

Т.П.Морозова, Л.В.Домотенко, М.В.Храмов

## ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОЗРАЧНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА (Ft-АГАРА)

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,  
Оболensk

Приведены результаты тестирования прозрачной питательной среды для культивирования и выделения туляремиального микроба сухой (Ft-агар) при выделении *Francisella tularensis* в модельных опытах и полевых испытаниях. Показано, что Ft-агар обладает хорошими ростовыми и селективными свойствами и может с успехом применяться при работе как с чистыми культурами возбудителя туляремии, так и с полевым материалом. Среда сертифицирована (Регистрационный № ФСП 2007/00899).

**Ключевые слова:** туляремиальный микроб, питательные среды, полевые испытания.

Напряженная эпидемическая обстановка, сложившаяся в последнее время в РФ по ряду инфекционных заболеваний, включая туляремию, и неблагоприятный прогноз ее развития на ближайшие годы диктуют необходимость совершенствования средств их диагностики. Одним из основных направлений совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней является повышение чувствительности, специфичности и экспрессности анализов, проводимых с использованием существующих методов.

Несмотря на широкое распространение современных средств диагностики особо опасных инфекций, «золотым стандартом» в медицинской бактериологии до сих пор остается выделение культуры возбудителя заболевания на питательных средах.

Туляремия – зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, известное с давних времен, характеризующееся различными механизмами и путями передачи [9]. Возбудитель этого заболевания – бактерия *Francisella tularensis*, впервые описанная в 1912 г. американскими исследователями G.W.McCoy и C.W.Chapin [15]. *F. tularensis* – грамтрицательная, неподвижная, не образующая спор, очень мелкая коккобактерия с гладкоконтурной оболочкой, размножающаяся, как правило, почкованием [9]. Это факультативный аэроб, не способный расти на простых питательных средах. В процессе эволюции он приспособился к существованию в организме теплокровных животных, где полностью удовлетворяет свои пищевые потребности [9]. Характерной особенностью возбудителя туляремии является высокая потребность в цистине и тиамине [12].

Для культивирования и выделения возбудителя туляремии первоначально были предложены яичные питательные среды, представляющие собой смесь куриного желтка с 0,9 % раствором натрия хлорида или молоком и коагулированные при 80 °С [15]. Яичные среды довольно чувствительны, но непрозрачны, ненадежны в стерилизации и не подлежат хранению. Эти отрицательные моменты и явились одной из причин попыток замены яичных сред на агаризованные питательные среды. Так, М.М.Анциферов разра-

ботал питательную среду на основе агара Хоттингера с добавлением куриного желтка [1]. Основываясь на том, что возбудитель туляремии прекрасно размножается во внутренних органах животных и человека, богатых кровью (селезенка, печень), E.Fransis [12] предложил использовать агаризованные питательные среды с кровью: глюкозокровяной агар, глюкозосывороточный агар и, наконец, глюкозокровяной агар и глюкозосывороточный агар с добавлением цистина, получивший название «шоколадный» агар Fransis. C.M.Downs [11] несколько модифицировала компонентный состав среды, заменив цистин на цистеин. Среда получила название Glukose Cystein Blood Agar.

В настоящее время Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) [16] рекомендует использовать для лабораторной диагностики туляремии следующие питательные среды: Cystine heart agar (CHA); Cystine heart agar with blood (CHAB); Cystine heart agar base with 9% chocolatized sheep blood; Mueller-Hinton agar with 1% IsoVitaleX; Thioglycollate-glucose blood agar (TGBA); GCII agar base with 1% hemoglobin and 1% IsoVitalex; Buffered charcoal yeast extract (BCYE).

В нашей стране для работы с туляремиальным микробом чаще других использовали предложенный О.С.Емельяновой кровяной рыбно-дрожжевой-глюкозо-цистиновый агар [3].

Использование сред, содержащих нативную кровь, вызывает определенные трудности, в частности, в полевых условиях. Рядом авторов предложено в составе питательных сред заменить кровь гемоглобином [14], плазмой крови [13] и «черным альбумином» (сухой кровью животных) [6, 8], а также экстрактами и гидролизатами крови, гемоглобина, черного альбумина [5, 6, 7, 13]. Питательные среды, состоящие из экстрактов и гидролизатов гемсодержащих продуктов, оказались наиболее удобными в работе, т.к. они прозрачны и автоклавируемы.

