

# Способ культивирования дифтерийных микробов

Г.Г.Харсеева<sup>1</sup>, Э.Л.Алутина<sup>1</sup>, А.П.Шепелин<sup>2</sup>, О.В.Полосенко<sup>2</sup>, Т.Д.Гасретова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболensk, Российская Федерация

При культивировании штаммов коринебактерий предлагаемым способом на двухфазной питательной среде в течение 17 ч количество выросших колоний (97–124) значительно превышало таковое при культивировании на кровяном теллуриновом агаре (0–5 колоний). Разработанный способ культивирования коринебактерий на двухфазной питательной среде имеет преимущество перед обычными методами культивирования на кровяном теллуриновом агаре, позволяя обеспечить оптимальные условия для роста коринебактерий. Реализация данного способа культивирования приводит к увеличению скорости роста и количества колоний коринебактерий даже при их малом содержании в исследуемом материале.

**Ключевые слова:** *Corynebacterium diphtheriae*, двухфазная питательная среда, способ культивирования

**Для цитирования:** Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Шепелин А.П., Полосенко О.В., Гасретова Т.Д. Способ культивирования дифтерийных микробов. Бактериология. 2017; 2(2): 36–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-36-38

## The method of cultivation of diphtheria microbes

G.G.Kharseeva<sup>1</sup>, E.L.Alutina<sup>1</sup>, A.P.Shepelin<sup>2</sup>, O.V.Polosenko<sup>2</sup>, T.D.Gasretova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov State Medical University, Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

When cultured strains of *Corynebacterium* proposed method on bephase nutrient medium for 17 hours the number of colonies (97–124) significantly exceeded itself when cultured on blood agar tellurium (0–5 colonies). Developed a method of culturing *Corynebacterium* on bephase nutrient medium has the advantage over conventional cultivation methods on covenantalism, allowing you to provide optimal conditions for the growth of *Corynebacterium*. The implementation of this method of cultivation leads to an increase in the rate of growth and number of colonies of *Corynebacterium*, even with their small content in the material.

**Keywords:** *Corynebacterium diphtheriae*, bephase nutrient medium, the method of cultivation

**For citation:** Kharseeva G.G., Alutina E.L., Shepelin A.P., Polosenko O.V., Gasretova T.D. The method of cultivation of diphtheria microbes. Bacteriology. 2017; 2(2): 36–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-36-38

**З**аболеваемость дифтерией в современных условиях носит спорадический характер [1, 2]. По мере снижения заболеваемости дифтерией роль больных как источников инфекции уменьшается, переходя к носителям, поэтому ликвидация дифтерии невозможна, несмотря на проводимую вакцинацию [3, 4]. Положение усугубляется и недостатками в бактериологической диагностике. У каждого третьего больного диагноз устанавливается без бактериологического подтверждения [4]. Система эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией в России предусматривает

наблюдение за биологическими свойствами дифтерии – токсигенными *Corynebacterium diphtheriae* [1]. В связи с этим необходимо разрабатывать не только новые методы диагностики дифтерийной инфекции и питательные среды, но и способы культивирования дифтерийных микробов, которые позволили бы выявлять возбудителя дифтерии не только у больных, но и носителей, при незначительном их содержании в исследуемом материале.

**Целью исследования** явилась разработка высокоэффективного способа культивирования дифтерийных микробов.

### Для корреспонденции:

Харсеева Галина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России  
Адрес: 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29  
Телефон: (863) 250-4109  
E-mail: galinagh@bk.ru

Статья поступила 07.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

### For correspondence:

Galina G. Kharseeva, Sc.D. (Med), Professor, Head of Department of Microbiology and Virology No. 2 of Rostov State Medical University  
Address: 29 Nakhichevanskiy lane, Rostov-on-don, 344022, Russia Federation  
Phone: (863) 250-4190  
E-mail: galinagh@bk.ru

The article was received 07.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

## Материалы и методы

В качестве исследуемого материала использовали 21 штамм коринебактерий, из них: 4 штамма *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae gravis* tox + № 665, *C. diphtheriae mitis* tox + № 6765, *C. diphtheriae mitis* tox + № 269, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-медицинский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича», *C. diphtheriae gravis* tox +, выделенный от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии» бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» Минобороны России г. Ростова-на-Дону) и 17 штаммов недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum* – 7 шт., *C. xerosis* – 8 шт., *C. pseudotuberculosis* – 2 шт.), выделенных из верхних дыхательных путей от больных острым и хроническим тонзиллитами, фарингитами, ОРВИ, полученных из лаборатории бактериологических методов исследования МУЗ «Городская больница №1» г. Гуково Ростовской области и ГУЗ КДЛ ОДБ г. Ростова-на-Дону.

