

# Оценка качества Бордетелагара – питательной среды для культивирования и выделения бордетелл

Я.В.Подкопаев<sup>1</sup>, Л.В.Домотенко<sup>1</sup>, А.П.Шепелин<sup>1</sup>, М.В.Храмов<sup>1</sup>, О.Ю.Борисова<sup>2</sup>, А.С.Пименова<sup>2</sup>, Н.Т.Гадуа<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Проведена оценка качества Бордетелагара в сравнительных и межучрежденческих испытаниях с использованием музейных штаммов *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*. В ходе сравнительного изучения биологических показателей качества Бордетелагара и иностранных коммерческих питательных сред для выделения и культивирования *B. pertussis* установлено, что Бордетелагар не уступает по ростовым свойствам иностранным аналогам. В результате межучрежденческих испытаний установлено, что Бордетелагар полностью отвечает требованиям действующих нормативных документов по диагностике коклюша и паракоклюша.

**Ключевые слова:** Бордетелагар, коклюш, *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, питательные среды

**Для цитирования:** Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Шепелин А.П., Храмов М.В., Борисова О.Ю., Пименова А.С., Гадуа Н.Т. Оценка качества Бордетелагара – питательной среды для культивирования и выделения бордетелл. Бактериология. 2019; 4(3): 24–30. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-24-30

## Assessment of of Boretetelagar quality – nutrient media for cultivation and isolation of bordetela

Ya.V.Podkopaev<sup>1</sup>, L.V.Domotenko<sup>1</sup>, A.P.Shepelin<sup>1</sup>, M.V.Khramov<sup>1</sup>, O.Yu.Borisova<sup>2</sup>, A.S.Pimenova<sup>2</sup>, N.T.Gadua<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation;

<sup>2</sup>G.N.Gabrichesky Research Institute of Epidemiology and Microbiology Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation

Bordetelagar quality have been evaluated in comparative and inter-agency trials using museum strains of *B. pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica*. It was found in a comparative study of the biological quality indicators of Bordetelagar and foreign commercial culture media for the isolation and cultivation of *B. pertussis*, that Bordetelagar is not inferior in growth properties to foreign analogues. As a result of inter-agency tests, it was found that Bordetelagar fully complies with the requirements of current regulatory documents for the diagnosis of whooping cough and paracough.

**Keywords:** Bordetelagar, pertussis, *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, culture media

**For citation:** Podkopaev Ya.V., Domotenko L.V., Shepelin A.P., Khramov M.V., Borisova O.Yu., Pimenova A.S., Gadua N.T. Assessment of of Boretetelagar quality – nutrient media for cultivation and isolation of bordetela. Bacteriology. 2019; 4(3): 24–30. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-24-30

**К**оклюш – это острое респираторное заболевание, вызываемое представителями рода *Bordetella*. Благодаря массовой специфической иммунопрофилактике заболеваемость коклюшем в Российской Федерации за последние годы сохранялась в пределах 2,5–5,6 случаев на

100 тыс. населения. Однако в 2018 г. зарегистрирован подъем заболеваемости этой инфекцией до уровня 7,1 на 100 тыс. населения (при среднемноголетней заболеваемости 3,6). Зарегистрирован один летальный случай. На территории Российской Федерации заболеваемость коклюшем

### Для корреспонденции:

Подкопаев Ярослав Васильевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: podkopaev@obolensk.org

Статья поступила 10.08.2019 г., принята к печати 26.09.2019 г.

### For correspondence:

Yaroslav V. Podkopaev, PhD (Biology), researcher of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: podkopaev@obolensk.org

The article was received 10.08.2019, accepted for publication 26.09.2019

регистрируется неравномерно: от 0,31 на 100 тыс. населения в Псковской области до 19,5 на 100 тыс. населения в г. Санкт-Петербурге [1]. Таким образом, вопросы, связанные с эпидемиологическим надзором и диагностикой коклюша, не потеряли своей актуальности.

В лабораторной диагностике коклюша используют различные методы исследования, включая бактериологический, молекулярно-генетический и серологический. Несмотря на то что эффективность бактериологического метода с посевом на питательные среды при диагностике этой инфекции невысока, этот метод все еще остается наиболее распространенным в клинических лабораториях [2].

Долгое время основной питательной средой для выделения возбудителя коклюша оставался картофельно-глицериновый агар с добавлением от 15 до 50% крови (агар Борде-Жангу). С момента начала производства вакцин против коклюша появилась потребность в синтетических и полусинтетических питательных средах для культивирования вакцинных штаммов *B. pertussis*. В качестве альтернативы агару Борде-Жангу был предложен угольный агар на основе настоя говяжьего сердца. В связи с тем, что эта среда не требует добавления нативной крови, она получила распространение и в клинической микробиологии [3, 4]. В нашей стране также была разработана среда, не требующая добавления крови и содержащая в своем составе уголь, – казеиново-угольный агар [5]. Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработан состав и осуществляется промышленное производство аналога казеиново-угольного агара – питательной среды для культивирования и выделения коклюшного микроба сухой (Бордетелагар).

