

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Борисова О.Ю.^{1,3}, Полосенко О.В.², Чагина И.А.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹,
Андриевская И.Ю.¹, Миронов А.Ю.^{1,4}, Кафарская Л.И.³

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

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;

³ФГАОУ ВО Российский национальный 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

При проведении лабораторной диагностики дифтерийной инфекции необходимо выявление возбудителя в оптимально сжатые сроки с обязательной постановкой биохимических тестов.

Цель: совершенствование бактериологического метода при идентификации коринебактерий в рамках разработки нового МУК 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Материал и методы. Использованы коммерческие стандартизованные сухие питательные среды промышленного производства и лабораторного приготовления. **Результаты и обсуждение.** Анализ плотных питательных сред, используемых для первичного посева материала, показал недостаточность дифференцирующих признаков, в связи с общностью ряда ферментативных и культуральных свойств, поэтому выделены ключевые культуральные свойства на питательных средах, по совокупности которых можно четко дифференцировать виды коринебактерий. Доказано, что использование питательной среды Тинсдаля без постановки пробы Пизу не ускоряет выдачу ответа.

Заключение. Питательная среда Тинсдаля не обеспечивает должную ингибицию грамположительной микрофлоры. При использовании железно-глюкозо-лактозного агара с мочевиной при определении уреазной активности наблюдается слабоположительный результат, что затрудняет интерпретацию данного теста. Показана корректность выбора сухой питательной среды № 7 ГРМ, облегчающей процесс определения нитратредуктазной активности в сравнении с питательными средами, требующими дополнительного внесения нитрата калия.

Ключевые слова: биохимическая идентификация; *Corynebacterium diphtheriae*; цистиназная активность; уреазная активность; нитратредуктазная активность

Для цитирования: Борисова О.Ю., Полосенко О.В., Чагина И.А., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Андриевская И.Ю., Миронов А.Ю., Кафарская Л.И. Совершенствование бактериологического метода при идентификации коринебактерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (6): 265-271.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-6-265-271>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 15.04.2024

Принята к печати 16.04.2024

Опубликовано 25.05.2024

Borisova O.Yu.^{1,3}, Polosenko O.V.², Chagina I.A.¹, Gadua N.T.¹, Pimenova A.S.¹, Andrievskaya I.Yu.¹,
Mironov A.Yu.^{1,4}, Kafarskaya L.I.³

IMPROVEMENT OF THE BACTERIOLOGICAL METHOD FOR IDENTIFICATION OF CORYNEBACTERIA

¹G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology & microbiology, 125212, Moscow, Russia;

²FBIS «State research center for applied microbiology and biotechnology» Rospotrebnadzor, 142279, Moscow Region, Obolensk, 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

When carrying out laboratory diagnostics of diphtheria infection, it is necessary to identify the pathogen in the shortest possible time

with the mandatory setting of biochemical tests.

Purpose. Improvement of the bacteriological method for the identification of corynebacteria within the framework of the development of the new MUK 4.2.3852-23 «Laboratory diagnostics of diphtheria infection».

Material and methods. Commercial standardized dry culture media of industrial production and laboratory preparation were used.

Results and discussion. The analysis of dense nutrient media used for primary seeding of the material showed the insufficiency of differentiating traits, due to the commonality of a number of enzymatic and cultural properties, therefore, the key cultural properties on nutrient media were identified, according to the totality of which it is possible to clearly differentiate the species of corynebacteria. It has been proven that the use of Tinsdahl culture medium without a Pizu test does not speed up the response.

Conclusion. Tinsdal's culture medium does not provide proper inhibition of gram-positive microflora. When iron-glucose-lactose agar is used with urea, a weakly positive result is observed in determining urease activity, which makes it difficult to interpret this test. The correctness of the choice of dry nutrient medium № 7 of the timing system is shown, which facilitates the process of determining nitrate reductase activity in comparison with nutrient media requiring additional application of potassium nitrate.