Одной из таких сред является разработанная Т.П.Морозовой, Л.В.Логачевой прозрачная агаризованная питательная среда для культивирования и выделения туляремиального микроба [7]. Она состоит из

кислотного гидролизата рыбной муки, экстракта пекарных дрожжей, цистеина гидрохлорида, стимулятора роста гемофильных микроорганизмов, тиамина гидрохлорида, сернокислых солей магния и натрия, пантотената кальция и по своим качествам не уступает кровяным средам.

В ФГУН ГНЦ ПМБ налажен промышленный выпуск среды в сухом виде. Она зарегистрирована как питательная среда для культивирования и выделения туляремийного микроба и имеет коммерческое название «Ft-агар» (Пер. № ФСП 2007/00899). Ft-агар выпускается в виде комплекта, состоящего из сухой питательной агаризованной основы, ростовой глюкозитаминовой добавки (ГВД) и селективной добавки (СД). В состав СД входят кефзол в концентрации 20 мкг/мл и амфотеррицин – 10 мкг/мл. Этот состав отличается от комбинации антибиотиков в средах для выделения туляремийного микроба, традиционно используемой в РФ (пенициллин – 100–500 мкг/мл, ампициллин – 50 мкг/мл и полимиксин В – 100 ЕД/мл [6, 10]) и от рекомендуемой ВОЗ (колистин – 7,5 мг/л, амфотеррицин – 2,5 мг/л, линкомицин – 0,5 мг/л, триметоприм – 4 мг/л, ампициллин – 10 мг/л [16]).

В литературе описано успешное использование Ft-агара для культивирования музейных штаммов *F. tularensis* [10]. Среда введена в раздел подготовки культуры туляремийного микроба для проведения контроля диагностических питательных сред для возбудителей туляремии в Методических указаниях «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» [4]. Вместе с тем отсутствуют данные об использовании Ft-агара при выделении *F. tularensis* из клинического материала и объектов окружающей среды.

Целью настоящей работы является оценка диагностических свойств Ft-агара при выделении туляремийного микроба в модельных опытах и полевых испытаниях.

### Материалы и методы

Лабораторные испытания проводили на базе Российского научно-исследовательского противочумного Института «Микроб» (РосНИПЧИ «Микроб») с участием сотрудников ГИСК им. Л.А.Тарасевича и РосНИПЧИ «Микроб», а также в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте.

Ft-агар готовили в соответствии с методикой, указанной на этикетке. В качестве контрольных сред использовали среду АДЭТ на основе пептона Д с добавлением факторов элективности (ВФС 42-405-ВС-93) и среду, приготовленную из сухой основы питательной среды для культивирования туляремийного микроба (ФС 42-127 ВС-88) производства Иркутского НИПЧИ с добавлением желтков яиц.

Специфическую активность сред оценивали по

биологическим показателям: чувствительности, скорости роста, прорастанию, стабильности основных биологических свойств микроорганизмов и ингибции [2].

В испытаниях использовали музейные штаммы различных подвидов *F. tularensis* (503/840, 503/862, 543, Schu, A.Cole, 48, Miura, 24, A-166), авирулентные штаммы *F. tularensis* 38 и *F. tularensis* 15 Гайского, восстановленные из лиофилизированного состояния путем двух пассажей на среде Мак Коя [15], а также штаммы культур-контаминантов (*Proteus vulgaris* X-14, *Escherichia coli* 1015, *Bacillus cereus*). Все штаммы были типичными по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам.

Полевые испытания проводили при эпизоотологическом обследовании территорий Западно-Казахстанской области на базе Уральской противочумной станции в 1991–1993 гг. (весна–лето) и на базе Харабалинского противочумного отделения Астраханской ПЧС весной 1989 г.

На Уральской противочумной станции испытания Ft-агара проводили на протяжении трех рабочих сезонов. Материалом для исследования служили суспензии клещей в физиологическом растворе. Как правило, пробы были групповые – по 10–15 клещей растирали в фарфоровой ступке, добавляли 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия и по 0,1 мл полученной суспензии высевали на Ft-агар и на контрольную среду, в качестве которой использовали среду на основе эритроцит-агара. Оставшуюся суспензию вводили биопробным животным – белым мышам. В случае гибели биопробных животных делали отпечатки органов (печень, селезенка, лимфатические узлы, легкие и кровь) на испытываемую и контрольную среды.