Как известно, наиболее важными факторами, влияющими на эффективность бактериологического метода при диагностике инфекционных болезней, включая коклюш, являются срок обследования больного от начала заболевания, соблюдение правил забора и транспортировки материала, а также качество используемых питательных сред [2]. Результаты исследований состояния лабораторной диагностики коклюша в РФ, проводимых Референс-центром по коклюшу, выявили проблемы, связанные с осуществлением бактериологического метода и проведением контроля качества используемых питательных сред. Поэтому целью настоящего исследования явилась оценка качества Бордетелагара в сравнительных и межучрежденческих испытаниях.

## Материалы и методы

**Питательные среды.** В исследовании использовали угольный агар – Charcoal agar Becton Dickinson (США, кат. № 289410), Bordet Gengou Agar Base Becton Dickinson (США, кат. №248200) с добавлением 1% глицерина и 15% крови бараньей дефибринированной (далее — агар Борде-Жангу) и четыре серии питательной среды для культивирования и выделения коклюшного микроба сухой Бордетелагар (ГНЦ ПМБ, Оболенск, регистрационное удостоверение ФСР 2012/13688), набор реагентов для количественного определения микробной загрязненности «Питательная среда №1 ГРМ» (ГНЦ ПМБ, Оболенск, регистрационное удостоверение ФСР 2011/11415). Все использованные в исследовании питательные среды готовили в соответствии

с инструкциями производителей. Дополнительно готовили Бордетелагар с добавлением 10% крови бараньей дефибринированной.

Биохимические тесты исследованных штаммов проводили в соответствии с методическими рекомендациями МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша» [5]. Для определения уреазной активности исследованных штаммов применен Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной (ГНЦ ПМБ, Оболенск, регистрационное удостоверение ФСР 2011/10006). Для определения нитратредуктазной активности использована среда №7 ГРМ для определения восстановления нитратов (ГНЦ ПМБ, Оболенск, регистрационное удостоверение ФСР 2011/11418); для определения утилизации цитратов – среда №14 ГРМ (цитратный агар Симмонса, ГНЦ ПМБ, Оболенск, регистрационное удостоверение ФСР 2007/00371). Тирозиназную активность определяли на ГРМ-агаре (ГНЦ ПМБ, Оболенск, регистрационное удостоверение ФСР 2007/00001) с добавлением 0,1 г тирозина. Подвижность бордетелл определяли в столбике полужидкого агара, приготовленного добавлением к ГРМ бульону (ГНЦ ПМБ, Оболенск, регистрационное удостоверение ФСР 2007/00002) 4 г/л агара. Оксидазную активность определяли с помощью тест-полосок OXItest Mikrolatest (кат. № 10003324) и реактива для оксидазного теста Mikrolatest (кат. № 10003375).

**Микроорганизмы.** В исследовании использовали двухсуточные культуры тест-штаммов микроорганизмов: *B. pertussis* 39 («ГКПМ-Оболенск» В-4631), *B. pertussis* 143 («ГКПМ-Оболенск» В-4635), *B. pertussis* 688 («ГКПМ-Оболенск» В-4628), *B. pertussis* 796 («ГКПМ-Оболенск» В-7632), *Bordetella bronchiseptica* 9 («ГКПМ-Оболенск» В-7822), *Bordetella parapertussis* 386 («ГКПМ-Оболенск» В-7821), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», и трехсуточную культуру штамма *B. pertussis* 646, полученного из музея живых культур ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Все использованные штаммы микроорганизмов были типичны по своим культуральным, морфологическим, биохимическим свойствам.

**Условия посева и инкубирования.** Посевы производили параллельно в соответствии с МУК 4.2.2316-08 и «Инструкцией по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше» и МР 3.1.2.0072-13.

В соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» исходные суспензии микроорганизмов для посева готовили в 0,9% растворе натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85 (10 МЕ), что соответствует  $1,1 \times 10^{10}$  клеток коклюшного микроба в 1 мл суспензии. Для получения рабочих разведений  $10^{-1}$ – $10^{-6}$  и условное  $10^{-7}$  ( $10^{-6}$ , разведенное в 4 раза) готовили 6 последовательных десятикратных и одно разведение 1:3 в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида. Чашки Петри с испытуемыми питательными средами засеивали каплями по 0,1 мл суспензии из каждого рабочего разведения [6].

