

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Борисова О.Ю.^{1,3}, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Чагина И.А.¹, Андриевская И.Ю.¹, Миронов А.Ю.^{1,4},
Требунских И.П.², Сидорова Н.А.², Донских Е.Е.³, Кафарская Л.И.³

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИГЕННОСТИ У *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДИФТЕРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

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

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Роспотребнадзора, 129626, г. Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО Российской национальной исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ,
117997, г. Москва, Россия;

⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий
ФМБА России, 115682, Москва, Россия

Цель - проследить в историческом аспекте совершенствование постановки пробы на токсигенность у *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*, определить особенности её проведения в алгоритме лабораторной диагностики дифтерийной инфекции в России на современном этапе.

Материал и методы. Отработку условий постановки пробы на токсигенность проводили с 9 токсигенными штаммами *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*. Постановку пробы на токсигенность осуществляли с колониями, выращенными на кровяной теллуритовой среде (КТА) и Коринебакагаре (КБА) (ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, Россия). Исследование проведено на основании МУ 4.2.3065-13. Пробу на токсигенность проводили с использованием Коринетоксагара (ФБУН ГНЦПМБ (Оболensk, Россия) и питательной среды ОТДМ (АО «НПО «Микроген» (Россия).

Результаты. Исследования показали 100% эффективность постановки пробы на токсигенность при изучении колоний коринебактерий с КТА и с КБА, при использовании Коринетоксагара и среды ОТДМ. Обоснована необходимость добавления в питательную среду 20% сыворотки крови крупного рогатого скота и ограничения в использовании лошадиной сыворотки. Отработано количество вносимой питательной среды и сыворотки в зависимости от диаметра чашки Петри.

Заключение. Проведённые исследования показали, что для постановки пробы с полосками можно использовать фильтровальную бумагу марок ФБ или ФОБ Ш. Уточнены расстояния между «бляшками» бактериальных культур, полосками или дисками с антитоксином. Отражены особенности постановки пробы на токсигенность со штаммами *C. ulcerans*. Полученные результаты включены в МУК 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; бактериологическая диагностика; дифтерийный токсин; проба на токсигенность; антитоксин.

Для цитирования: Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Чагина И.А., Андриевская И.Ю., Миронов А.Ю., Требунских И.П., Сидорова Н.А., Донских Е.Е., Кафарская Л.И. Определение токсигенности у *Corynebacterium diphtheriae* в бактериологической диагностике дифтерийной инфекции в современных условиях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 68 (11): 702-709. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-702-709>

Для корреспонденции: Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций; e-mail: olgborisova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 02.10.2023

Принята к печати 03.10.2023

Опубликовано 21.11.2023

Borisova O. Yu.^{1,3}, Gadua N. T.¹, Pimenova A. S.¹, Chagina I. A.¹, Andrievskaya I. Yu.¹, Mironov A. Yu.^{1,4}, Trebunsky I. P.², Sidorova N. A.², Donskikh E. E.³, Kafarskaya L. I.³

DETERMINATION OF TOXIGENICITY IN *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* IN BACTERIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF DIPHTHERIA INFECTION IN MODERN CONDITIONS

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

²Center for hygiene and epidemiology in Moscow of Rospotrebnadzor, 129626, Moscow, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia;

⁴Federal scientific and clinical center for specialized types of medical care and medical technologies of the FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia

The **aim** is to trace in historical aspect the improvement of testing for toxicity in *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*, to determine the peculiarities of its implementation in the algorithm for laboratory diagnostics of diphtheria infection in Russia at the current stage.

Material and methods. Testing of the conditions for toxigenicity was carried out with 9 toxigenic strains of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*. The toxigenicity test was performed with colonies grown on Tellurite agar based on GRM-agar (FBIS SRC AMB, Obolensk) and *Corynebacter* agar (CBA) (FBIS SRC AMB, Obolensk). The study was conducted based on MU 4.2.3065-13. The toxigenicity test was performed using Corinetoxagar ((FBIS SRC AMB, Obolensk) and diphtheria microbe detection medium(OTDM) (FSUE NPO Microgen, Russia).

Results. Studies have shown 100% efficacy of testing for toxigenicity in corynebacterial colonies with Tellurite agar and CBA, as well as in the use of *Corynetoxagar* and diphtheria microbe detection medium. The need to add 20% bovine serum to the culture medium and limit the use of equine serum is justified. The amount of introduced culture medium and serum was worked out depending on the diameter of the Petri dish.

