

А.Г. Рязанова, Л.Ю. Аксенова, А.А. Зуенко,
Т.М. Гридина, Н.П. Буравцева, Е.И. Ерёменко

Контроль качества экспериментальных серий набора реагентов для бактериологических исследований «Селективная дифференциально-диагностическая среда для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы *Bacillus cereus*»

Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

Резюме. Обосновывается возможность контроля качества экспериментальных серий набора реагентов для бактериологических исследований «Селективная дифференциально-диагностическая среда для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы *Bacillus cereus*». Результаты исследований ростовых свойств селективной среды показали типичную морфологию колоний вирулентных штаммов возбудителя сибирской язвы (*B. anthracis* 81/1, *B. anthracis* 1(CO), *B. anthracis* 1193, *B. anthracis* И-363, *B. anthracis* 1283) и его вакцинных штаммов (*B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* Ихтиман, *B. anthracis* Sterne 34 F₂, *B. anthracis* 55, *B. anthracis* 71/12 – II вакцина Ценковского). Цвет экспериментальных серий селективной среды и агар Хоттингера вокруг колоний возбудителя сибирской язвы оставался неизменным. В то время как цвет селективной среды вокруг колоний близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* приобретал ярко-желтую окраску, что позволяет дифференцировать колонии сибиреязвенного микроба от близкородственных микроорганизмов. Наличие ингибирующих свойств селективной среды подтверждено с использованием гетерологичных культур микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX-19), рост которых отсутствовал во всех сериях испытываемой среды. В то же время на агаре Хоттингера зарегистрирована типичная морфология колоний штаммов данных микроорганизмов.

Ключевые слова: возбудитель сибирской язвы, селективная среда, дифференциально-диагностическая среда, агар Хоттингера, гетерологичные культуры, вирулентные штаммы.

Введение. Сибирская язва как особо опасная инфекция животных и людей продолжает ежегодно регистрироваться на территории Российской Федерации, в странах ближнего и дальнего зарубежья [7]. Возбудитель сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) относится к группе *Bacillus cereus* рода *Bacillus*, включающей, наряду с *B. anthracis*, наиболее близкородственные *B. Cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weichen-stephanensis* и *B. maritimus* [9], от которых, в первую очередь, необходимо дифференцировать *B. anthracis*.

В Российской Федерации для выделения возбудителя сибирской язвы методическими указаниями МУК 4.2.2413-08 [2] регламентировано использование селективной дифференциально-диагностической среды, содержащей в качестве селективных агентов триметоприм и полимиксин М, а также дифференциально-диагностический компонент – 0,01% натрия фенолфталеинфосфат, являющийся субстратом для действия фермента щелочной фосфатазы. Продукция данного фермента определяется по освобождению фенолфталеина, что сопровождается изменением цвета выросших колоний микроорганизмов (окрашивание в розовый цвет). Максимальная ферментатив-

ная активность щелочной фосфатазы проявляется при щелочных значениях pH, что достигается обработкой посевов парами водного аммиака. Данная среда была разработана в Ставропольском противочумном институте Роспотребнадзора [1] и выпускалась на протяжении ряда лет в Научно-производственном объединении «Аллерген» (г. Ставрополь), после чего ее коммерческое производство было прекращено.

В настоящее время в Российской Федерации налажено производство среды «Питательная среда для выделения возбудителя сибирской язвы сухая», в состав которой входит селективная добавка для подавления роста посторонней микрофлоры (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, г. Оболенск). Однако данная среда не включает в себя дифференциально-диагностический компонент, что не позволяет проводить одновременную дифференциацию морфологически схожих колоний представителей группы *Bacillus cereus*.

Всемирной организацией здравоохранения для выделения возбудителя сибирской язвы рекомендована среда PLET [8]. Данная среда не лишена недостатков: достаточно высокая токсичность, об-

условленная наличием в ее составе ацетата таллия, отсутствие роста некоторых штаммов *B. anthracis*, нетипичная морфология выросших колоний сибиреязвенного микроба [10, 11]. Учет результатов проводят через 36–40 ч инкубации посевов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

С целью совершенствования селективной дифференциально-диагностической среды, регламентированной к использованию методическими указаниями МУК 4.2.2413-08 [2], в Ставропольском противочумном институте Роспотребнадзора был сконструирован набор реагентов для бактериологических исследований «Селективная дифференциально-диагностическая среда (далее – селективная среда) для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы *Bacillus cereus*».

Данная плотная питательная среда содержит в качестве основы питательный агар для культивирования микроорганизмов, готовый к применению (агар Хоттингера). В качестве селективных добавок использованы цефтазидим и амфотерицин В. Полиеновый антибиотик амфотерицин В характеризуется высокой антимикотической активностью и подавляет рост грибов. Цефтазидим обладает активностью в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, подавляет рост сопутствующей микрофлоры и не оказывает влияния на рост бацилл группы *Bacillus cereus*.