В соответствии с «Инструкцией по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше» и МР 3.1.2.0072-1 исходную суспензию микроорганизма для посева готовили в 0,9% растворе натрия хлорида

Таблица 1. Рост *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* на различных питательных средах через 72 ч инкубирования

Питательная среда	Тест-штамм					
	<i>B. pertussis</i> 39	<i>B. pertussis</i> 143	<i>B. pertussis</i> 688	<i>B. pertussis</i> 796	<i>B. parapertussis</i> 386	<i>B. bronchiseptica</i> 9
Бордетелагар	0,2–0,5 мм* 79**	0,4–0,5 мм 60	0,5–0,6 мм 81	0,2–0,5 мм 40	0,6–0,8 мм 41	1,2–1,4 мм 36
Бордетелагар с добавлением 5% крови	0,4–0,5 мм 82	0,5–0,6 мм 59	0,6–0,8 мм 77	0,4–0,5 мм 39	0,8–1,0 мм 38	1,2–1,4 мм 33
Агар Борде-Жангу	0,4–0,5 мм 92	0,5–0,6 мм 64	0,6–0,8 мм 76	0,4–0,5 мм 42	0,8–1,0 мм 36	1,2–1,4 мм 29
Charcoal agar	0,2–0,3 мм 79	точечные еле заметные колонии	0,3–0,4 мм 84	0,2 мм 46	0,4–0,6 мм 44	1,2–1,4 мм 31
Среда № 1	рост отсутствует	рост отсутствует	рост отсутствует	рост отсутствует	0,6–0,8 мм 35	1,6–1,8 мм 26

\*диаметр колоний, мм; \*\*среднее арифметическое количество колоний, выросшее при посеве из условного разведения  $10^{-7}$ .

да по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85 (5 МЕ), что соответствует  $5 \times 10^9$  клеток коклюшно-го микроба в 1 мл суспензии. Из исходной взвеси штамм *B. pertussis* 646 готовили в 0,9% растворе натрия хлорида пять последовательных десятикратных разведений до  $10^{-5}$ , затем последовательно разведения 1:4 и 1:1. Из каждого разведения каплями по 0,1 мл суспензии засеивали на чашки Петри с испытуемыми сериями Бордетелагара [5, 7].

Засеянные чашки Петри инкубировали в течение 24–72 ч при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

### Результаты и обсуждения

Исследование проводили в два этапа. На первом этапе проводили сравнительное изучение биологических показателей качества Бордетелагара и иностранных коммерческих питательных сред для выделения и культивирования *B. pertussis*. На втором этапе проводили межучрежденческие испытания специфической активности четырех серий Бордетелагара на соответствие требованиям МУК 4.2.2316-08, МР 3.1.2.0072-13 и «Инструкции по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше».

В ходе первого этапа исследования испытуемыми средами служили Бордетелагар, Charcoal agar, агар Борде-Жангу. Дополнительно были использованы Бордетелагар с добавлением 5% крови и среда №1 ГРМ.

В связи с высокими питательными потребностями *B. pertussis* рост этого микроорганизма на среде №1 ГРМ полностью отсутствовал. Представители видов *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* менее прихотливы к среде культиви-

рования, поэтому их рост был получен на всех исследованных средах, включая среду №1 ГРМ.

Рост штаммов *B. pertussis* из разведений  $10^{-1}$ – $10^{-3}$  был зарегистрирован через 24 ч инкубирования на чашках Петри на всех исследованных средах в виде сливного роста, который благодаря посеву каплями выглядел на поверхности сред как тонкие сплошные бляшки культуры. Через 48 ч визуальный рост тест-штаммов был замечен на чашках Петри с Бордетелагаром, агаром Борде-Жангу и Бордетелагаром с добавлением 5% крови, засеянных из разведения  $10^{-5}$ , тогда как на Charcoal agar максимальное разведение, из которого обнаруживался рост *B. pertussis*, было  $10^{-4}$ , что свидетельствует о более низкой скорости роста на этой питательной среде. Через 72 ч культивирования визуальный рост был отмечен на всех исследованных средах, засеянных из всех разведений до  $10^{-7}$  включительно. Из разведений  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  штаммы *B. pertussis* вырастали в виде однотипных круглых ровных колоний серовато-белого цвета. Диаметр колоний и их среднее арифметическое количество приведены в таблице 1.