Key words: biochemical identification; *Corynebacterium diphtheriae*; cystinase activity; urease activity; nitrate reductase activity

For citation: Borisova O.Yu., Polosenko O.V., Chagina I.A., Gadua N.T., Pimenova A.S., Andrievskaya I. Yu., Mironov A. Yu., Kafarskaya L.I. Improvement of the bacteriological method for identification of corynebacteria. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (6): 265-271 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-6-265-271>

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>;

Polosenko O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5961-9041>;

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>;

Andrievskaya I. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-2997-942X>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;

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 15.04.2024

Accepted 16.04.2024

Published 25.05.2024

Введение. В практической работе микробиологической лаборатории важно, чтобы используемый метод клинической лабораторной диагностики обладал быстротой и точностью. Бактериологическая диагностика дифтерии имеет определяющее значение при выделении возбудителя и позволяет получить важную информацию о его фенотипических свойствах.

Дифференциально-диагностические питательные среды для выделения коринебактерий характеризуются достаточно высокой воспроизводимостью, точностью, быстротой выполнения, и доступностью для практических микробиологических лабораторий. Использование сложных, дорогостоящих, требующих специально подготовленного лабораторного персонала молекулярно-генетических методов исследований доступно ограниченному кругу микробиологических лабораторий, как правило, референс-центрам, что создаёт сложности при идентификации коринебактерий [1].

При выделении и идентификации коринебактерий важное значение уделяется определению биохимических свойств, помогающих в дифференциальной диагностике коринебактерий от других грамположительных палочек. При идентификации ключевыми являются такие биохимические тесты, как каталазная, цитохромоксидазная, уреазная, нитратредуктазная, пирозинамидазная активности, тест на подвижность, помогающие дифференцировать коринебактерии внутри

рода и между родами групп¹. Достоверная идентификация коринебактерий возможна только с применением молекулярно-генетических методов.

Большинство питательных сред для первичного выделения коринебактерий требуют внесения теллурида калия, который не препятствует росту штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, но при этом может ингибировать контаминирующую микрофлору [12]. Образование колоний тёмно-серого или чёрного цвета происходит за счёт продукции теллуридредуктазы при восстановлении металлического теллура. Оценка морфологических свойств на таких питательных средах не позволяет установить видовую принадлежность микроорганизма, но позволяет предположительно отнести его к роду *Corynebacterium*.

Отобранные для дальнейшего исследования подозрительные колонии подвергаются изучению по следующим биохимическим тестам: на цистиназу, уреазу, нитратредуктазу, ферментацию глюкозы, сахарозы и крахмала. Использование других биохимических тестов увеличивает продолжительность, трудоёмкость, стоимость бактериологического исследования и далеко не всегда приводит к точной идентификации других представителей рода *Corynebacterium*. При проведении клинической лабораторной диагностики дифтерии определение видовой принадлежности других представителей

¹Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*: Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011.

рода *Corynebacterium* не является обязательным².

Фермент цистиназу у коринебактерий определяют путём отсева части колонии уколом в столбик агаризованной питательной среды Пизу, содержащей аминокислоту цистин и уксусно-кислый свинец. Уксусно-кислый свинец является индикатором, который при взаимодействии с сероводородом (H_2S), образующимся при расщеплении цистина при росте *C. diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, переходит в сернистый свинец - соединение тёмно-коричневого цвета [2, 3].

В качестве альтернативы среде Пизу для этих же целей используют питательную среду Тинсдаля. Первоначально данную питательную среду разработал Тинсдаль, позже Биллингс модифицировал её и получил питательную среду для селективного выделения *C. diphtheriae* с улучшенными дифференцирующими свойствами [4, 5]. В настоящее время зарубежными производителями выпускаются сухие питательные среды Тинсдаля, предназначенные для селективного выделения и дифференциации *C. diphtheriae* «Tinsdale Agar Base Основа агара Тинсдаля» (HiMedia, Индия), Tinsdale Agar Base (Merck, ФРГ) и другие. Однако, при интерпретации результатов на питательной среде Тинсдаля следует учитывать, что независимо от того, что колонии образуют коричневый ореол, предположительно определяющий *C. diphtheriae*, их в любом случае пересевают на среду Пизу для подтверждения цистиназной активности [3].

Способность ферментировать углеводы до образования кислоты варьирует у бактерий разных видов, что позволяет проводить их дифференциацию и идентификацию. Специфические углеводы добавляются к основной питательной среде, содержащей индикатор рН, изменяющий цвет дифференциально-диагностической среды под действием кислоты, образующейся при ферментации углеводов. *C. diphtheriae* ферментируют глюкозу и мальтозу. Отсутствие ферментации сахарозы и мочевины - важный дифференциально-диагностический признак среди дифтероидов.