Для культивирования дифтерийных бактерий использовали кровяной теллуритовый агар (КТА) и двухфазную питательную среду, которую готовили в соответствии с указаниями [5, 6], содержащую жидкую и твердую фазы в объемном соотношении 1 : 3. Посев 0,1 мл микробной взвеси исследованных штаммов коринебактерий производили из разведений  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$ , содержащих 100 и 10 м.к./мл соответственно, на КТА и двухфазную питательную среду. При посеве на двухфазную питательную среду исследуемый материал вносили в жидкую фазу питательной среды. Инкубацию выполняли трехкратно при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  в термостате. Первый раз посев инкубировали в течение 4,0 ч при вертикальном положении емкости. После этого содержимое жидкой фазы перемешивали, емкость с двухфазной питательной средой устанавливали в наклонное положение таким образом, чтобы жидкая фаза питательной среды полностью смачивала всю поверхность твердой фазы. Затем посев при наклонном положении повторно инкубировали в течение 0,5 ч. Далее емкость с посевом устанавливали в вертикальное положение и инкубировали третий раз в течение 12,5 ч. Общее время культивирования дифтерийных микробов на КТА и двухфазной питательной среде составило 17,0 и 24,0 ч.

Учет количества колоний, выросших после культивирования исследованных штаммов коринебактерий, производили визуально.

## Результаты и обсуждение

По результатам проведенных исследований (таблица) установлено, что при культивировании указанным способом на двухфазной питательной среде исследованных штаммов коринебактерий в посеве из разведений  $10^{-7}$  в течение уже 17 ч выросло значительное количество колоний – от 97 до 124. При регистрации количества колоний на этой питательной среде через 24 ч количество колоний коринебактерий увеличивалось незначительно (от 103 до 129), но размеры их становились больше (до 1 мм при 17-часовой экспозиции культивирования; 1,0–1,5 мм – при 24-часовой). При этом в посеве

Таблица. Ростковые свойства питательных сред для культивирования коринебактерий

Питательная среда	Время культивирования, ч	Количество колоний, КОЕ	
		$10^{-7}$	$10^{-8}$
Двухфазная питательная среда	17	97–124	3–5
Кровяной теллуритовый агар	24	103–129	3–6
	17	0–5	нет роста
	24	0–5	нет роста

микробной взвеси в разведении  $10^{-8}$  при культивировании в течение 17 ч число колоний коринебактерий составило 3–5, в течение 24 ч осталось почти таким же (3–6 колоний).

В то же время при исследовании результатов посевов микробной взвеси штаммов коринебактерий на КТА обнаружили, что количество колоний, выросших в посеве микробной взвеси в разведении  $10^{-7}$ , как при 17-часовом культивировании, так и 24-часовом было очень небольшим (от 0 до 5 колоний). Обнаруженные колонии были мелкими (до 1 мм). В посеве микробной взвеси исследованных штаммов коринебактерий в разведении  $10^{-8}$  роста обнаружено не было.

Результаты наших исследований показывают преимущество использования разработанного способа культивирования коринебактерий на двухфазной питательной среде по сравнению с обычными методами культивирования на КТА. Это может быть связано с введением дополнительного орошения твердой фазы питательной среды жидкой ее фазой, что позволило полностью насыщать всю поверхность твердой фазы питательным бульоном. Это, безусловно, приводило к повышению ростовых свойств предлагаемой питательной среды (скорости роста, количества выросших колоний коринебактерий) за счет сокращения логарифмической фазы роста дифтерийных микробов в процессе культивирования.

Таким образом, предлагаемый способ культивирования дифтерийных бактерий на двухфазной питательной среде позволяет обеспечить оптимальные условия для роста коринебактерий. Реализация данного способа культивирования дифтерийных микробов приводит к сокращению времени культивирования и увеличению количества колоний дифтерийных микробов при их малом содержании в исследуемом материале. По сравнению с культивированием дифтерийных микробов на среде КТА сокращается время культивирования при значительном увеличении количества выросших колоний дифтерийных микробов.

## Литература

- Алутина ЭЛ, Гасретова ТД, Дятлов ИА, и др. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты. М.: Практическая медицина, 2014, 241 с.
- Корженкова МП, Малышев НА, Максимова НМ, Маркина СС, Черкасова ВВ, Шестакова ОМ, Базарова МВ. Уроки дифтерии. Биопрепараты. 2011;2:30-5.
- Харсеева ГГ, Соловьева МЮ, Ковалев ЕВ, Айдинов ГВ, Ненадская СА, Алутина ЭЛ, и др. Дифтерийная инфекция: характеристика эпидпроцесса в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014;5:36-9.
- Якимова ТН, Максимова НМ, Маркина СС. Эпидситуация по дифтерии в России и в субъектах Российской Федерации с 2005–2011 г. Бюллетень ВЦНЦ СО РАМН. 2012;5-1(87):131-4.
- Питательная среда для культивирования дифтерийных микробов [текст]: Пат.2549707 Рос. Федерации, МПК С 12 N1/20 С 12R1/01. Харсеева Г.Г., Шепелин А.П., Алутина Э.Л., Полосенко О.В., Садовниченко В.Н., Гасретова Т.Д.;

заявитель и патентообладатель Ростовский государственный медицинский университет (RU) - № 2014101552; заявл. 20.01.2014; опубл. 27.04.2015.