На базе Харабалинского противочумного отделения в ходе испытаний производили прямой посев органов отловленных грызунов и суспензии эктопаразитов на Ft-агар и на среду Мак Коя. Всего сделано 40 групповых посевов эктопаразитов и органов отловленных животных на питательные среды параллельно с постановкой биопробы.

### Результаты и обсуждение

Лабораторные испытания Ft-агара проводили в три этапа. На первом этапе при оценке специфической активности среды с использованием чистых культур туляремийного микроба 3 рас и микробов-контаминантов получены следующие показатели: чувствительность среды – 10 м.кл.; показатель прорастания исследованных штаммов туляремийного микроба на Ft-агаре – 52–72 %; начальный рост культур *F. tularensis* отмечен через 60 ч культивирования в виде типичных колоний в S-форме размером 0,4–0,5 мм. Средний показатель прорастания для испытываемой среды в 2,6 раза превышал таковой на контрольной среде производства Иркутского НИПЧИ. Ингибирующие свойства среды проявлялись в пода-

Результаты проведения полевых испытаний на Уральской противочумной станции

Период исследований	Количество исследованных клещей	Сделано посевов	Выделено шт. <i>F. tularensis</i>							
			Время появления видимого роста, сут	Прямой посев суспензии		Сроки гибели биопроб, сут	Через биопробу		Всего выделено культур	
				Контрольная среда	Ft-агар		Контрольная среда	Ft-агар	Контрольная среда	Ft-агар
1991, весна–лето	12361	292	3–5	19	19	5–6	3	3	22	22
1992, весна–лето	21954	507	2–3	60	61	7–10	10	10	70	71
1993, весна–лето	16040	383	2–4	34	35	3–8	8	8	42	43
<i>Итого</i>	50355	1182	2–4	113	115	5–8	21	21	134	136

влении роста микробов-контаминантов в концентрации до  $1 \cdot 10^5$  м.к./мл при посеве их в смеси с возбудителями туляремии. Подобная картина наблюдалась и на среде АДЭТ.

На втором этапе на Ft-агар осуществляли посев органов и тканей (селезенки, печени, лимфоузлов, легких, крови) лабораторных животных (беспородных мышей), зараженных музейными штаммами *F. tularensis*. Бактериологическое исследование органов зараженных животных проводили по мере их падежа (в течение 15 дней с момента их заражения). В результате испытаний установлено, что испытываемая среда пригодна для выделения возбудителя туляремии из всех видов органов и тканей павших животных. Культуры туляремийного микроба, выделенные на Ft-агаре, обладали типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами.

Третий этап заключался в анализе среды при имитированном посеве смывов из носоглотки людей и объектов окружающей среды, инфицированных высококовирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840. Всего исследовано 45 проб. Из них на Ft-агаре культура туляремийного микроба выделена из 42 проб, на среде АДЭТ – из 37. Показатель ингибиции сопутствующей микрофлоры на Ft-агаре при исследовании смывов из носоглотки составил 99,8–100 %, при анализе смывов с поверхностей предметов внешней среды – 30–50 %.

При проведении полевых испытаний на базе Харабалинского противочумного отделения сделано 40 групповых посевов суспензии эктопаразитов и органов отловленных животных на Ft-агар и контрольную среду Мак Коя. В результате на Ft-агаре выделена одна культура туляремийного микроба. На среде Мак Коя роста возбудителя туляремии не наблюдалось. При посеве отпечатками из селезенки, печени двух павших биопроб получен рост туляремийного микроба от одной биопробы как на Ft-агаре, так и на среде Мак Коя. Выделенная культура обладала типичными для *F. tularensis* культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами.

При проведении испытаний на Уральской ПЧС

исследовано 2114 животных и 50355 клещей и сделано 1182 посева на Ft-агар и контрольную среду на основе эритроцит-агара.

Посев суспензий клещей позволил выявить одинаковое число эпизоотических точек. При этом на Ft-агаре выделено на две культуры больше. Всего на Ft-агаре выделено 136 культур *F. tularensis*, из них 115 выявлено при прямом посеве суспензии клещей и 21 – через биопробу. При параллельном посеве на контрольную среду выделено 134 культуры *F. tularensis*: 113 – из суспензии клещей и 21 – биопробой. Интенсивность роста туляремийного микроба на Ft-агаре была более выражена, особенно в тех случаях, когда выделяли единичные (до 20) колонии. Среднее время выявления роста культур на Ft-агаре при прямом посеве материала составило 2–4 сут.