Дифференциально-диагностическим компонентом в селективной среде является динатриевая соль пара-нитрофенил фосфата (p-NPP). Предлагаемая методика основана на гидролизе щелочной фосфатазой p-NPP с последующим образованием паранитрофенола (p-NP), обладающего ярко-желтым цветом. Использование данной селективной среды не требует дополнительной обработки выросших на ней колоний микроорганизмов парами аммиака для выявления ферментативной активности щелочной фосфатазы, что исключает раздражающее действие паров аммиака на слизистые оболочки глаз и носоглотки персонала, выполняющего исследования; упрощает и ускоряет учет результатов (через 18–24 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$), подтверждая этим преимущество предлагаемого набора реагентов.

Возбудитель сибирской язвы не образует щелочную фосфатазу, поэтому не происходит гидролиз p-NPP до p-NP, и цвет селективной среды вокруг его колоний не изменяется. В то же время спорообразующие сапрофиты группы *Bacillus cereus*, как правило, обладают фосфатазной активностью, в результате чего образуется p-NP, придающий толще селективной среды вокруг колоний желтое окрашивание. С целью дальнейшей идентификации колоний, подозрительных на возбудитель сибирской язвы, отбирают колонии с характерной для *B. anthracis* морфологией, цвет агара вокруг которых не изменился.

Данный набор реагентов предназначен для бактериологических исследований для выделения возбудителя сибирской язвы из биологического материала,

объектов окружающей среды, для дифференциации *B. anthracis* от культур других представителей группы *B. cereus*, а также для исследования материала, содержащего или подозрительного на содержание близкородственных бацилл группы *B. cereus* в клинической и санитарной микробиологии.

Цель исследования. Проведение контроля качества экспериментальных серий набора реагентов для бактериологических исследований «Селективная дифференциально-диагностическая среда для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы *Bacillus cereus*» на их соответствие требованиям разработанной нормативной документации.

Материалы и методы. Проведены испытания трех серий данного набора (серии 1–16, 2–16, 3–16). В состав набора входят четыре компонента:

- питательный агар для культивирования микроорганизмов, готовый к применению (агар Хоттингера), выпускаемый Ставропольским противочумным институтом Роспотребнадзора;
- цефтазидим, выпускаемый Акционерным Курганским обществом медицинских препаратов и изделий «Синтез»м, (г. Курган);
- амфотерицин В, выпускаемый Акционерным Курганским обществом медицинских препаратов и изделий «Синтез»м, (г. Курган);
- динатриевая соль пара-нитрофенилфосфата (p-NPP) производства «Himedia» (Индия).

Селективную среду готовили согласно ее инструкции по применению. Препаратом сравнения служил агар Хоттингера.

Испытания выполнялись с учетом соблюдения требований противоэпидемического режима работы с микроорганизмами II–IV групп патогенности [6–4], методических указаний по лабораторной диагностике сибирской язвы [2], методических указаний по контролю питательных сред по биологическим показателям [3].

Для контроля качества ростовых, дифференциально-диагностических и селективных свойств питательной среды использовали микроорганизмы II–IV групп патогенности: пять вирулентных штаммов (*B. anthracis* 81/1, *B. anthracis* 1(CO), *B. anthracis* 1193, *B. anthracis* И-363, *B. anthracis* 1283) и пять вакцинных штаммов (*B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* Ихтиман, *B. anthracis* Sterne 34 F₂, *B. anthracis* 55, *B. anthracis* 71/12 – II вакцина Ценковского). Для контроля ингибиторов посторонней микрофлоры использовали три штамма гетерологичных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX-19). Дифференцирующие свойства селективной среды определяли с использованием десяти штаммов близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* (*B. cereus* 8, *B. cereus* 96, *B. cereus* 104, *B. cereus* 183, *B. thuringiensis* Ser. 1, *B. thuringiensis* Ser. 5, *B. thuringiensis* Ser. 8, *B. subtilis* PY-313, *B. megaterium* 1, *B. mesentericus* B1-1024). Штаммы получали из лаборатории «Коллек-