На Бордетелагаре (рис. 1а) использованные в исследовании штаммы *B. pertussis* вырастали в виде колоний диаметром от 0,2 до 0,6 мм и незначительно уступали по размерам колониям, выросшим на агаре Борде Жангу (рис. 1б) и Бордетелагаре с добавлением крови, на которых этот показатель варьировался от 0,4 до 0,8 мм. Наиболее мелкие колонии росли на Charcoal agar – их диаметр не превышал 0,4 мм. Особенно заметно отставание в росте было у штамма *B. pertussis* 143: через 72 ч инкубирования на этой питательной среде он вырастал в виде точечных еле заметных колоний, которые лишь на четвертые сутки культивирования достигали диаметра 0,2–0,4 мм. Количество колоний,

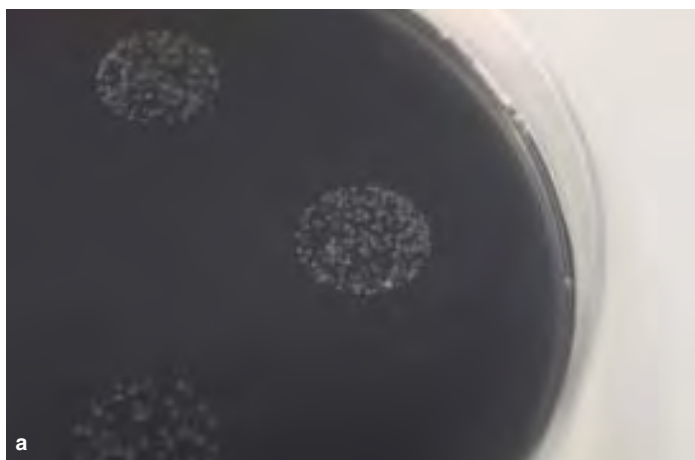


Рис. 1. Рост *B. pertussis* 143 через 72 ч инкубирования на: а – Бордетелагаре; б – агаре Борде-Жангу.

выросшее на каждой из исследованных питательных сред при посеве из разведения  $10^{-7}$ , различалось не значительно, что свидетельствует об одинаковой чувствительности этих сред.

Через 24 ч инкубирования диаметр колоний *B. bronchiseptica* 9 на чашках Петри, засеянных бактериальной суспензией из разведения  $10^{-7}$ , составлял 0,4–0,5 мм. Спустя еще одни сутки колонии этого штамма достигали 1,6–1,8 мм на среде №1 и 1,2–1,4 мм на остальных исследованных средах. Различий в морфологии у штамма *B. bronchiseptica* 9, выросшем на агаре Борде-Жангу, Charcoal agar и среде №1 ГРМ через 48 ч инкубирования, отмечено не было. На этих средах он рос в виде круглых ровных колоний белого цвета, тогда как на Бордетелагаре колонии были кремового цвета, а на Бордетелагаре с добавлением крови – желтовато-коричневого.

Через 24 ч инкубирования визуально рост штамма *B. parapertussis* 386 был заметен на всех исследованных средах, засеянных только из разведений  $10^{-1}$ – $10^{-4}$ . Через 48 ч инкубирования на чашках Петри, засеянных из разведения  $10^{-7}$ , формировались круглые гладкие колонии белого цвета диаметром от 0,3 до 0,6 мм. При этом на чашках Петри с агаром Борде-Жангу, засеянных из разведений  $10^{-1}$ – $10^{-3}$ , в зоне роста культуры происходило почернение среды (рис. 2). Через 72 ч инкубирования почернение среды было заметно на всех чашках Петри с этой средой, а вокруг колоний сформировалась зона  $\beta$ -гемолиза. В то же время на среде №1 ГРМ в зоне роста *B. parapertussis* 386 отмечено изменение цвета среды со светло-желтого на бурый. Цвет самих колоний на агаре Борде-Жангу, Charcoal agar и среде № 1 ГРМ остался без изменений, тогда как на Бордетелагаре и Бордетелагаре с добавлением крови колонии *B. parapertussis* 386 приобретали бурю окраску. Наиболее крупные колонии *B. parapertussis* 386 выросли на агаре Борде-Жангу и Бордетелагаре с добавлением крови, их диаметр составлял 0,8–1,0, а наиболее мелкие, диаметром 0,4–0,6 мм, – на Charcoal agar.

Таким образом, на первом этапе исследования установлено, что по скорости роста и размеру выросших колоний *B. pertussis* Бордетелагар превосходит Charcoal agar и лишь незначительно уступает агару Борде-Жангу. Более крупные колонии на агаре Борде-Жангу обусловлены наличием в этой среде нативной крови. Добавление в Бордетелагар 10% крови нивелирует различия с агаром Борде-Жангу в размерах выросших колоний. В связи с этим для улучшения ростовых свойств Бордетелагара можно рекомендовать



Рис. 2. Почернение среды в зоне роста *B. parapertussis* 386 на агаре Борде-Жангу через 48 ч инкубирования.

добавлять в питательную среду кровь, однако это не является обязательным или необходимым условием для выделения и культивирования *B. pertussis* на Бордетелагаре.

На агаре Борде-Жангу возможна дифференциация *B. pertussis* от *B. parapertussis* по почернению среды и  $\beta$ -гемолизу в зоне роста *B. parapertussis*. На Бордетелагаре через 48–72 ч культивирования колонии различных видов бордетелл различаются по цвету: *B. pertussis* остаются серовато-белого цвета, колонии *B. bronchiseptica* становятся кремового цвета, а колонии *B. parapertussis* приобретают бурый цвет. На питательной среде Charcoal agar отсутствует возможность дифференцировать *B. pertussis* от *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis* по внешнему виду колоний.