Высокая уреазная активность является важным фактором патогенности коринебактерий. Тест на наличие уреазы при их идентификации упоминается ещё в 1998 году, где при диагностике дифтерии в нормативно-методическом документе «Методические указания. МУ 4.2.698-98»³ отмечено, что пробу на наличие уреазы необходимо ставить в двух вариантах - по методу Заксе и путём посева на бульон с мочевиной. Для определения уреазной активности коринебактерий при исследовании клинического материала используют современные специальные питательные среды, содержащие твин-80, мочевины и антибиотики [6]. Разложение мочевины приводит к образованию аммиака (NH_3), и подщелачиванию питательной среды. Фермент уреазы расщепляет мочевины до диоксида углерода (CO_2) и аммиака (NH_3), вследствие чего происходит сдвиг рН питательной среды в щелочную сторону и изменение цвета индикатора рН. Для определения уреазного теста используют коммерческие питательные среды: среду Кристенсена, уреазный

²МУК 4.2.3065-13. Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2013 (утратили силу).

³МУК 4.2.698-98. Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Минздрав России. 9 января 1998 г. (утратили силу).

бульон Рустигана-Стюарта, либо питательные среды лабораторного приготовления [7, 12].

Ключевым дифференциально-диагностическим признаком при видовой дифференции коринебактерий служит тест на редукцию нитратов, который положителен для всех биоваров *C. diphtheriae*, за исключением *C. diphtheriae mitis var. belfanti*. Тест на нитратредуктазную активность позволяет определить способность восстанавливать нитраты в нитриты. Способность к восстановлению нитратов (NO_3) в нитриты (NO_2) определяют культивированием на специальных бульонах, содержащих 1% раствор нитрата калия (KNO_3). Для определения нитритов в питательную среду добавляют несколько капель реактива Грисса или Касаткина. При положительном результате наблюдается появление красного окрашивания питательной среды [8]. Способность *C. diphtheriae* восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты (нитриты) является дополнительным ключевым признаком, позволяющим дифференцировать *C. ulcerans*. У *Corynebacterium pseudotuberculosis* данный признак может быть переменным и положительным у 21-89% штаммов.

В качестве ориентировочного и дополнительного теста для идентификации *C. pseudotuberculosis* можно использовать обратный САМР-тест на основе Колумбийского агара. *C. pseudotuberculosis* продуцирует фосфолипазу, ингибирующую гемолитический эффект β -гемолиза у *Staphylococcus aureus*. Положительный результат обратного САМР теста - торможение гемолитического эффекта β -гемолиза у *S. aureus* [9].

Биохимические свойства: выявление цистиназной активности, способности окислять глюкозу и мальтозу, отношение к крахмалу, декстрину и отсутствие уреазной активности, наряду с характерными морфологическими и культуральными свойствами (формирование колоний чёрного или серого цвета на кровяных теллуритовых питательных средах) позволяют отнести клинический изолят к одному из биоваров *C. diphtheriae* [10].

В практической работе микробиологической лаборатории предпочтительно использование коммерческих стандартизованных сухих питательных сред промышленного производства [11,12], поэтому нами рассмотрены новые подходы к идентификации видов коринебактерий по биохимическим свойствам при проведении бактериологического исследования.

Цель: совершенствование бактериологического метода диагностики при идентификации коринебактерий в рамках разработки нового МУК 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Материал и методы. Использованные питательные среды:

Сухие:

- Питательная среда для идентификации коринебактерий по тесту расщепления цистина сухая (среда Пизу) (ФСР 2008/03064), Питательная среда для первичной идентификации энтеробактерий сухая (железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной) (ФСР 2011/10006), питательная среда для определения восстановления нитратов в нитриты Среда № 7-ГРМ (ФСР 2011/11418), питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон) (ФСР 2007/00002), (производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) [12].

- Основа агара Тинсдаля (Tinsdale Agar Base) производства HiMedia (Индия) (ФСЗ 2009/03709) с внесением добавки для выделения дифтерийных бактерий: часть А - лошадиная сыворотка, часть В - калия теллурит.