Conclusion. Experiments have shown that filter paper of grades FB or FOB III can be used to place a sample with strips. The distances between the bacterial cultures, strips or disks with antitoxin have been clarified. Features of testing for toxigenicity with *C. ulcerans* strains are reflected. The results obtained are included in MUC 4.2.3852-23 «Laboratory Diagnostics of Diphtheria Infection».

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; bacteriological diagnostics; diphtheria toxin; toxigenicity test; antitoxin.

For citation: Borisova O. Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Chagina I.A., Andrievskaya I. Yu., Mironov A. Yu., Trebunsky I.P., Sidorova N.A., Donskikh E.E., Kafarskaya L.I. Determination of toxigenicity in *Corynebacterium diphtheriae* in bacteriological diagnostics of diphtheria infection in modern conditions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (11): 702-709 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-702-709>

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

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>;
Chagina I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2867-9548>;
Andrievskaya I. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-2997-942X>;
Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Trebunsky I.P., <https://orcid.org/0009-0005-5581-6191>;
Sidorova N.A., <https://orcid.org/0009-0000-9868-7805>;
Donskikh E.E., <https://orcid.org/0000-0001-5214-3167>;
Kafarskaya L.I., <https://orcid.org/0000-0002-5488-5786>.

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 02.10.2023
Accepted 03.10.2023
Published 21.11.2023

Введение. Дифтерия - острое антропонозное инфекционное заболевание (токсикоинфекция), характеризующееся фибринозным воспалением в месте входных ворот, интоксикацией организма с преимущественным поражением сердца, почек, нервной системы. Возбудителем дифтерийной инфекции являются токсигенные *Corynebacterium diphtheriae*, продуцирующие дифтерийный токсин (экзотоксин) [1, 2, 3, 4]. Основной специфический тест для выявления возбудителя дифтерии, правильная постановка которого является залогом успешной диагностики дифтерийной инфекции, - определение у выделенной культуры способности к продукции дифтерийного токсина [2, 4].

Открытие возбудителя дифтерии - *Corynebacterium diphtheriae* относится к 1883-1884 годам и принадлежит двум учёным - паталогоанатому Е.Т.А. Klebs (1834-1913), который, рассматривая под микроскопом препарат плёнки от больного дифтерией, увидел попарно располагающиеся в виде латинской буквы V бактерии с булавовидными утолщениями на полюсах клетки, и бактериологу F.A.J. Loeffler (1852-1915), впервые выделившему чистую культуру возбудителя. Идентификацию возбудителя дифтерийной инфекции до середины XX века проводили с помощью микроскопического

метода и изучения вирулентности на животных [1, 2]. В 1920 году впервые описано выявление дифтерийного токсина у возбудителя в реакции флуклюляции с гомологичным антитоксином [1].

В основу разработки способа детекции дифтерийного токсина у *C. diphtheriae in vitro* были положены исследования по разработке методики идентификации возбудителя газовой гангрены на основе иммунодиффузии токсина, вырабатываемого возбудителем, и антитоксина, добавленного в питательную среду, с видимым результатом в виде «кольца преципитации» [5]. В 1948 году опубликованы работы, в которых предложены методики выявления дифтерийного токсина у *C. diphtheriae in vitro*, основанные на реакции токсин-антитоксин взаимодействия в плотной питательной среде [6, 7]. В тесте Элека (Elek S.D.) противодифтерийная сыворотка наносится на бумажную полоску, а бактериальная культура засеивается «полосками», перпендикулярно бумажной полоске. Положительный результат реакции регистрируется в виде «усов» преципитации», отходящих под углом от бумажной полоски [4, 6]. В методике, предложенной О. Ouchterlony, в агар добавляется иммунная сыворотка и на его поверхность засеивается бактериальная культура «бляшками». Поло-

жительный результат регистрируется в виде образования «кольца» преципитации вокруг выросших колоний [7]. В 1949 году опубликованы исследования по сопоставлению эффективности предложенных методик выявления дифтерийного токсина *in vitro* с результатами исследований *in vivo*, использованию различных питательных сред и концентраций антитоксина, времени формирования положительного результата [8, 9]. В 1949 г. О. Ouchterlony [9] оптимизировал методику постановки, осуществляющуюся теперь путём внесения иммунной сыворотки в продольную лунку в агаре. В последующие годы тест Элека [6] усовершенствован [10, 11] и эти модификации легли в основу постановки пробы на токсигенность, рекомендуемой в настоящее время в руководстве ВОЗ по лабораторной диагностике дифтерии.

