

Л.С.Катунина, А.А.Курилова, Т.В.Таран, Ю.С.Ковтун, Н.В.Чурикова, А.А.Зуенко

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПЛОТНАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕГИОНЕЛЛ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Представлена принципиальная схема приготовления экспериментальной питательной среды для культивирования легионелл на основе ферментативного гидролизата легкого свиньи. Показано, что питательная среда обладает хорошими ростовыми свойствами и соответствует требованиям нормативной документации, предъявляемым к питательным средам для выделения и культивирования возбудителя легионеллеза.

**Ключевые слова:** легионеллы, культивирование, гидролизат, питательные среды, биологические показатели.

L.S.Katunina, A.A.Kurilova, T.V.Taran, Yu.S.Kovtun, N.V.Churikova, A.A.Zuenko

### Experimental Solid Medium for Legionella Cultivation

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Presented is the principal scheme for preparation of experimental medium for Legionella cultivation on the basis of fermentative hydrolysate of pig lung. Shown is that the culture medium has good growth properties and meets the requirements of regulatory documentation for culture medium used for isolation and cultivation of the causative agent of legionellosis.

**Key words:** legionella, cultivation, hydrolysate, nutrient medium, biological parameters.

Легионеллез (болезнь легионеров) – острая инфекционная болезнь, инициируется преимущественно видом *Legionella pneumophila*, характеризуется полиморфизмом клинических проявлений, что придает особое значение методам лабораторной диагностики заболевания. *Legionella* spp. является достаточно частым возбудителем внебольничной и нозокомиальной пневмонии (1–40 %) [8]. Это тонкий, плеоморфный микроорганизм, подвижен за счет одного или более жгутиков, обладает тропностью к ткани легкого [10]; по сравнению с другими видами рода представляет уникальный термически устойчивый вариант [11]. Клеточная стенка имеет строение, характерное для грамотрицательных микроорганизмов, однако по Граму *L. pneumophila* окрашивается плохо [5].

Для микробиологов легионеллез является труднodiагностируемой инфекцией, несмотря на внедрение современных иммунологических и молекулярно-генетических методов. Лабораторная диагностика легионеллеза проводится путем выявления возбудителя с помощью ДНК-зондов или ПЦР; иммунофлюоресцентным методом, путем получения культуры возбудителя и иммуносерологического анализа, направленного на обнаружение специфических антигенов или антител к ним [3, 4, 6].

«Золотым» стандартом диагностики легионеллеза остается бактериологический метод, обладающий 100 % специфичностью, предполагающий выделение чистой культуры возбудителя, ее идентификацию и дальнейшее изучение [5, 7, 9]. Условия культивирования легионелл имеют ряд особенностей. На простых питательных средах они не растут, поэтому требуют создания специальных условий. Их можно

культивировать на средах с добавлением биологических жидкостей – гемоглобина, пирофосфата железа и др. Для культивирования легионелл также может быть использовано заражение культур клеток, особенно фибробластов легкого человека [1].

Стандартная среда для выделения легионелл – агар BCYE $\alpha$ , который содержит дрожжевой экстракт, L-цистеин, соединения железа, альфа-кетоглутарат и ACES-буфер [N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфоновая кислота]. Агар BCYE $\alpha$  – очень богатая питательная среда, которая, однако, не является полностью селективной для легионелл и имеет значительную стоимость. В России разработаны питательные среды для лабораторной диагностики легионеллеза (легионелбакагар, СЭЛ), но чувствительность бактериологического метода в целом остается недостаточной (в среднем не более 60 %) [5], что подтверждает актуальность разработки новых экономичных питательных сред для культивирования легионелл и выделения их из объектов окружающей среды.

Целью настоящего исследования явилась разработка экспериментальной недорогой питательной среды для культивирования легионелл, отвечающей требованиям нормативной документации, как основы для дальнейшего конструирования селективной питательной среды для выделения легионелл.