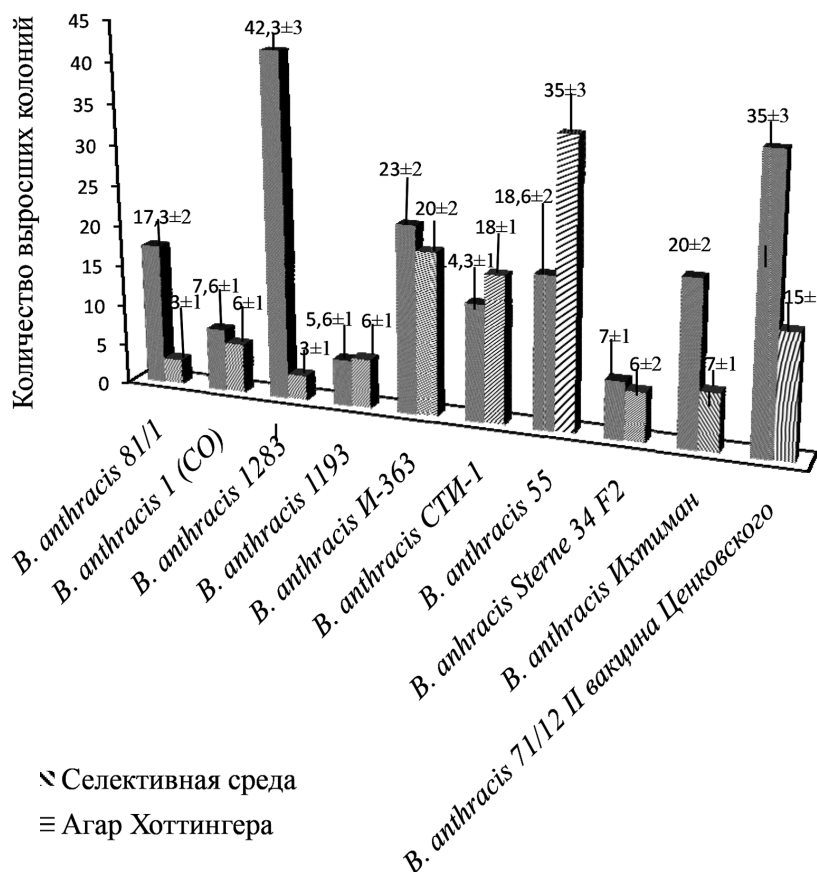


Рис. Рост гомологичных и гетерологичных штаммов микроорганизмов на испытываемой питательной среде

ция патогенных микроорганизмов» Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора.

При исследовании ростовых и дифференциально-диагностических характеристик питательной среды бактериологические посевы инкубировали в течение 18–24 ч при температуре $(37\pm1)^\circ\text{C}$. Критериями ростовых и дифференциально-диагностических параметров испытуемых образцов служили количество, размер, морфология выросших колоний, цвет толщи агара вокруг колоний.

Ингибирующие свойства испытуемых серий селективной среды определяли по их пригодности подавлять рост штаммов гетерологичных микроорганизмов.

Для статистической обработки исследований использовали пакет прикладных программ Microsoft Excel и Statistica 7,0 for Windows.

Результаты и их обсуждение. Анализ данных, полученных при межлабораторных комиссионных испытаниях, показал, что все апробированные серии плотной селективной среды были прозрачными и стерильными. Серия 1–16 имела светло-желтый цвет, серии 2–16 и 3–16 – желтый цвет; pH, соответственно, составил 7,2, 7,2 и 7,3.

Изучение ростовых свойств апробированных серий селективной среды выявило, что колонии как вакцин-

ных, так и вирулентных штаммов сибиреязвенного микроба во всех трех сериях селективной среды и на агаре Хоттингера были серовато-белого цвета. Цвет питательных сред вокруг колоний сибиреязвенного микроба, выросших на трех сериях селективной среды и на агаре Хоттингера, не изменился. Во всех случаях наблюдали морфологию колоний, типичную для штаммов сибиреязвенного микроба: круглые, матовые, шероховатые. Края колоний были с волнистыми отростками, напоминающими локоны волос (R-форма). Диаметр колоний выросших микроорганизмов составлял от 1 до 5 мм в сериях разработанной селективной среды и от 1 до 12 мм – на агаре Хоттингера.

У колоний штаммов близкородственных бацилл диаметр варьировал от 3 до 12 мм. Они имели схожую типичную морфологию: серовато-белый цвет, круглые, матовые, шероховатые, извитые нити по краям (R-форма). При этом цвет селективной среды вокруг колоний близкородственных бацилл приобретал ярко-желтую окраску, за исключением штамма *B. cereus* 96. Селективная среда вокруг его колоний во всех трех сериях была желтого цвета. В то же время цвет агара Хоттингера вокруг колоний близкородственных микроорганизмов оставался серовато-белым.

На всех сериях селективной среды и на агаре Хоттингера отмечен типичный рост колоний как штаммов сибиреязвенного микроба, так и колоний близкород-

ственных бацилл в R-форме, что свидетельствует о сохранении стабильности основных биологических свойств гомологичных и гетерологичных штаммов микроорганизмов на испытуемой питательной среде (рисунок).

Контроль ингибирующих свойств селективной среды показал отсутствие роста взвесей монокультур *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* HX-19 во всех испытуемых сериях питательной среды. На агаре Хоттингера во всех случаях отмечен сплошной рост гетерологичных культур.