В клинической практике для идентификации выделенных культур бордетелл используют ряд тестов, связанных с биохимическими свойствами микроорганизмов, в частности, определяют уреазную, оксидазную, тирозиназную активность, тест на подвижность, восстановление нитратов и утилизацию цитратов. В ГНЦ ПМБ выпускаются питательные среды, предназначенные для постановки биохимических тестов у энтеробактерий, которые были использованы в данной работе. Уреазную активность бордетелл опреде-

Таблица 2. Результаты биохимических тестов для штаммов бордетелл, выросших на Бордетелагаре (подвижность и тирозиназа)

Штамм	Уреазная активность на железо-глюкозо-лактозном агаре с мочевиной	Восстановление нитратов на среде № 7 ГРМ	Утилизация цитратов на среде № 14 ГРМ	Тирозиназная активность на ГРМ-агаре + 0,1 г тирозина	Подвижность в столбике полужидкого агара (ГРМ бульону + 4 г/л агара)	Оксидазная активность
<i>B. pertussis</i> по МР 3.1.2.0072-13	–	–	–	–	–	+
<i>B. pertussis</i> 39	–	–	–	–	–	+
<i>B. pertussis</i> 143	–	–	–	–	–	+
<i>B. pertussis</i> 688	–	–	–	–	–	+
<i>B. pertussis</i> 796	–	–	–	–	–	+
<i>B. parapertussis</i> по МР 3.1.2.0072-13	+	–	–	+	–	–
<i>B. parapertussis</i> 386	+	–	–	+	–	–
<i>B. bronchiseptica</i> по МР 3.1.2.0072-13	+	+	+	–	+	+
<i>B. bronchiseptica</i> 9	+	+	+	–	+	+

ляли с использованием железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной, нитратредуктазную активность – с использованием питательной среды №7 ГРМ, утилизацию (ассимиляцию) цитрата – с использованием питательной среды №14 ГРМ (цитратный агар Симмонса). Тирозиназную активность определяли на ГРМ-агаре с добавлением 0,1 г тирозина.

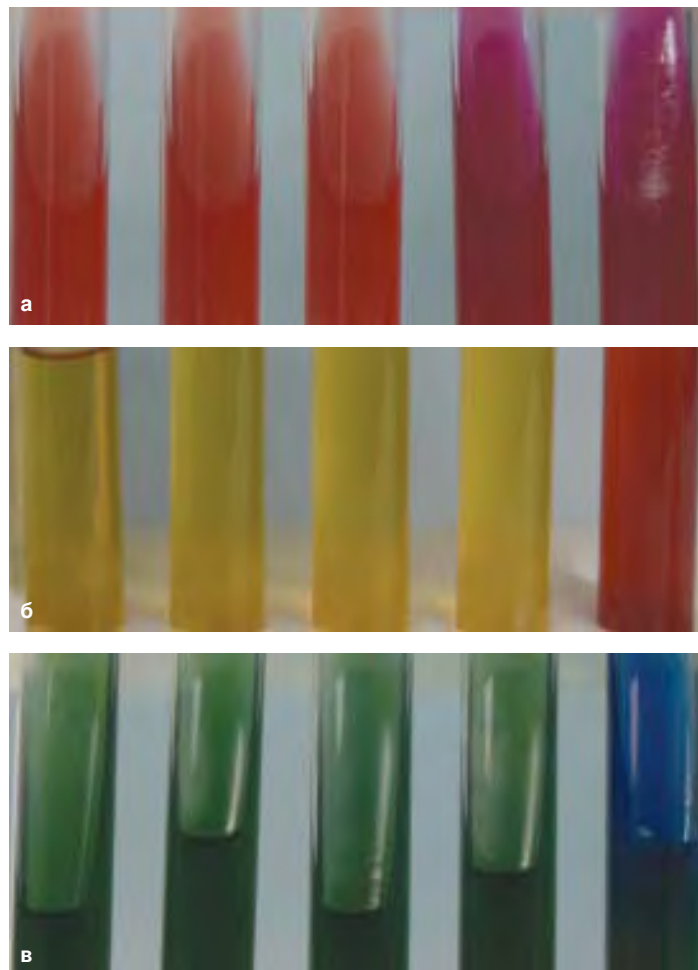


Рис. 3. Биохимические тесты бордетелл: а – определение уреазной активности на железо-глюкозо-лактозном агаре с мочевиной; б – определение нитратредуктазной активности на среде № 7 ГРМ; в – определение утилизации цитрата на среде № 14 ГРМ (цитратный агар Симмонса). Слева направо: контроль (незасеянная питательная среда); далее – засеянные питательные среды *B. pertussis* 39; *B. pertussis* 688; *B. parapertussis* 386 и *B. bronchiseptica* 9.