Учитывая тропность легионелл к тканям легкого, в качестве основы для приготовления питательной среды нами предложен ферментативный гидролизат легкого свиньи (ФГЛс). По данным И.В.Петрухина [2], легкое свиньи, относящееся к субпродуктам 2-й категории, состоит в среднем из 13 % белка, содержит макро- и микроэлементы, витамины. В ферментатив-

ном гидролизате легкого обнаружено достаточное количество минеральных веществ (соли кальция, калия, фосфора, особенно много железа, являющегося необходимым фактором роста легионелл) и аминокислот (лизин, метионин, триптофан, цистеин, треонин, серин, фенилаланин, пролин, аланин, глицин, валин, лейцин, тирозин, гистидин) [2]. Таким образом, данные литературы позволяют предположить питательную ценность ферментативного гидролизата легкого для легионелл. Кроме того, замена дорогостоящего мяса легким (субпродуктом) позволяет существенно удешевить конечный продукт.

В качестве исходной использована рецептура приготовления традиционной питательной среды общего назначения – агар Хоттингера, в которой мясную основу заменили на ферментативный гидролизат легкого свиньи, ввели в состав уголь активный марки «ОУ-А» и L-цистеин.

### Материалы и методы

В работе использованы типичные по культурально-морфологическим свойствам тест-штаммы *L. pneumophila* ATCC 33155 Bloomington 2, *L. pneumophila* ATCC 33152 Philadelphia 1, полученные из ФГБУ «ГИСК им. Л.А.Тарасевича» Минздравсоцразвития России. Подготовку культуры тест-штаммов и оценку биологических показателей питательной среды осуществляли согласно методическим указаниям «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» (МУ 3.3.2.2124-06)

Реактивы и сырье: калий фосфорнокислый двухзамещенный трехводный – ч.д.а. (ГОСТ 2493-75); калий фосфорнокислый однозамещенный – ч.д.а. (ГОСТ 4198-75); калия гидроокись (имп.); уголь активный марки «ОУ-А» (ГОСТ 4453-74); L-цистеина гидрохлорид (имп.), хлороформ в/с (ГОСТ 20015-88); формалин в/с (ГОСТ 1625-89); соляная кислота – ч.д.а. (ГОСТ 3118-77); агар микробиологический (ГОСТ 17206-96); легкое свиньи (ТУ 8-5344-113607); поджелудочная железа крупного рогатого скота замороженная (ГОСТ 11285-93); вода питьевая (ГОСТ 8-51-232-98), вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72).

Ферментативный гидролизат легкого свиньи (ФГЛс) готовили согласно Промышленному регламенту на производство питательного агара для культивирования микроорганизмов, готового к применению (агара Хоттингера) № 01897080-10-10, заменив в рецептуре говяжье мясо на легкое свиньи. Экспериментальную питательную среду (три серии) готовили по условиям того же документа, заменив мясной гидролизат на ФГЛс и добавив в состав уголь активный марки «ОУ-А». Приготовленную питательную среду разливали во флаконы по (200±0,5) мл, которые герметично укупоривали ватно-марлевыми пробками и бумагой крафт. Автоклавировали при

температуре 121 °С в течение 15 мин. Стерильную питательную среду хранили в темном месте, при температуре от 2 до 25 °С, при влажности не менее 80 %. Перед использованием среду расплавляли на водяной бане, остужали до 56 °С, добавляли 0,4 г/л L-цистеина (стерильного раствора в 10 мл дистиллированной воды) и разливали в стерильные чашки Петри. Чашки подсушивали в течение 30 мин, после чего использовали для посева.

Контролем служил легионелбакагар (ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), в качестве «отрицательного» контроля использовали агар Хоттингера собственного производства.

Аминный азот, рН, сухой остаток, прочность геля, продолжительность плавления, температуру плавления и температуру застудневания геля определяли в соответствии с методическими указаниями «Методы контроля бактериологических питательных сред» (МУ 4.2.2316-08)

Контроль стерильности осуществляли путем визуального просмотра каждого флакона со средой после выдерживания при температуре (37±1) °С в течение 44–48 ч и последующих 14 сут при комнатной температуре.