Цель исследования - проследить в историческом аспекте совершенствование постановки пробы на токсигенность и определить особенности её проведения в алгоритме лабораторной диагностики дифтерийной инфекции 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 МНИИ-ЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора). Изучение штаммов проведено согласно МУ 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции»¹. Исследуемый материал засеивали на два вида питательных сред первичного посева - кровяной теллуритовый агар (КТА) на основе 2% агара (ГРМ-агар, ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран» (Москва, Россия) и теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия) и Коринебакагар (КБА) согласно инструкции производителя (ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия). Культуры термостатировали в течение 24-48 часов при температуре 37 °С. Постановку пробы на токсигенность осуществляли с использованием двух питательных сред - Коринетоксагар (ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия) и среды ОТДМ (АО «НПО «Микроген» (Россия) с добавлением 20% сыворотки крупного рогатого скота (СКРС). В качестве сыворотки для добавления в питательную среду использована - СКРС (ООО «ЛейТран» (Россия), СКРС (ООО «Биолот» (Россия), сыворотка новорожденных телят «Newborn calf serum» (Gibco (Новая Зеландия). Постановку пробы на токсигенность осуществляли методом бумажных полосок, пропитанных антитоксином (АО «НПО «Микроген» (Россия), и дисков, пропитанных дифтерийным антитоксином (ООО «НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород, Россия).

Результаты. С целью разработки адаптированного к современным условиям алгоритма лабораторной диагностики дифтерийной инфекции и подготовки нового

нормативного документа проведены исследования по отработке условий и техник постановки пробы на токсигенность с токсигенными штаммами *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*.

Алгоритм бактериологической диагностики дифтерии, принятый в России, предусматривает, что определение продукции токсина начинается в первый день появления роста изолированных колоний на чашках с плотной питательной средой без накопления чистой культуры. Данный признак изучается у всех подозрительных колоний (20 и более) с чашек первичного посева. При множественном росте подозрительных колоний не рекомендуется ограничиваться формированием только 1-2 «бляшек». При росте единичных колоний на питательных средах первичного посева с 0,5 колонии ставится проба на токсигенность и, не прожигая петли, производится укол в столбик среды Пизу, а оставшиеся 0,5 колонии отсеиваются на сывороточный агар для накопления чистой культуры. В России используются два способа постановки пробы на токсигенность: модифицированная проба Элека с бумажными полосками, утверждённая для бактериологической практики в 1967 г. и проба Ю.Г. Фельдмана и соавт. с бумажными дисками, разработанная в 1988 году². В связи с этим, все исследования по постановке пробы на токсигенность осуществлены с 0,5 и 1 колониями токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*.

На первом этапе исследована эффективность постановки пробы на токсигенность при изучении 0,5 и 1 колоний коринебактерий, выросших на двух разных питательных средах первичного посева - КТА и КБА, и при использовании двух коммерческих питательных сред для определения продукции дифтерийного токсина - Коринетоксагар и среда ОТДМ. Исследования показали 100% эффективность постановки пробы на токсигенность при изучении колоний токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* как с КТА, так и с КБА, и при использовании обеих питательных сред для выявления продукции дифтерийного токсина - Коринетоксагар и среда ОТДМ.

Отработаны условия приготовления питательной среды и внесение в неё реагентов. Сыворотка крови является необходимым фактором роста для *C. diphtheria*. В связи с этим для постановки пробы на токсигенность необходимо добавление в питательную среду 20% СКРС. Проведены исследования по постановке пробы на токсигенность с использованием трёх видов сывороток: СКРС ООО «ЛейТран» (Россия), СКРС (ООО «Биолот» (Россия), сыворотки новорожденных телят «Newborn calf serum» (Gibco (Новая Зеландия). При постановке пробы на токсигенность при использовании всех трёх видов сывороток получен стабильный выраженный положительный результат - образование «усов» преципитации через 24 часа роста у контрольных токсигенных штаммов *C. diphtheriae* № 665 и *C. ulcerans* № 675, и у всех испытуемых токсигенных штаммов. Отсутствие добавления СКРС в питательную среду для постановки пробы на токсигенность однозначно ведёт к отрицательным результатам и будет

²Методические 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; 1988.

¹Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» от 14.07.2013 г. МУК 4.2.3065-13. Роспотребнадзор; 2013. ISBN 978-5-7508-1195-3.

являться грубым нарушением методики постановки пробы. Лошадиную сыворотку крови не рекомендуется использовать для этих целей в связи с тем, что в неё для увеличения сроков хранения могут добавляться консерванты; в составе этой сыворотки может содержаться

избыточное количество железа из гемолизированных эритроцитов или избыточный уровень дифтерийного антитоксина [2], что ведёт к торможению токсинообразования или к появлению неспецифических усов преципитации (рис. 1).

