на поверхность сывороточного агара или свернутой сыворотки; при отсутствии дифференциально-диагностической среды для определения цистиназы отсев из колоний следовало производить на дифференциально-диагностические среды Гисса с сахарозой и глюкозой. В инструкции предлагалась пропись лабораторно-приготовленной питательной среды Пизу на основе 1,5% Мартеновского агара и с добавлением 9 мл лошадиной или бычьей сыворотки.

В Методических рекомендациях⁵ 1980 г. при проведении бактериологического исследования на дифтерию предложено с чашек Петри первичного посева из подозрительных колоний ставить пробу на токсигенность и не прожигая петли производить посев на питательную среду Пизу, вторую половину колонии отсеивать на сывороточный агар. В документе рекомендована пропись лабораторно-приготовленной питательной среды Пизу на основе 1,5% Мартеновского агара с последующим добавлением 9 мл лошадиной или бычьей сыворотки.

Пропись питательной среды Пизу несколько раз видоизменялась. В 1986 году наряду с использованием в качестве основы для питательной среды Пизу 1,5% Мартеновского агара, дополнительно предложен агар Д и эритроцит-агар с добавлением 10 мл сыворотки лошади или крупного рогатого скота, что приводило к сокращению сроков получения результата до 4-5 часов⁶. В последующем, производство агара Д было прекращено, а использование эритроцит-агара давало непостоянные результаты. В связи с этим предложена пропись лабораторно-приготовленной среды Пизу на основе АГВ среды, в которую вносили 10 мл лошади-

ной сыворотки [6]. При этом результаты можно было учитывать уже через 3-5 часов⁷ [6, 7]. Позже предложена ещё одна модификация питательной среды Пизу, где в качестве основы предложен агар Мюллер-Хинтона и получение положительного результата через 18-20 часов. Данный вариант питательной среды Пизу апробирован на чистой бактериальной культуре *C. diphtheriae* [8].

В МУК 4.2.698-98⁸ и МУК 4.2.3065-13⁹ «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» сохранён алгоритм, предложенный в более ранних нормативных документах. Для постановки пробы Пизу предложена пропись лабораторно-приготовленной питательной среды на основе 1,5% Мартеновского агара с добавлением 9 мл сыворотки крупного рогатого скота (СКРС) и на основе питательной среды АГВ с добавлением 10 мл СКРС. Указано, что последний вариант питательной среды Пизу используется при отсутствии Мартеновского агара и дифференциально-диагностические признаки возбудителя дифтерии на этой питательной среде менее выражены.

Последние десятилетия отмечены резким скачком промышленного производства питательных сред, широко используемых в клинической и санитарной микробиологии [4, 10, 13]. Не стало исключением и создание сухой питательной среды Пизу, предназначенной для бактериологических исследований в клинической микробиологии с целью идентификации коринебактерий по тесту расщепления цистина [9, 10].

В России предложены две отечественные коммерческие питательные среды Пизу (ФСР 2007/00458 и ФСР 2008/03064), коммерческая питательная среда в составе набора реагентов (ФСР 2010/7815), не требующие добавления сыворотки. Питательная среда для идентификации коринебактерий по тесту расщепления цистина сухая (среда Пизу) (ГНЦ ПМБ п. Оболенск) разработана и представлена к регистрации как лекарственное средство (МИБП) в 2004 г. В 2008 г. разработаны Технические условия на питательную среду Пизу (ТУ 9398-047-78095326-2008) и зарегистрированы в качестве изделия медицинского назначения - Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для идентификации коринебактерий по тесту расщепления цистина сухая (среда Пизу)».

Преимуществом сухих питательных сред является их стандартность, длительность хранения при соблюдении условий, удобство и простота в применении, возможность сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях, экономическая и технологическая эффективность, обусловленная

3 Инструкция по бактериологическому исследованию на дифтерию от 02.09.1967 г. № 690-67. Минздрав СССР; 1967.

4 Инструкция по бактериологическому исследованию на дифтерию (Приложение 4 к приказу Минздрава СССР № 580 от 26.06.1974 г.).

5 Бактериологические исследования при дифтерийной инфекции (Методические рекомендации) от 10.04.1980 г. Минздрав РСФСР; 1980.

6 Инструкция по бактериологической и серологической индикации возбудителя дифтерии и его токсина (Приложение 5 к приказу Минздрава СССР № 450 от 02.04.1986 г.). Министерство здравоохранения СССР; 1986.

7 Методические рекомендации по применению модифицированной среды Пизу и индикаторных бумажных дисков для идентификации, биохимического типирования и определения токсигенности дифтерийных микробов № 28-6/31. Министерство здравоохранения СССР; 1989.

8 Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» от 09.01.1998 г. МУК 4.2.698-98. Министерство здравоохранения России. М.: «Интерэс»; 1998. ISBN 5-89834-02-3.

9 Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» от 14.07.2013 г. МУК 4.2.3065-13. Роспотребнадзор; 2013. ISBN 978-5-7508-1195-3.

крупнотоннажностью производства, и, следовательно, рентабельностью [10, 13]. Стабильность сухих питательных сред гарантирована постоянным физико-химическим и биологическим контролем на всех стадиях технологического процесса получения препарата [10].

Лабораторная практика показывает, что микробиологические исследования одного и того же биоматериала на аналогичных питательных средах различных фирм - производителей, даже при соблюдении идентичных лабораторных условий, могут иметь различия в результатах [4, 9].