В то же время во всех сериях селективной среды наблюдался типичный рост штамма *B. anthracis* СТИ-1 и неизменный цвет питательной среды вокруг его колоний. Колонии штамма *B. cereus* 8 имели типичную морфологию и ярко-желтое окрашивание питательного агара вокруг них. На агаре Хоттингера на фоне сплошного роста гетерологичных микроорганизмов регистрировались единичные колонии штаммов рода *Bacillus*.

При посеве на испытуемую среду микробной смеси, включающей споры взвеси *B. anthracis* СТИ-1 и *B. cereus* 8 концентрацией 100 спор/мл, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* HX-19 концентрацией 100 м.к./мл было отмечено, что колонии бациллярных штаммов имели типичную морфологию. Цвет агара вокруг колоний *B. anthracis* СТИ-1 не изменился. Толща агара вокруг колоний *B. cereus* 8 приобрела ярко-желтое окрашивание. Рост штаммов *S. aureus* 209-P, *E. coli* 11, *P. vulgaris* HX-19 на агаровых пластинах испытуемой среды отсутствовал. На агаре Хоттингера отмечен типичный рост колоний всех тестируемых штаммов.

Заключение. Результаты проведенного контроля качества набора реагентов «Селективная дифференциально-диагностическая среда для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы *Bacillus cereus*» свидетельствуют о том, что все испытуемые серии селективной среды обе-

спечивают селективный рост колоний бациллярных штаммов с типичной морфологией, ингибируя одновременно рост посторонней микрофлоры (*S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*), а также позволяют дифференцировать колонии штаммов возбудителя сибирской язвы от близкородственных сапрофитов рода *Bacillus*. Полученные данные являются основанием для проведения дальнейших испытаний селективной среды с целью ее последующего внедрения в практическое здравоохранение.

Литература

1. Буравцева, Н.П. Селективные дифференциально-диагностические среды для сибиреязвенного микроба / Н.П. Буравцева [и др.] // Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. «Профилактика чумы и других природно-очаговых инфекций». – Ставрополь. – 1983. – Т. 2. – С. 40–42.
2. Методические указания МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». – М., 2008. – 56 с.
3. Методические указания МИ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза». – М., 2006. – 35 с.
4. Рязанова, А.Г. Эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по сибирской язве в 2014 г., прогноз на 2015 г. / А.Г. Рязанова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 1. – С. 26–29.
5. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1248-03 «Условия транспортирования и хранения медицинских иммунологических препаратов». – М., 2003. – 23 с.
6. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». – М., 2008. – 57 с.
7. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности». – М., 2013. – 197 с.
8. Anthrax in humans and animals – 4 th ed. // WHO Press, World Health Organization, 2008. – 208 p.
9. Jung, M.Y. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment / M.Y. Jung [et al.] // The Journal of Microbiology. – 2011. – Vol. 49, № 6. – P. 1027–1032.

A.G. Ryazanova, L.Yu. Aksenova, A.A. Zuenko, T.M. Gridina, N.P. Buravtseva, E.I. Eremenko

Quality control of batches of bacteriological examination kits «Selective differential-diagnostic medium for recovery of *Bacillus anthracis* and closely related bacilli of *Bacillus cereus* group»

Abstract. Possibilities of quality control of experimental series of a set of reagents for bacteriological studies «Selective differential diagnostic environment for the isolation of the causative agent of anthrax and closely related bacilli of the *Bacillus cereus* group» is justified. Findings of the investigation of growth properties of the selective medium showed typical colonial morphology of virulent strains of *Bacillus anthracis* (*B. anthracis* 8I/1, *B. anthracis* 1(CO), *B. anthracis* 1193, *B. anthracis* И-363, *B. anthracis* 1283) and its vaccine strains *B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* Итман, *B. anthracis* Sterne 34 F2, *B. anthracis* 55, *B. anthracis* 71/12 – II Tsenkovsky's vaccine). The colour of the batches of selective medium and Hottinger's agar around the *Bacillus anthracis* colonies was unchanged. Whereas, the colour of selective medium around colonies of closely related saprophytes of genus *Bacillus* discoloured to bright-yellow, allowing to differentiate colonies of anthracic microgerms and closely related microorganisms. Presence of inhibiting properties of the selective medium was confirmed using heterologous germ cultures (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX-19) which showed no growth in all series of the tested medium. Meanwhile, the typical colonial morphology of strains of these microorganisms was observed on Hottinger's agar.

Key words: *Bacillus anthracis*, selective medium, differential-diagnostic medium, Hottinger agar, heterologous culture, virulent strains.

Контактный телефон: 8-918-883-18-55; e-mail: stavnipchi@mail.ru