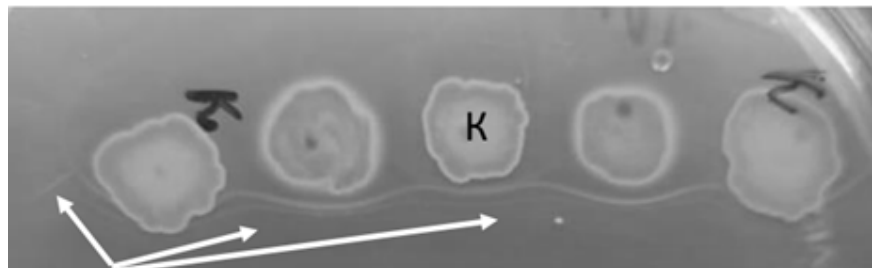


Рис. 1. Неспецифические усы преципитации в пробе на токсигенность при использовании лошадиной лечебной сыворотки для пропитывания бумажной полоски одновременно с добавлением лошадиной сыворотки в питательную среду.

Отработано количество питательной среды и СКРС, необходимое для приготовления чашек разного диаметра, для постановки пробы на токсигенность. Установлено, что при использовании стеклянной чашки Петри диаметром 100 мм необходимо 10 мл питательной основы и 2,5 мл СКРС, а при использовании одноразовой пластиковой чашки диаметром 90 мм оптимально 8 мл питательной среды и 2 мл СКРС.

В пробе на токсигенность используется антитоксин - противодифтерийные антитоксические антитела, очищенные методом специфической сорбции, что исключает появление неспецифических линий преципитации микробного происхождения. В исключительных случаях при отсутствии антитоксина применяется лечебная противодифтерийная антитоксическая лошадиная сыворотка. В таком случае могут появляться неспецифические линии преципитации микробного происхождения, отличающиеся от специфических линий токсического происхождения. Особенно высокий риск появления неспецифических «усов» преципитации может быть при одновременном добавлении лошадиной сыворотки ещё и в питательную среду для постановки.

При использовании методики постановки пробы на токсигенность с бумажной полоской важным этапом является подбор типа фильтровальной бумаги для пропитывания антитоксином с целью стандартизации условий проведения реакции. Апробировано четыре типа фильтровальной бумаги марок ФБ, ФОБ III, ФС, ФОМ, ФМ. Данные типы фильтровальной бумаги обладают разной фильтрующей способностью (ГОСТ 12026-76). ФОБ используется для очень быстрой фильтрации, ФБ - быстрой фильтрации, ФС - средней фильтрации, ФМ - медленной фильтрации, ФОМ - очень медленной фильтрации; марка I - для количественных анализов с массовой долей золы до 0,01%, II - для количественных анализов с массовой долей золы до 0,03%, III - для качественных анализов. Исследования показали, что для приготовления бумажных полосок можно использовать фильтровальную бумагу марок ФБ или ФОБ III. Следует обратить внимание на тот факт, что при приготовлении дисков, пропитанных антитоксином, в лабораторных условиях допускаются серьёзные нарушения, оказывающие существенное влияние на эффективность получения положительного результата в про-

бе на токсигенность. При проведении 36 региональных практических семинаров по лабораторной диагностике дифтерии (2010-2023 г.), проведённых сотрудниками референс-центра по дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, среди таких нарушений отмечены: приготовление дисков на основе использования дисков, ранее содержащих антибиотики, использование цветных дисков, дисков из бумаги с печатным текстом, дисков с неровными краями и т. д.

Особое внимание в процессе проведения исследований уделено уточнению расстояний между «бляшками» бактериальных культур, полосками или дисками с антитоксином. При постановке пробы на токсигенность с бумажными полосками наиболее выраженный положительный результат получен, если бактериальную культуру засевали в виде «бляшек» диаметром 0,5 см на расстоянии 0,6-0,7 см друг от друга и 0,6 см от края полоски фильтровальной бумаги (рис. 2).

При постановке пробы на токсигенность с дисками, пропитанными антитоксином, выраженный положительный результат зарегистрирован, если все 5 «бляшек» располагались симметрично вокруг диска на расстоянии 0,6 см от его края при диаметре каждой «бляшки» 0,5 см (рис. 3).