6. Харсеева ГГ, Миронов АЮ, Алутина ЭЛ. Отечественная двухфазная питательная среда для культивирования дифтерийных бактерий. Астраханский медицинский журнал. 2011;4:33-6.

## References

1. Alutina EL, Gasretova TD, Dyatlov IA, et al. Differiya: mikrobiologicheskie i immunologicheskie aspekty [Diphtheria: microbiological and immunological aspects]. Moscow: "Prakticheskaya meditsina" Publ., 2014, 241 p. (In Russian).
2. Korzhenkova MP, Malyshev NA, Maksimova NM, Markina SS, Cherkasova VV, Shestakova OM, Bazarova MV. The Lessons of Diphtheria. Biopreparaty. 2011;2: 30-5. (In Russian).
3. Kharseeva GG, Solovjev MYu, Kovalev EV, Ajdinov GV, Nenadskaya SA, Alutina EL, et al. Diphtheriae Infection: Characteristic of Epidemic Process in Rostov-on-Don and Rostov Region. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2014;5:36-9. (In Russian).
4. Yakimova TN, Maksimova NM, Markina SS. Epidemiological situation of diphtheria in Russia and in the regions of the Russian Federation since 2005 to 2011. The Siberian Scientific Medical Journal. 2012;5-1(87):131-4. (In Russian).
5. Nutrient medium for cultivation of diphtheria microbes [text]: Pat.2549707 Russian Federation. MPK C 12 N1/20 C 12R1/01 Kharseeva GG, Shepelin AP, Alutina EL, Polosenko OV, Sadovnichenko VN, Gasretova TD.; applicant and patentee of the Rostov State Medical University (RU) – №2014101552; 20.01.2014; Epub. 27.04.2015. (In Russian).
6. Alutina EL, Harseeva GG, Mironov AYu. The national biphasic nutrient medium for cultivation of diphtheria bacteria. Astrakhan Medical Journal. 2011;4:33-6. (In Russian).

### Информация об авторах:

Алутина Эльвира Львовна, ассистент курса «Бактериология» ФПК и ППС кафедры микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России  
Адрес: 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29  
Телефон: (863) 250-4109  
E-mail: galinagh@bk.ru

Шепелин Анатолий Прокопьевич, заместитель директора по научно-производственной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск  
Телефон: (4967) 36-0020  
E-mail: shepelin@obolensk.org

Полосенко Ольга Вадимовна, заведующая сектором микробиологических исследований НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск  
Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: info@obolensk.org

Гасретова Татьяна Дмитриевна, доцент курса «Бактериология» ФПК и ППС кафедры микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России  
Адрес: 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29  
Телефон: (863) 250-4109  
E-mail: galinagh@bk.ru

### Information about the authors:

Elvira L. Alutina, PhD (Med), assistant of the course «Bacteriology» the faculty of advanced training and retraining of specialists of Department of Microbiology and Virology No. 2 of Rostov State Medical University  
Address: 29 Nakhichevanskiy lane, Rostov-on-don, 344022, Russian Federation  
Phone: (863) 250-4190  
E-mail: galinagh@bk.ru

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), Deputy Director for science and production, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020  
E-mail: shepelin@obolensk.org

Olga V. Polosenko, Head of Sector of microbiological researches, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: firstova@obolensk.org

Tatyana D. Gasretova, Sc.D. (Biol.), dosent of the course «Bacteriology» the faculty of advanced training and retraining of specialists of Department of Microbiology and Virology No. 2 of Rostov State Medical University  
Address: 29 Nakhichevanskiy lane, Rostov-on-don, 344022, Russian Federation  
Phone: (863) 250-4190  
E-mail: galinagh@bk.ru

## НОВОСТИ НАУКИ

### Мировая карта устойчивости кишечных микробов к антибиотикам

Российские ученые создали интерактивную мировую карту резистентности микробиоты кишечника к антибиотикам. ResistoMap поможет выявить национальные особенности в потреблении антибиотиков и контролировать лекарственную устойчивость в глобальном масштабе. Технология представлена в журнале Bioinformatics, а сам ресурс доступен по адресу <http://resistomap.rcpcm.org/>.

Мировая карта устойчивости кишечных микробов к антибиотикам –  
Новости науки [Electronic resource].  
URL: <http://sci-dig.ru/biology/mirovaya-karta-ustoychivosti-kishechnyih-mikrobov-k-antibiotikam/>  
(accessed: 05.07.2017).