Все питательные среды готовили в соответствии с инструкциями производителей.

Лабораторного приготовления:

- Бульон с мочевиной для определения уреазной активности на основе мясо-пептонного бульона (МПБ ТУ 20.59.52-287-78095326-2018) и ГРМ-бульона с добавлением 1 г мочевины (ГОСТ 6691) и 1 г 0,2 мл 1,6% спиртового раствора индикатора крезолрот (ТУ 6-09-5207);

- Нитратный бульон (МПБ и ГРМ-бульон) с добавлением 0,1 г калия азотнокислого (ГОСТ 4217).

Для определения уреазной активности по методу Заксе использовали:

- реактив А: мочевины - 2 г, спирт этиловый 96% (ГОСТ 5962) - 2 мл, вода дистиллированная - 4 мл;

- реактив В: 0,2% раствор фенолрот - 1 мл (ТУ 6-09-5170), однозамещённый фосфат калия (ГОСТ 4198) - 0,1 г, двузамещённый фосфат калия (ГОСТ 2493) - 0,1 г, натрий хлористый (ГОСТ 4233) - 0,5 г, вода дистиллированная - 100 мл.

Непосредственно перед применением смешивали 1 часть реактива А и 19 частей реактива В.

Для определения нитратредуктазной активности использован коммерческий сухой реактив Грисса (НПО Лаборкомплект, Россия) и свежеприготовленный реактив Грисса:

- раствор № 1: 0,5 г сульфаниловой кислоты (ГОСТ 5821-78) растворяли в 30 мл ледяной уксусной кислоты (ГОСТ 61-75), добавляли 100 мл дистиллированной воды, фильтровали;

- раствор № 2: 0,1 г 1-нафтиламина (ГОСТ 8827-74) растворяли в 100 мл кипящей воды, охлаждали, добавляли 30 мл ледяной уксусной кислоты, фильтровали. Перед применением смешивали равные объёмы растворов № 1 и № 2.

Одновременно для определения нитратредуктазной активности готовили реактив Касаткина:

- раствор № 1: 0,1% раствор риванола в дистиллированной воде;

- раствор № 2: 12% раствор соляной кислоты (HCl) (ГОСТ 3118).

Перед выполнением реакции смешивали равные объёмы растворов № 1 и № 2.

Использованы референс-штаммы, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»: токсигенный *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, токсигенный *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765, токсигенный *C. ulcerans* № 7819, *S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* Dick I.

Всего проведено 400 постановок.

Результаты. Использован метод идентификации коринебактерий по биохимическим свойствам путём определения степени выраженности и времени формирования признака у использованных культур микроорганизмов: присутствие соответствующей реакции (положительный тест) и отсутствие реакции (отрицательный тест).

Определение цистиназной активности. Определение цистиназной активности в пробе Пизу используется в качестве дифференцирующего теста для подозрительных на возбудителя дифтерии колоний микроорганизмов. Сравнительная оценка на цистиназную активность используемых питательных сред Пизу и Тинсдаля показала явное преимущество среды Пизу, поскольку образование облачка по ходу «укола» при посеве *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765, *C. ulcerans* № 7819 визуализировалось уже через 6 ч после постановки теста с исследуемыми культурами. Окончательно результат реакции учитывали через 24 ч инкубации при температуре (37±1) °С. Наличие на питательной среде Тинсдаля тёмно-коричневого ореола, являющегося специфическим тестом на цистиназу, обнаруживалось только на вторые сутки инкубации посевов при росте всех исследуемых штаммов коринебактерий из разведений 10⁻⁷ (рис. 1, А). При более высокой посевной дозе из разведений 10⁻⁶ каждого референс-штамма, дифференцирующий признак являлся нестабильным (рис. 1, Б). Наблюдался рост грамположительной микрофлоры: *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* Dick I на питательной среде Тинсдаля из разведений 10⁻⁴.



Рис. 1. Рост тест-штамма *Corynebacterium diphtheriae* биовара *mitis* № 6765 на питательной среде Тинсдаля (А - из разведения 10⁻⁷, Б - из разведения 10⁻⁶).