Оптимально, если на одной чашке Петри (диаметром 100 мм) размещено до 4-х дисков с антитоксином и, соответственно, до 20-ти «бляшек» с культурами (8 «бляшек» контрольных и 12 «бляшек» испытуемых), на одной чашке Петри (диаметром 90 мм) размещено 3 диска с антитоксином и, соответственно, до 15-ти «бляшек» с культурами (6 «бляшек» контрольных и 9 «бляшек» испытуемых). Учитывался тот факт, что бумажные диски располагались на поверхности питательной среды на максимально удалённом расстоянии между дисками, чтобы не произошло перекрёстных реакций. В процессе отработки условий нанесения «бляшек» и дисков учитывалась вероятность разрастания бактериальной культуры. Оказалось, что «бляшки» бактериальной культуры *C. diphtheriae* разрастаются на 0,1 см за 24-48 часов роста. В связи с этим, для формирования выраженного и устойчивого комплекса антиген-антитело в виде «усов» преципитации необходимо придерживаться установленных расстояний.

Особое внимание заслуживает вопрос постановки

пробы на токсигенность со штаммами *C. ulcerans*. Основываясь на проведённых исследованиях и многолетнем опыте работы с возбудителем дифтерийной инфекции, установлено, что вокруг «бляшек» бактериальной культуры *C. ulcerans* могут образовываться «ореолы» разной степени интенсивности в зависимости от используемой сыворотки, которая добавляется в питательную среду, и самого штамма микроорганизма (рис. 4).

Наибольший «ореол» вокруг «бляшки» бактериальной культуры *C. ulcerans* отмечен при использовании лошадиной сыворотки. Следует отметить, что при вы-

явлении продукции дифтерийного токсина у *C. ulcerans* возможно, что специфические «усы» преципитации, которые появились у токсигенного штамма *C. ulcerans* и слились с «усами» преципитации контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* № 665 через 24 часа роста, могут исчезнуть через 48 часов роста. Данный феномен можно объяснить различиями токсина *C. ulcerans* и дифтерийного токсина *C. diphtheriae*, особенностями производства дифтерийного антитоксина. Учёт токсигенности у *C. ulcerans* необходимо обязательно производить через 24 часа роста.

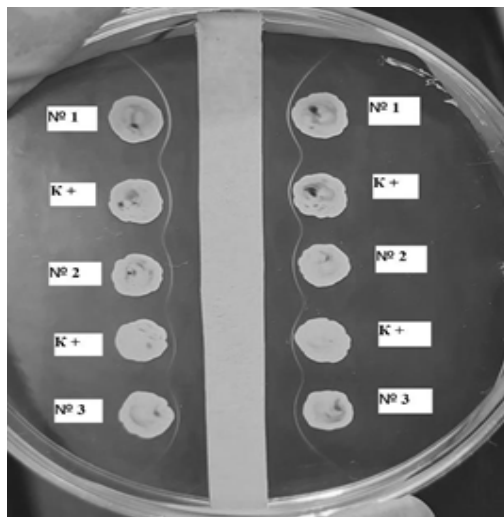


Рис. 2. Проба на токсигенность с бумажной полоской, пропитанной антитоксином (K - контрольный токсигенный штамм *C. diphtheriae* № 665; 1, 2, 3 - испытываемые токсигенные штаммы *C. diphtheriae*).

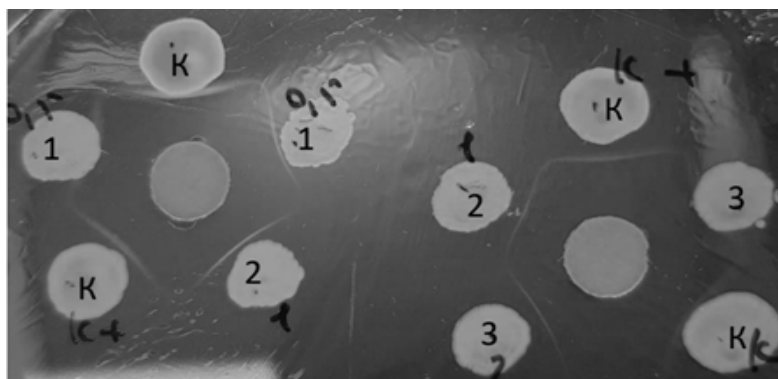


Рис. 3. Проба на токсигенность с дисками, пропитанными антитоксином (K - контрольный токсигенный штамм *C. diphtheriae* № 665; 1, 2, 3 - испытываемые токсигенные штаммы *C. diphtheriae*).