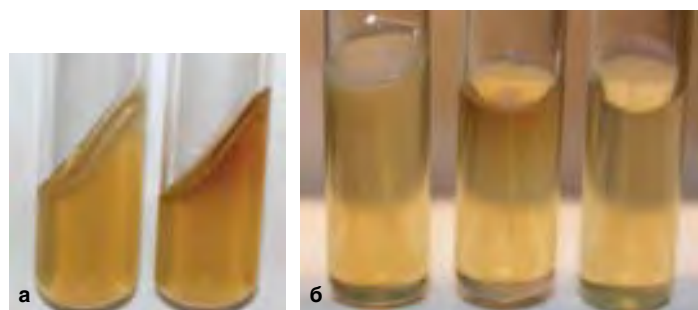


Рис. 4. Определение тирозиназной активности и подвижности бордетелл: а – определение тирозиназной активности (первая пробирка – *B. pertussis* 39 и *B. bronchiseptica* 9; вторая пробирка – *B. parapertussis* 386); б – определение подвижности (слева направо: *B. bronchiseptica* 9, *B. parapertussis* 386 и *B. pertussis* 39).

Подвижность бордетелл определяли в столбике полужидкого агара, приготовленного добавлением к ГРМ бульону 4 г/л агара. В качестве дополнительного теста определяли оксидазную активность. Результаты проведенных тестов представлены в таблице 2.

Полученные результаты полностью соответствуют биохимическим характеристикам бордетелл. Все штаммы *B. pertussis* при положительном оксидазном тесте не обладают уреазной, нитратредуктазной, тирозиназной активностью и способностью утилизировать цитраты (не изменяют цвет соответствующих питательных сред), не подвижны (рис. 3а-в, 4а-б). Штамм *B. parapertussis* 386 продуцирует уреазу, вызывая расщепление мочевины и окрашивая столбик и скошенную часть железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной в ярко-малиновый цвет (рис. 3а); обладает тирозиназной активностью, окрашивая ГРМ-агар с тирозином в коричневый цвет (рис. 4а); не восстанавливает нитраты в нитриты и не изменяет цвет среды №7 при внесении реактива Грисса (рис. 3б); не утилизирует цитраты и не изменяет цвет среды №14 ГРМ (рис. 3в); не подвижен (рис. 4б); не обладает оксидазной активностью. Штамм *B. bronchiseptica* 9, как свойственно бронхисептикозным бактериям, продуцирует оксидазу и уреазу, окрашивая столбик и скошенную часть железо-глюкозо-лактозного агара с мочевиной в ярко-малиновый цвет (рис. 3а), восстанавливает нитраты в нитриты, и появляется красное окрашивание при внесении реактива Грисса в засеянную среду № 7 ГРМ (рис. 3б), утилизирует цитраты и изменяет цвет среды № 14 ГРМ с зеленого на синий (рис. 3 в); не обладает тирозиназной активностью (рис. 4а); обладает подвижностью (рис. 4б).

На втором этапе исследования сотрудниками ФБУН Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского (ФБУН МНИИЭМ) совместно сотрудниками с ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора были проведены межучрежденческие испытания специфической активности четырех серий Бордетелагара.

В действующих в РФ нормативных документах существуют различия в методах контроля качества питательной среды для выделения и культивирования коклюшного микроба. Согласно МУК 4.2.2316-08, предназначенным как для производителей питательных сред, так для лабораторий, использующих питательные среды, при контроле качества среды необходимо использовать только определенные штаммы микроорганизмов: *B. pertussis* 649, *B. pertussis* 79, *B. pertussis* 39, *B. pertussis* 703, *B. pertussis* 688, *B. pertussis* 796 или *B. pertussis* 143. Посев должен производиться из разведений  $10^{-6}$  и  $10^{-6}$ , разведенного в четыре раза. Согласно МР 3.1.2.0072-13 и «Инструкции по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше» перечень тест-штаммов для внутрилабораторного контроля качества питательной среды не регламентируется, а посев производится из восьми разведений, включая исходное. Основное отличие методик заключается в концентрации бактерий в последнем разведении: по требованиям МР 3.1.2.0072-13 их концентрации в два раза выше, чем по требованиям МУК 4.2.2316-08 (табл. 3).