Чувствительность и скорость роста определяли, засевая взвесь тест-штаммов по 0,1 мл из разведения  $10^{-7}$  ( $1 \cdot 10^2$  м.к./мл) на три чашки Петри с питательной средой, равномерно распределяя посевной материал по поверхности среды покачиванием чашек. Учет результатов производили визуально через 24–48–72 ч инкубации посевов при температуре (37±1) °С. Результаты учитывали через 24–120 ч.

Результаты исследования подвергали статистической обработке в стандартной компьютерной программе Excel, определяя среднюю арифметическую, среднюю ошибку средней арифметической и достоверность различий. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Готовая питательная среда на основе ФГЛс представляет собой непрозрачный гель черного цвета, рН 6,8. Сухой остаток составил (5,4±0,6) %, аминный азот – (0,13±0,3) %, прочность геля – (350,0±40,0) г/см<sup>2</sup>, температура плавления – (85±1) °С, температура застудневания – (34±2) °С, продолжительность плавления в кипящей бане – (0,6±0,1) ч. Среда стерильна.

При выращивании тест-штаммов легионелл на питательной среде, приготовленной на основе ФГЛс, через 48 ч наблюдался рост (6±0,7) типичных колоний, тогда как на легионелбакагаре рост первых колоний (5±1,5) наблюдался только через 72 ч. К этому времени на испытуемой среде было сформировано уже (8±1,3) колоний (по скорости роста  $p \leq 0,05$ ). Выросшие как на испытуемой, так и на контрольной среде колонии были 1,5–2,0 мм в диаметре, плосковыпуклые, синевато-сероватые.

На агаре Хоттингера (отрицательный контроль) роста не наблюдалось ни в какие сроки исследования. По критериям пригодности диагностических сред разработанная среда соответствовала требованиям МУ 3.3.2.2124-06, образуя рост в виде сплошного белого налета через 24 ч инкубирования при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  при посеве «газоном» (из посевной дозы  $1 \cdot 10^6$  м.к./мл). Эффективность предлагаемой нами питательной среды составила  $3,03 \cdot 10^9$  м.к. в 1 мл для штамма *L. pneumophila* Philadelphia 1 ATCC 33152 и  $3,05 \cdot 10^9$  м.к. в 1 мл для штамма *L. pneumophila* Bloomington ATCC 33155.

Кроме изучения культуральных свойств легионелл, оценивали тинкториальные свойства и морфологию клеток в мазках, приготовленных из выросших культур и окрашенных по Граму (мазки готовили при двукратном увеличении экспозиции в красителях), и наблюдали подвижность в раздавленной капле. При микроскопическом исследовании мазков в опыте и контроле выявлены плеоморфные грамотрицательные палочки, в препарате раздавленной капли наблюдалась выраженная подвижность микробных клеток. Таким образом, в результате испытания питательной среды было показано сохранение культуральных и морфологических свойств тест-штаммов, а также подвижности микробных клеток.

При хранении в герметичной упаковке при температуре от 2 до  $25^\circ\text{C}$  и влажности не менее 80 %, в темном месте, годность готовой питательной среды на основе ФГЛс составила 12 мес. (срок наблюдения). Полученные данные свидетельствуют о пригодности питательной среды для культивирования легионелл.

Расчет экономической эффективности показал, что среда на основе ФГЛс, 1 л которой стоит 470 руб. (с учетом НДС), в 2 раза дешевле СЭЛ и в 3,7 раза – легионелбакагара (сухой среды).

Рекомендуемый подход к разработке новой питательной среды подтверждает эффективность и экономическую целесообразность применения в качестве сырья легкого свиного и открывает перспективы его дальнейшего использования в микробиологической промышленности. Предложенная плотная питательная среда отвечает требованиям МУ 3.3.2.2124-06 и МУ 4.2.2316-08 к питательным средам для выделения и культивирования возбудителя легионеллеза по биологическим и физико-химическим показателям. По материалам работы получен патент РФ на изобретение № 2412240 от 20.02.2011 г. «Питательная среда для выращивания легионелл».