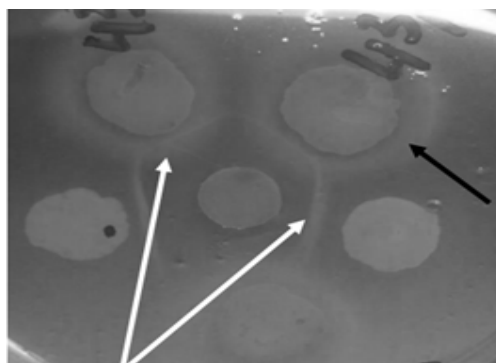


Рис. 4. Проба на токсигенность с бактериальной культурой *C. ulcerans* (чёрная стрелка - вокруг «бляшки» сформировался «ореол», белые стрелки - «усы» преципитации).

Обсуждение. В СССР в первой инструкции по бактериологическому исследованию на дифтерию (1951 г.)¹ лабораторное исследование проводилось путём посева биологического материала с тампона на свернутую кровяную сыворотку лошади, быка или человека; приготовления двух микропрепаратов (один мазок красили щелочной синькой или фуксином Пфейффера, другой мазок красили по Нейссеру) и микроскопии. Вирулентность возбудителя оценивали на морских свинках путём внутрикожного введения материала и выявления некроза в месте укола на 3-4 сутки.

Согласно инструкции по бактериологическому исследованию на дифтерию (1959 г.)² производили посев на свернутую сыворотку и плотную теллуритовую питательную среду. Из выросших колоний проводили микроскопию подозрительных колоний, отсеивали для постановки пробы на токсигенность, свернутую сыворотку для получения чистой культуры и на среды Гисса с глюкозой и сахарозой. Для постановки пробы на токсигенность предлагалось использовать шесть вариантов питательных сред: Мартеновский агар с добавлением нормальной лошадиной или нативной бычьей сыворотки; Мартен-цистин-агаровая среда с добавлением нормальной бычьей или лошадиной сыворотки; Мартен-цистиновая агаровая среда без сыворотки; бессывороточный фосфатный агар на переваре Хоттингера; питательный агар на переваре Хоттингера с лошадиной или бычьей сывороткой; фосфатно-пептонный агар по Романову и Шнеерсон. Постановку пробы на токсигенность осуществляли с использованием бумажных полосок размером 1,5x8,0 см, пропитанных антитоксической противодифтерийной сывороткой «Диаферм-3», разведённой до содержания 500 АЕ в 1 мл. Посев культуры осуществляли петлей линиями перпендикулярно к полоске фильтровальной бумаги. На одну чашку одновременно засеивали 3 штамма (четырьмя линиями по два штриха по каждую сторону полоски), один из которых был контрольным токсигенным штаммом. Допускался посев культуры «бляшками» диаметром 1 см. При использовании сывороточных питательных сред учёт реакции осуществляли через 24-48 часов, а при применении бессывороточных питательных сред - в течение 72 часов.

В инструкции по бактериологическому исследованию на дифтерию № 690-67³ от 1967 г. подозрительные колонии, выросшие на питательных средах первичного посева, рекомендовалось пересевать на три питательные среды: для определения токсигенности, не прожигая петли в столбик среды для определения цистиказы и на поверхность сывороточного агара или свернутой сыворотки. Для постановки пробы на токсигенность список рекомендуемых питательных сред сократился до трёх: Мартеновский агар с добавлением нормальной лошадиной или нативной бычьей сыворотки; Мартен-цистин-агаровая среда с добавлением нормальной (крупного рогатого скота или лошадиной) сыворотки;

Мартен-цистиновая агаровая среда без сыворотки. Впервые в этой инструкции предложено использовать коммерческие среды (Дагестанский НИИ питательных сред, Махачкала): сухой питательный агар для определения токсигенности, сухой питательный агар с добавлением мясной воды, сухой питательный агар с добавлением смеси солей, в которые добавляли 20% нормальной лошадиной или 30% СКРС. Постановку пробы на токсигенность осуществляли с использованием бумажных полосок такого же размера, как и ранее (1959 г.), пропитанных антитоксической противодифтерийной сывороткой «Диаферм-3» или противодифтерийным гамма-глобулином, разведённым до содержания 500 АЕ в 1 мл. Посев культуры осуществлялся только «бляшками» диаметром 1 см по обе стороны от полоски фильтровальной бумаги на расстоянии друг от друга и от края 0,5 см. На одну чашку одновременно засеивали 6 «бляшек» испытуемых штаммов и 4 «бляшки» контрольного токсигенного штамма. При использовании сывороточных сред учёт реакции осуществляли через 24-48 часов, а при применении бессывороточных сред - 72 часа.