Таблица 3. Схема приготовления разведений тест-штаммов *B. pertussis* при контроле качества питательной среды для выделения и культивирования коклюшного микроба по МР 3.1.2.0072-13 и МУК 4.2.2316-08

№ пробирки	МР 3.1.2.0072-13		МУК 4.2.2316-08	
	Количество микробов в 1 мл	Разведение	Количество микробов в 1 мл	
1	$5 \times 10^9$	Исходное	$1 \times 10^{10}$	
2	$5 \times 10^8$	$10^{-1}$	$1 \times 10^9$	
3	$5 \times 10^7$	$10^{-2}$	$1 \times 10^8$	
4	$5 \times 10^6$	$10^{-3}$	$1 \times 10^7$	
5	$5 \times 10^5$	$10^{-4}$	$1 \times 10^6$	
6	$5 \times 10^4$	$10^{-5}$	$1 \times 10^5$	
7	$1 \times 10^4$	$10^{-6}$	$1 \times 10^4$	
8	$5 \times 10^3$	$10^{-7}$ условное (готовится разведением в 4 раза разведения $10^{-6}$ )	$2,5 \times 10^3$	

Анализ данных, представленных в таблице 3, показывает, что контроль качества производственных серий Бордетелагара в ГНЦ ПМБ (Оболенск), проводимый согласно требованиям МУК 4.2.2316-08, является более строгим.

Результаты испытаний, проведенных в соответствии с МУК 4.2.2316-08 представлены в таблице 4, а в соответствии с МР 3.1.2.0072-1 – в табл. 5.

Все используемые в испытаниях штаммы *B. pertussis* выросли на всех исследованных сериях Бордетелагара в виде выпуклых гладких круглых блестящих серых колоний с ровным краем диаметром от 0,3 до 0,8 мм у штаммов *B. pertussis* 39, *B. pertussis* 143, *B. pertussis* 688 и *B. pertussis* 796 и диаметром от 1,5 до 2,0 мм у штамма *B. pertussis* 646. Отличительной особенностью штамма *B. pertussis* 646 служила его высокая скорость роста: уже через 24 ч инкубирования можно было заметить его рост на всех засеянных чашках Петри.

В результате второго этапа исследований установлено, что время формирования колоний, интенсивность роста и культурально-морфологические свойства *B. pertussis*, выращенных на испытуемых сериях питательной среды для культивирования и выделения коклюшного микроба сухой (Бордетелагар) соответствует МР 3.1.2.0072-13, «Инструкции по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше», а также более жестким требованиям МУК 4.2.2316-08.

Дополнительно под руководством сотрудников ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского проведены исследования шести серий Бордетелагара (с.15, с.16, с.17, с.18, с.19 и

Таблица 4. Рост штаммов *B. pertussis* из разведения  $10^{-7}$  (условно) в соответствии с МУК 4.2.2316-08 на четырех сериях Бордетелагара

Наименование тест-штамма	Серия 12	Серия 13	Серия 14	Серия 15
<i>B. pertussis</i> 39	72 ч 0,3–0,6 мм	72 ч 0,3–0,6 мм	72 ч 0,3–0,6 мм	72 ч 0,3–0,6 мм
<i>B. pertussis</i> 143	72 ч 0,4–0,8 мм	72 ч 0,4–0,8 мм	72 ч 0,4–0,8 мм	72 ч 0,4–0,8 мм
<i>B. pertussis</i> 688	72 ч 0,6–0,8 мм	72 ч 0,6–0,8 мм	72 ч 0,6–0,8 мм	72 ч 0,6–0,8 мм
<i>B. pertussis</i> 796	72 ч 0,4–0,6 мм	72 ч 0,4–0,6 мм	72 ч 0,4–0,6 мм	72 ч 0,4–0,6 мм
<i>B. pertussis</i> 646	48 ч 1,5–2,0 мм	48 ч 1,5–2,0 мм	48 ч 1,5–2,0 мм	48 ч 1,5–2,0 мм

с.21) на четырех региональных практических семинарах по лабораторной диагностике коклюша в различных субъектах РФ (г. Ростов-на-Дону, г. Ставрополь, г. Москва, г. Санкт-Петербург, г. Воронеж, г. Новосибирск, г. Нижний Новгород, г. Ханты-Мансийск, г. Владивосток). Эти испытания показали, что испытуемые серии Бордетелагара обладают хорошими ростовыми свойствами.

### Заключение

Проведенные исследования показали, что Бордетелагар не уступает по скорости роста и чувствительности средам аналогичного назначения иностранного производства. Бордетелагар полностью соответствует требованиям МУК 4.2.2316-08, МР 3.1.2.0072-13, «Инструкции по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше».

*Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.*

### Литература

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад [Электронный ресурс]. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019, 254 с. Режим доступа: [https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-ostoyaniisanitarno\\_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsiiiv-2018-godu.pdf](https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-ostoyaniisanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsiiiv-2018-godu.pdf) (дата обращения 19.07.2019).