Таким образом, недорогая питательная среда на основе ФГЛс с использованием в качестве стимулятора роста L-цистеина по показателям чувствительности, эффективности и критериям пригодности соответствует требованиям МУ 3.3.2.2124-06, а по показателю скорости роста превосходит легионелбакагар ( $p \leq 0,05$ ). Это является основанием для дальнейшего изучения указанной основы с целью разработки и

конструирования коммерческой селективной плотной питательной среды для выделения легионелл из объектов окружающей среды с оформлением соответствующей нормативной документации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов. 4-е изд. СПб.: СпецЛит; 2008. 767 с.
2. Петрухин И.В. Корма и кормовые добавки: справочник. М.: Росагропромиздат; 1989. 526 с.
3. Покровский В.И., Прозоровский С.В., Малеев В.В., Тартаковский И.С. Этиологическая диагностика и этиотропная терапия острых пневмоний. М.: Медицина; 1995. 272 с.
4. Тартаковский И.С. Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2000; 2(1):60–8.
5. Темежникова Н.Д., Тартаковский И.С. Легионеллезная инфекция. М.: Медицина; 2007. 264 с.
6. Berdal B.P., editor. Legionella infections and atypical pneumonias. Proceedings of the 11th Meeting of the European Working Group on Legionella infections; 1996 June 2–4; Oslo, Norway. Oslo: The Norwegian Defence Microbiological Laboratory; 1996.
7. Den Boer J.W., Yzerman E.P. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2004; 23(12):871–8.
8. Diederer B.M. Legionella spp. and Legionnaires' disease. J. Infect. 2008; 56(1):1–12.
9. Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(3):506–26.
10. Haun T.R., Berrington W.R., Smith I.A., Uematsu S., Akira S., Aderem A., Smith K.D., Skerrett S.J. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*. J. Immunol. 2007; 179:6981–7.
11. Mouchtouri V., Velonakis E., Hadjichristodoulou C. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. Am. J. Infect. Control. 2007; 35:623–7.

## References

1. Korotyaev A.I., Babichev S.A. [Medical Microbiology, Immunology and Virology: Handbook for Medical Institutions]. SPb; 2008. 767 p.
2. Petrukhin I.V. [Feed and Feed Additives: Guidebook]. M.; 1989. 526 p.
3. Pokrovsky V.I., Prozorovsky S.V., Maleev V.V., Tartakovsky I.S. [Etiologic Diagnostics and Etiotropic Therapy of Acute Pneumonia] M.; 1995. 272 p.
4. Tartakovsky I.S. [Modern approaches to diagnosis of atypical pneumonia]. Klin. Microbiol. Antimikrob. Khimioterapiya. 2000; 2(1):60–8.
5. Temezhnikova N.D., Tartakovsky I.S. [Legionella Infection]. M.; 2007. 264 p.
6. Berdal B.P., editor. Legionella infections and atypical pneumonias. Proceedings of the 11th Meeting of the European Working Group on Legionella infections; 1996 June 2–4; Oslo, Norway. Oslo: The Norwegian Defence Microbiological Laboratory; 1996.
7. Den Boer J.W., Yzerman E.P. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2004; 23(12):871–8.
8. Diederer B.M. Legionella spp. and Legionnaires' disease. J. Infect. 2008; 56(1):1–12.
9. Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(3):506–26.
10. Haun T.R., Berrington W.R., Smith I.A., Uematsu S., Akira S., Aderem A., Smith K.D., Skerrett S.J. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*. J. Immunol. 2007; 179:6981–7.
11. Mouchtouri V., Velonakis E., Hadjichristodoulou C. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. Am. J. Infect. Control. 2007; 35:623–7.

## Authors:

Katunina L.S., Kurilova A.A., Taran T.V., Kovtun Yu.S., Churikova N.V., Zuenko A.A. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

## Об авторах:

Катунина Л.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Ковтун Ю.С., Чурикова Н.В., Зуенко А.А. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 26.07.12.