Определение уреазной активности. Предшествующие нормативно-методические документы по лабораторной диагностике дифтерии в схеме бактериологического исследования на этапе идентификации регламентировали определение уреазной активности по методу Заксе (рис. 2) и путём посева на питательный бульон с мочевиной на

основе следующих питательных сред: МПБ, бульон Хоттингера, ГРМ-бульон. Чтобы обеспечить унификацию положительных результатов теста по выявлению способности коринебактерий расщеплять мочевины, дополнительно апробирована сухая коммерческая питательная среда «Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной».

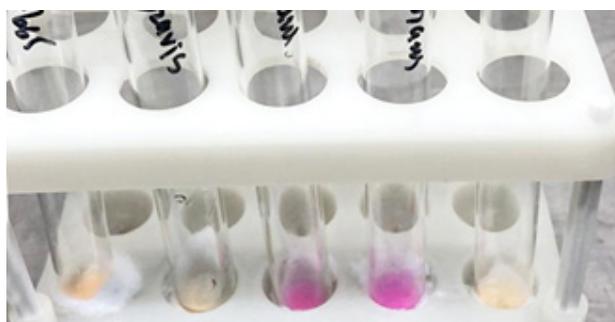


Рис. 2. Определение уреазной активности по методу Заксе.

Слева направо - тест-штамм *Corynebacterium diphtheriae* биовара *gravis* № 665 - 2 пробирки, тест-штамм *Corynebacterium ulcerans* № 7819 - 2 пробирки, отрицательный контроль - 1 пробирка.

Испытуемые культуры *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765, *C. ulcerans* № 7819 петлей вносили в 0,1 мл реактива Заксе, содержащего спиртовой раствор мочевины и феноловый красный. Предварительный результат получали уже через 30 мин инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С. Окончательно результат регистрировали через 24 ч инкубации. Одновременно проводили посев исходных культур петлей в МПБ с мочевиной и ГРМ-бульон с мочевиной, разлитые в стерильные пробирки по 3 мл, и уколком в столбик железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной. Результат учитывали через 24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С. Визуально изменение цвета питательной среды на малиновый наблюдали при посеве *C. ulcerans* № 7819, обладающей способностью продуцировать в процессе роста фермент уреазу и расщеплять мочевины только при использовании метода Заксе и в бульонах с мочевиной на основе МПБ и ГРМ-бульона (рис. 3, А, Б). Не продуцирующие фермент уреазу *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 и *C.*

diphtheriae биовара *mitis* № 6765 и не обладающие уреазной активностью, соответственно не изменяли исходный цвет бульонов. При использовании железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной при посеве *C. ulcerans* № 7819 наблюдалось слабое изменение цвета питательной среды из исходного на малиновый. Такое еле-видимое изменение цвета при постановке пробы на уреазу указывает на сомнительный результат. Это может быть вызвано тем, что при росте коринебактерий не происходит защелачивания питательной среды вследствие многокомпонентного состава и буферности питательной среды.

Из полученных сравнительных результатов ясно, что железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной не может быть применён при тестировании на уреазу, поскольку проявление слабовыраженного окрашивания питательной среды в дальнейшем затруднит идентификацию по данному признаку, что приведёт к сомнительным результатам и необходимости постановки дополнительных тестов.

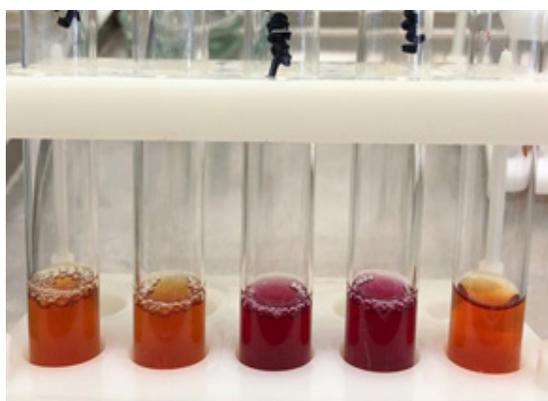


Рис. 3. Определение уреазной активности при использовании МПБ с мочевиной (А) и ГРМ-бульона с мочевиной (Б).

Рост тест-штамма *Corynebacterium diphtheriae* биовара *gravis* № 665 - 2 пробирки, рост тест-штамма *Corynebacterium ulcerans* № 7819 - 2 пробирки, отрицательный контроль - 1 незасеянная пробирка.

Определение нитратредуктазной активности.