Таблица 5. Оценка специфической активности испытуемых серий Бордетелагара в соответствии с МР 3.1.2.0072-1 через 24–72 ч культивирования

Серия питательной среды	Учет результатов	№ пробирки (разведения)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Серия 14	24 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
	48 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
	72 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
Серия 13	24 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
	48 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
	72 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
Серия 12	24 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
	48 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
	72 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
Серия 15	24 ч	++++	++++	++++	++++	++++	Суспензия не впиталась		
	48 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
	72 ч	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++

2. Грачева НМ, Девяткин АВ, Петрова МС, Борисова ОЮ, Скирда ТА, Новикова ЛИ, и др. Коклюш (клиника, диагностика, лечение). Поликлиника. 2016;2-3:13-25.
3. Kendrick P, Eldering G. Cough plate examinations for *B. pertussis*. Am J Public Health Nations Health. 1934 Apr;24(4):309-18. DOI: 10.2105/ajph.24.4.309
4. Mishulow L, Sharpe LS, Cohen LL. Beef-heart charcoal agar for the preparation of pertussis vaccines. Am J Public Health Nations Health. 1953 Nov;43(11):1466-72. DOI: 10.2105/ajph.43.11.1466
5. Диагностика коклюша и паракоклюша: методические рекомендации МР 3.1.2.0072-13: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 24.05.2013. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2013, 56 с.
6. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания МУК 4.2.2316–08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008, 67 с.
7. Инструкция по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше (для бактериологических лабораторий санитарно-эпидемиологических станций и больниц): утверждена начальником Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР 09.09.1983. М.: Министерство здравоохранения; 1983, 36 с.

## References

1. Sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2018: State report [Electronic resource]. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2019, 254 p. Available at: [https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyaniisanitarno\\_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-2018-godu.pdf](https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyaniisanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-2018-godu.pdf) (accessed 19.07.2019). (In Russian).
2. Gracheva NM, Devyatkin AV, Petrova MS, Borisova OYu, Skirda TA, Novikova LI, et al. Koklyush (klinika, diagnostika, lechenie). Poliklinika. 2016;2-3:13-25. (In Russian).
3. Kendrick P, Eldering G. Cough plate examinations for *B. pertussis*. Am J Public Health Nations Health. 1934 Apr;24(4):309-18. DOI: 10.2105/ajph.24.4.309
4. Mishulow L, Sharpe LS, Cohen LL. Beef-heart charcoal agar for the preparation of pertussis vaccines. Am J Public Health Nations Health. 1953 Nov;43(11):1466-72. DOI: 10.2105/ajph.43.11.1466
5. Diagnosis of whooping cough and paracocclush: guidelines MR 3.1.2.0072-13: approved by the Chief state sanitary doctor of the Russian Federation 24.05.2013. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2013, 56 p. (In Russian).
6. Methods of control of bacteriological nutrient media: methodical instructions of МУК 4.2.2316–08. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2008, 67 p. (In Russian).
7. Instructions for bacteriological and serological studies in whooping cough and paracocclush (for bacteriological laboratories of sanitary-epidemiological stations and hospitals): approved by the head of the Main Department of quarantine infections of the Ministry of health of the USSR 09.09.1983. Moscow, 1983, 36 p. (In Russian).

### Информация об авторах:

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: domotenko@obolensk.org

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0020  
E-mail: shepelin@obolensk.org

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0017  
E-mail: khramov@obolensk.org

Борисова Ольга Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора  
Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10  
Телефон: (499) 747-6484  
E-mail: olgaborisova@mail.ru

Пименова Алена Сергеевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора  
Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10  
Телефон: (499) 747-6484  
E-mail: alenaa\_85@mail.ru

Гадуа Натия Торникеевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора  
Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10  
Телефон: (499) 747-6484  
E-mail: 8nati8@mail.ru

### Information about authors:

Lubov V. Domotenko, PhD (Chem), leading researcher of the laboratory of culture media of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: domotenko@obolensk.org

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biology), deputy director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020  
E-mail: shepelin@obolensk.org

Mikhail V. Khramov, MD, PhD, deputy director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0017  
E-mail: khramov@obolensk.org

Olga Yu. Borisova, MD, PhD, DSc, professor, head of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections of G.N.Gabrichesky Research Institute of Epidemiology and Microbiology  
Address: 10 Admiral Makarov str., Moscow, 125212, Russian Federation  
Phone: (499) 747-6484  
E-mail: olgaborisova@mail.ru

Alena S. Pimenova, PhD (Medicine), senior research associate of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections of G.N.Gabrichesky Research Institute of Epidemiology and Microbiology  
Address: 10 Admiral Makarov str., Moscow, 125212, Russian Federation  
Phone: (499) 747-6484  
E-mail: alenaa\_85@mail.ru

Natya T. Gadua, PhD (Medicine), senior research associate of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections of G.N. Gabrichesky Research Institute of Epidemiology and Microbiology  
Address: 10 Admiral Makarov str., Moscow, 125212, Russian Federation  
Phone: (499) 747-6484  
E-mail: 8nati8