В инструкции по бактериологическому исследованию на дифтерию Приказа Минздрава № 580 от 1974 г. (Приложение 4)⁴ рекомендовано использовать методику постановки пробы на токсигенность и питательные среды, как было предложено ранее (1967 г.). Для пропитывания полоски, в отличие от раннего документа 1967 г., предлагалось использовалась только антитоксическую противодифтерийную сыворотку «Диаферм-3» и впервые определено место получения контрольного токсигенного штамма - в НИИВС, НИИЭМГ в лабораториях городских и областных СЭС.

В Методических рекомендациях⁵ 1980 г. при проведении бактериологического исследования на дифтерию предложено с чашек Петри первичного посева с подозрительных колоний ставить пробу на токсигенность и не прожигая петли производить посев на среду Пизу, вторую половину колонии отсеивать на сывороточный агар. Постановку пробы на токсигенность проводили аналогично инструкциям 1967 г. и 1974 г. Для постановки пробы на токсигенность предлагалось использовать только два варианта питательных сред - Мартеновский агар и сухой питательный агар для определения токсигенности, в которые добавлялось 20% нормальной лошадиной или 30% СКРС. Культуру засеивали «бляшками» меньшего размера - 0,7 см на расстоянии 0,7 см друг от друга и 0,5 см от края полоски фильтровальной бумаги.

Наиболее подробная инструкция по бактериологической диагностике дифтерии представлена в приказе Минздрава СССР от 02.04.1986 г. № 450⁶, где сохраняется ранее описанный алгоритм проведения исследования, и перечень питательных сред для постановки пробы на токсигенность. Постановка пробы на токсигенность осуществлялась с помощью бумажных полосок. Предложено при проведении большого количества диагности-

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

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

³Инструкция по бактериологическому исследованию на дифтерию СЭУ МЗ СССР № 690-67 от 02.09.1967 г.

⁴Инструкция по бактериологическому исследованию на дифтерию (Приложение 4 к Приказу Министерства здравоохранения СССР № 580 от 26.06.1974 г.).

⁵Бактериологические исследования при дифтерийной инфекции (методические рекомендации) от 10.04.1980 г. Министерство здравоохранения РСФСР; 1980.

⁶Инструкция по бактериологической и серологической индикации возбудителя дифтерии и его токсина (Приложение 5 к Приказу Министерства здравоохранения СССР № 450 от 02.04.1986 г.).

ческих исследований ставить реакцию нейтрализации антител (РНат) для выдачи предварительного ответа.

В 1988 году Ю.Г. Фельдманом и соавт.⁷ предложена методика постановки пробы на токсигенность с индикаторной бумажной системой (дисками диаметром 0,6-0,7 см, пропитанными дифтерийным антитоксином (однозональной дифтерийной сывороткой)). Согласно методике культуры наносились «бляшками» размером 0,6-0,7 см и на расстоянии 0,6-0,7 см от края диска. Применение данной методики позволили снизить расход дифтерийного антитоксина в 8-10 раз, в 2,0-2,5 раза - расход питательной среды, трудовые затраты, и полностью отказаться от применения противодифтерийной сыворотки и, тем самым, уменьшить процент выявления неспецифических реакций.

В 1991 году коллективом авторов предложена методика индикации дифтерийного токсина с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)⁸, однако данная методика не получила распространения в практических лабораториях и использовалась для определения уровня токсинообразования при мониторинге возбудителя дифтерии.

В МУК 4.2.698-98⁹ и МУК 4.2.3065-13¹⁰ «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» сохраняется алгоритм, предложенный в ранних документах (1986 г.). Для постановки пробы на токсигенность предложено использовать только агар Маргена или сухие коммерческие питательные среды с добавлением 20% сыворотки крупного рогатого скота. Культуру предложено наносить на поверхность агара в виде «бляшек» диаметром 0,6-0,7 см на расстоянии 0,7-0,8 см друг от друга и 0,5 см от края полоски фильтровальной бумаги. Постановка пробы на токсигенность осуществляется с помощью бумажных полосок размером 1,5x8 см, пропитанных очищенным ферментализом и специфической сорбцией дифтерийным антитоксином, или при отсутствии дифтерийного антитоксина допускается использование противодифтерийной антитоксической лечебной лошадиной сыворотки. В нормативный документ впервые включена методика с использованием индикаторных бумажных дисков с антитоксином, ранее предложенная Ю.Г. Фельдманом¹¹, за исключением увеличения размера «бляшек» до 0,8 см и расстояния до 0,8 см от края диска. Учёт результата строго проводится через 24 и 48 часов роста. Регламентировано, что контрольный токсигенный штамм коринебактерии дифтерии варианта гравис получают в Государственном НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. В МУК 4.2.698-98 включена ещё методика постановки реакции непрямой гемагглю-