Способность к восстановлению нитратов в нитриты определяли культивированием исследуемых культур коринебактерий в нитратных бульонах на основе МПБ и ГРМ-бульона, содержащих 0,1 г/л нитрата калия (KNO_3), и с использованием питательной среды для определения восстановления нитратов в нитриты «Питательная среда № 7 ГРМ».

После инкубации посевов в течение 24 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ C$ в каждую пробирку с выросшей культурой добавляли 2-3 капли реактивов Грисса (реактив коммерческий и лабораторного приготовления). Одновременно определяли нитратредуктазную активность с посевами тех же культур, применяя реактив Касаткина. При учёте результатов оценивали все пробирки с посевами, в которых наблюдалось появление красного кольца, свидетельствующее о наличии нитратредуктазной

активности. В пробирках с посевами испытуемых культур *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765, способных восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) до солей азотистой кислоты (нитриты), при внесении реактивов лабораторного приготовления (Грисса и Касаткина) наблюдалось окрашивание питательных сред в красный цвет, указывающее на положительную реакцию в тесте по определению нитратредуктазной активности (рис. 4). Штамм *C. ulcerans* № 7819 не способен восстанавливать нитраты в нитриты, о чём свидетельствует отсутствие окраски питательных сред после добавления реактивов Грисса и Касаткина лабораторного приготовления. При учёте результатов отмечено, что при использовании коммерческого реактива Грисса микроорганизмы, обладающие нитратредуктазой, не обеспечивают изменение окраски питательной среды.

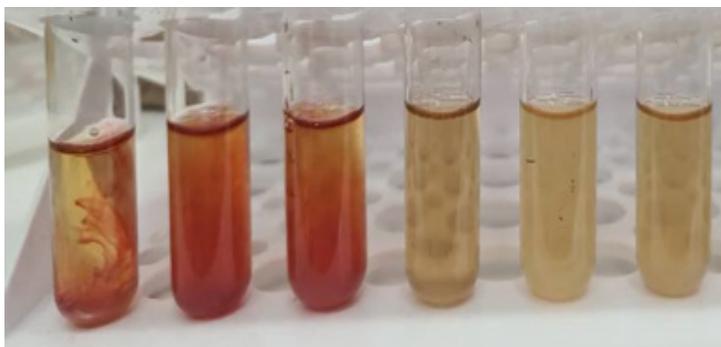


Рис. 4. Определение нитратредуктазной активности при использовании питательной среды № 7-ГРМ.

Слева направо - окрашивание питательной среды после внесения реактива Грисса в пробирку с тест-штаммом *Corynebacterium diphtheriae* биовара *gravis* № 665 – 2 пробирки, с тест-штаммом *Corynebacterium diphtheriae* биовара *mitis* № 6765 – 1 пробирка, отсутствие окрашивания питательной среды после внесения реактива Грисса в пробирку с тест-штаммом *Corynebacterium ulcerans* № 7819 – 2 пробирки, контроль - незасеянная питательная среда – 1 пробирка.

Воспроизводимость результатов метода может быть достигнута при строгом соблюдении деталей техники анализа, или же при использовании качественного и правильно приготовленного реактива Грисса. В нашем случае данный коммерческий реактив Грисса не может быть использован при определении нитратредуктазной активности из-за ложной реакции, которая может привести к неправильной интерпретации теста и соответственно - к ошибочным выводам. Питательная среда № 7-ГРМ при определении нитратредуктазной активности исследуемых культур *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765, *C. ulcerans* № 7819 не уступает по диагностической эффективности нитратным бульонам на основе МПБ и ГРМ-бульона, в которые внесён нитрат калия (KNO_3), и облегчает процесс проведения исследования.

Для корректной внутриродовой и внутривидовой дифференциации коринебактерий необходимо использовать комплекс тестов, позволяющих повысить специфичность метода за счёт расширения ассортимента питательных сред и реактивов с целью определения ключевых биохимических свойств.

Обсуждение. Проведённый анализ полученных результатов с применением коммерческих питательных

сред и питательных сред лабораторного приготовления для биохимической идентификации коринебактерий показал следующее:

- использование первичной питательной среды Тинсдала без постановки пробы Пизу не ускоряет выдачу ответа. Наличие роста грамположительной микрофлоры на питательной среде затруднит выделение коринебактерий, особенно при небольшом их содержании в исследуемом материале.