Результаты испытаний Ft-агара на Уральской ПЧС представлены в таблице.

По итогам проведенных комплексных испытаний диагностических свойств сухой прозрачной питательной среды для культивирования и выделения *F. tularensis* (Ft-агар) сделано заключение о хороших диагностических свойствах среды и необходимости ее использования в практической работе с туляремийным микробом.

Среда проста в приготовлении, не требует внесения крови или других стимуляторов роста, обладает хорошими ростовыми и селективными свойствами, сертифицирована (Рег. № ФСП 2007/00899). Налажен ее промышленный выпуск.

В настоящее время в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» проводятся работы по оптимизации питательной среды для культивирования и выделения туляремийного микроба, готовой к употреблению, стерильной во флаконах объемом 100 и 250 мл в комплекте с селективной и стимулирующей добавками для работы в полевых условиях, в передвижных лабораториях и др.

Выражаем благодарность Т.И.Анисимовой, И.С.Мещеряковой, В.М.Мезенцеву, Г.Д.Харабаджахану за оказание методической и практической помощи при проведении испытаний.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анциферов М.И. Желточно-агаровая среда для выращивания туляремийного микроба. Известия Иркутского Государственного научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока. 1958; 18:143–53.
2. Барулина И.С., Саяпина Л.В., Байдалова Н.П., Хорева И.И., Мецзякова И.С., Кормилицына М.И., Коровкин С.А. Оценка показателя «специфическая безопасность» живой туляремийной вакцины. Пробл. особо опасных инф. 2009; 1(99):64–6.
3. Емельянова О.С. Микробиология туляремии. В кн.: Туляремия. М.; 1960. С. 51–95.
4. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. Методические указания. МУ 3.3.2.2124-06. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 35 с.
5. Копылов В.А., Сухарь В.И. Сухая элективная среда для диагностики туляремийного микроба на основе модифицированного пептона Д. В кн.: Актуальные вопросы разработки препаратов медицинской биотехнологии: Тез. док. науч. конф. Махачкала; 1988. Т. 1. С. 121–2.
6. Кундин В.А. Прозрачная питательная среда для *F. tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1969; 4:34–6.
7. Логачева Л.В., Морозова Т.П. Питательная среда для *Francisella tularensis*. Патент РФ № 1730143. 1992.
8. Морозова Т.П., Артюхин В.И. Питательная среда для выращивания туляремийного микроба. АС. № 1593220. 1986.
9. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.; 1975; С. 31–6.
10. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. Антибиот. мед. биотехнол. 1987; 32(2):133–7.
11. Downs C.M., Coriell L.L. The cultivation of *Bacterium tularensis*. J. Bacteriol. 1947; 53:89–100.
12. Francis E. The amino-acid cistine in the cultivation of tularemia. Public Health Reports. 1923; 38(3):324–7.
13. Gaspar A.J., Ward M.K. Studies on *Pasteurella tularensis*. Effect of Duolite Treatment on Growth Promoting Properties of Blood and Plasma. J. Lab. Clin. Med. 1960; 55:633–8.
14. Hood A.M. A Growth medium without blood cells for *Pasteurella tularensis*. J. Gen. Microbiol. 1961; 26:45–8.
15. McCoy, G.W., Chapin C. W. Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent. *Bacterium tularensis*. J. Infect. Dis. 1912; 10:61–72.
16. WHO Guidelines on Tularemia. World Health Organization. Geneva. 2007.

T.P.Morozova, L.V.Domotenko, M.V.Khramov

**Evaluation of the Diagnostic Properties of Transparent Nutrient Medium for Cultivation and Isolation of Tularemia Agent (Ft-agar)**

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Presented are the results of transparent dry nutrient medium (Ft agar) for *Francisella tularensis* cultivation and isolation testing in the model experiments and field trials. Ft-agar was shown to possess fine growth and selective properties. It could be used for work with the pure cultures of tularemia agent and with the field material. The medium is certified (the registered number of MM is 2007/00899).

*Key words:* tularemia microbe, nutrient media, field trials.

**Об авторах:**

Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболensk. E-mail: domotenko@obolensk.org

**Authors:**

Morozova T.P., Domotenko L.V., Khramov M.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: domotenko@obolensk.org

Поступила 14.09.09.