тинации (РНГА) для выявления дифтерийного токсина. В МУК 4.2.3065-13 в отличие от МУК 4.2.698-98 предложено использовать бумажные полоски размером 0,7x8,0 см; в методике постановки пробы на токсигенность с помощью дисков уменьшен размер «бляшек» до 0,6-0,7 см на расстоянии 0,7 от края диска; регламентирован токсигенный штамм *C. diphtheriae* 665 биовара гравис в качестве контрольного штамма; исключена методика постановка РНГА.

С 2000-х годов ООО «НПО «Диагностические системы» (Н. Новгород, Россия) выпускает на российский рынок наборы реагентов «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» и «ДС-ДИФ-КОРИНЕ (токсигенность)» в виде двух наборов (РУ № ФСР 2010/07815), в состав которых входят флаконы с дисками, пропитанными антитоксином дифтерийным, для определения токсигенности возбудителя дифтерии. Для исключения выявленных и описанных выше нарушений при приготовлении дисков в лабораторных условиях в новом нормативном документе регламентировано использование только коммерческих дисков для постановки пробы на токсигенность.

Проведённые исследования позволили усовершенствовать методику постановки пробы на токсигенность с использованием бумажных полосок и дисков, исключить возможные ошибки при её осуществлении. На территории России имеется весь необходимый и доступный спектр питательных сред и реагентов для постановки пробы на токсигенность с целью выявления возбудителя дифтерийной инфекции, который доступен всем лабораториям страны [12]. Полученные результаты исследования послужили основой раздела по постановке пробы на токсигенность в новом нормативном документе МУК 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Заключение. Определение токсигенности у выделенной бактериальной культуры *C. diphtheriae* остается ведущим тестом для идентификации возбудителя дифтерийной дифтерии.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 1, 3-9 см. REFERENCES)

2. Фаворова Л.А., Астафьева Н.В., Корженкова М.П. Дифтерия. М.: Медицина; 1988.
3. 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.
4. 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.
12. 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

1. Barksdale L. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol. Reviews*. 1970; 34(4): 378-422.
2. Favorova L.A., Astafieva N.V., Korzhenkova M.P. Diphtheria [Difteriya]. Moscow: Meditsina; 1988. (in Russian)
3. 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 [Difteriya: mikrobiologicheskie i immuno-

⁷Методические 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; 1988.

⁸Методические рекомендации «Индикация дифтерийного токсина методами иммуноферментного анализа и РНГА» от 16.02.1991 г. Министерство здравоохранения РСФСР; 1991.

⁹Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» от 09.01.1998 г. МУК 4.2.698-98. Министерство здравоохранения России. М.: «Интерсэл»; 1998. ISBN 5-89834-02-3.

¹⁰Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» от 14.07.2013 г. МУК 4.2.3065-13. Роспотребнадзор; 2013. ISBN 978-5-7508-1195-3.

¹¹Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» от 14.07.2013 г. МУК 4.2.3065-13. Роспотребнадзор; 2013. ISBN 978-5-7508-1195-3

- logicheskie aspekty]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2014. ISBN 978-5-98811-277-8. (in Russian)
4. Kharseeva G. G., Tyukavkina S. Yu., Mironov A. Yu. Diphtheria: characteristics of the pathogen and laboratory diagnostics *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(11): 699-706. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706. (in Russian)
 5. Petrie G.F., Steabben D. Specific identification of the chief pathogenic Clostridia of gas gangrene. *British medical journal*. 1943; 27:377-9.
 6. Elek S.D. The recognition of toxicogenic bacterial strains in vitro. *British medical journal*. 1948; 13: 493-6.
 7. Ouchterlony O. *In vitro* method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1948; 25(1-2):186-91.
 8. Elek S.D. The plate virulence test for diphtheria. *J. Clin. Patholog.* 1949; 2: 250-8.
 9. Ouchterlony O. *In vitro* method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1949; 26(4):516-24.
 10. Colman G., Cookson B. Routine screening for *Corynebacterium diphtheriae*. *Lancet*. 1990; 336:1199.
 11. Brooks R., Joynson D.H.M. Bacteriological diagnosis of diphtheria. *J. Clin. Patholog*. 1990; 43(7):576-80.
 12. Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Shepelin A. P., Aleshkin V. A. 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)