- при использовании железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной при определении уреазной активности наблюдается слабоположительный результат, что затрудняет интерпретацию данного теста.

- исследование показало корректность выбора сухой питательной среды № 7 ГРМ, использование которой облегчало процесс определения нитратредуктазной активности в сравнении с питательными средами, требующими дополнительного внесения нитрата калия.

Заключение. Проведённые исследования подтверждают эффективность подхода к совершенствованию бактериологического метода при идентификации коринебактерий в рамках разработки нового МУК 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 4-6, 9 СМ.
REFERENCES)

1. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю. Методы идентификации *Corynebacterium non diphtheriae*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(4): 245-9. DOI:10.18821/0869-2084-2016-4-245-249.
2. 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): 620-6. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-10-620-626.
3. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М., ред. М.: БИНОМ; 2012.
4. Клиническая лабораторная аналитика. Том IV. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Меньшиков В.В., ред. М.: Агат-Мед; 2003.
5. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Биргер М.О., ред. 3-е изд. перераб. и доп. М.: Медицина; 1982.
6. Харсеева Г.Г., Тюкавкина С.Ю., Миронов А.Ю. Дифтерия: характеристика возбудителя и лабораторная диагностика (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 699-706. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706.
7. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Борисова О.Ю., Пименова А.С., Гадуа Н.Т. Сравнительная характеристика питательных сред для выделения коринебактерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 59-64.
8. Шепелин, И.А., Миронов А.Ю., Шепелин К.А. Питательные среды: Справочник бактериолога. 2-е изд. М.: ЗАО «А-Принт»; 2015. ISBN 978-5-9905485-3-4.
9. identification of *Corynebacterium non-diphtheriae*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(4): 245-9. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-4-245-249. (in Russian)
10. Borisova O.Yu., Chagina I.A., Gadua N.T., Pimenova A.S., Polosenko O.V., Khramov M.V., Trebunskikh I.P., Sidorova N.A., Alekseyeva I.N., Mironov A.Yu. Features of the application of the Pisa medium in the bacteriological diagnosis of diphtheria in modern conditions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2024; 68(10): 620-6. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-10-620-626. (in Russian)
11. A guide to medical microbiology. Private medical microbiology and etiological diagnosis of infections. Book II. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., Ivanova S.M., eds. Moscow: BINOM; 2012. (in Russian)
12. Tinsdale G. F. W. A new medium for the isolation and identification of *Cdiphtheriae* based on the production of hydrogen sulphide. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1947; 59: 461.
13. Billings E. An investigation of Tinsdale's Tellurite Medium, its usefulness and mechanism of halo formation. Thesis Univ. Michigan; 1956.
14. Fontana I., Bertocchi M., Rossi A., Gasloli G., Santori G., Ferro C. et al. *Corynebacterium urealyticum* infection in a pediatric kidney transplant recipient: case report. *Transplant. Proc.* 2010; 42 (4): 1367-8. DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.03.054.
15. Clinical laboratory analysis. Volume IV. Private analytical technologies in the clinical laboratory. Men'shikov V.V., ed. Moscow: Agat-Med; 2003: 816. (in Russian)
16. Handbook of microbiological and virological research methods. Birger M.O., 3rd ed. Moscow: Meditsina; 1982. (in Russian)
17. Available at: [https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria/Reverse test CAMP](https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria/Reverse%20test%20CAMP) (accessed 4 April 2024).
18. Kharseeva G.G., Tyukavkina S.Yu., Mironov A.Yu. Diphtheria: characteristics of the pathogen and laboratory diagnostics (lecture). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65 (11): 699-706. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706. (in Russian)
19. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Borisova O.Yu., Pimenova A.S., Gadua N.T. Comparative characteristics of culture media for the isolation of corynebacteria. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(1): 59-64. (in Russian)
20. Shepelin I.A., Mironov A.Yu., Shepelin K.A. Culture media: Handbook of bacteriology. 2nd ed. Moscow: A-Print; 2015. ISBN 978-5-9905485-3-4. (in Russian)

REFERENCES

1. Kharseeva G.G., Voronina N.A., Mironov A.Yu. Methods of