Проведённые исследования показали, что применение лабораторно-приготовленной питательной среды Пизу с добавлением СКРС является оптимальным и соответствует ростовым потребностям возбудителя дифтерии. Добавление СКРС необходимо производить *ex tempore*; оно может сопровождаться техническими ошибками, не соблюдением асептических условий внесения СКРС, что, в конечном итоге, может вести к контаминации готовой питательной среды другими микроорганизмами.

Поэтому, в современных условиях активного использования коммерческих питательных сред для повышения диагностической эффективности выявления возбудителя дифтерии в адаптированном алгоритме лабораторной диагностики этой инфекции постановка пробы Пизу для оценки цистиназной активности проводится с бактериальной культурой, выросшей на 10% сывороточном агаре, пересеянной с питательных сред первичного посева. Появление положительного результата возможно уже через 4-6 часов от момента постановки, т. е. в течение рабочего дня. Для постановки пробы Пизу могут применяться как лабораторно-приготовленный вариант питательной среды (с соблюдением всех необходимых условий), так и коммерческие питательные среды (сухие или готовые из набора реагентов), зарегистрированные в установленном порядке. В адаптированном алгоритме бактериологического исследования сроки выдачи окончательного ответа сохраняются, и ответ выдается на 3-5 день от момента взятия биологического материала.

Заключение. Полученные результаты послужили основанием для разработки адаптированного к современным условиям алгоритма проведения бактериологического исследования для повышения эффективности выявления возбудителя дифтерии и качества микробиологических исследований, который представлен в методических указаниях МУ 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1-3, 11-12, 14-15 С.М. REFERENCES)

- Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Гасретова Т.Д., Дятлов И.А., Чепусова А.В., Миронов А.Ю. и др. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты. М.: «Практическая медицина», 2014. ISBN 978-5-98811-277-8.
- Фаворова Л.А., Астафьева Н.В., Корженкова М.П. Дифтерия. М.: Медицина; 1988.

- Фельдман Ю.М., Маханева Л.Г., Лабах А.И. Новая модификация среды Пизу на основе среды АГВ для быстрой идентификации *Corynebacterium diphtheriae*. *Лабораторное дело*. 1989; 4:69-70.
- Фельдман Ю.М., Мельник Н.С. Способ ускоренной идентификации *Corynebacterium diphtheriae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1982; 3: 18-20.
- Габриелян С.А. Ускоренный способ выявления патогенных коринебактерий. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(4):347-50.
- Харсеева Г.Г., Тюкавкина С.Ю., Миронов А.Ю. Дифтерия: характеристика возбудителя и лабораторная диагностика. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 699-706. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706.
- Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. [Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63-5.
- Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.

REFERENCES

- Barksdale L. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol. Reviews*. 1970; 34(4): 378-422.
- Brooks R., Joynson D.H.M. Bacteriological diagnosis of diphtheria. *J. Clin Pathol*. 1990; 43:576-80.
- Colman G., Weaver E., Efstratiou A. Screening test for pathogenic *corynebacteria*. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45: 46-8.
- Kharseeva G.G., Alutina E.L., Gasretova T.D., Dyatlov I.A., Chepusova A.V., Mironov A.Yu. et al. Diphtheria: microbiological and immunological aspects. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2014. - ISBN 978-5-98811-277-8. (in Russian)
- Favorova L.A., Astafieva N.V., Korzhenkova M.P. Diphtheria. Moscow: Meditsina; 1988. (in Russian)
- Fel'dman J.M., Makhaneva L.G., Labah A.I. A new modification of the Pizu medium based on the AGV medium for rapid identification of *Corynebacterium diphtheriae*. *Laboratornoe delo*. 1989; 4:69-70. (in Russian)
- Fel'dman J.M., Melnyk N.S. Method of accelerated identification of *Corynebacterium diphtheriae*. *Zhurnal mikrobiologii, epigemiologii I immunobiologii*. 1982; 3: 18-20. (in Russian)
- Gabrielyan S.A. An accelerated method for detecting pathogenic *corynebacteria*. *Infektsiya I immunitet*. 2013; 3(4): 347-50. (in Russian)
- Kharseeva, G.G., Tyukavkina S.Yu., Mironov A.Yu. Diphtheria: pathogen characteristics and laboratory diagnostics *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(11): 699-706. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706. (in Russian)
- Shepelin A.P., Domotenko L.V., Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A. Modern approaches to the problem of import substitution in the field of production of nutrient media *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(6): 63-5. (in Russian)
- Moore M.S., Parson E.I. A study of a modified Tinsdale's medium for the primary isolation of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Infectious Diseases*. 1958; 102 (1): 88-93.
- Methods in Microbiology. Bergen T., Norris J.R., eds. London: Academic Press, 1978. ISBN 0-12-521512-6.
- Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Alyoshkin V.A. The state and trends in the development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)
- Tinsdale G.F. A new medium for the isolation and identification of *C. diphtheriae* based on the production of hydrogen sulfide. *J. Pathol. Bacteriology*. 1947; 59:461-6.
- Wilson A.P.R., Ridgway G.L., Grunberg R.N., Efstratiou A., Colman G., Cookson B. Routine screening for *Corynebacterium diphtheriae*. *Lancet*. 1990; 336:1199.