

# НОВЫЕ МЕТОДЫ И РАЦИОНАЛИЗАТОРСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

УДК 615.873:576.8.093.1(088.8)

## НОВАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОКЛЮША

Н. Н. Амерханова, А. Н. Савинова

Кафедра микробиологии (и. о. зав.—доц. Н. Н. Амерханова)  
Казанского государственного медицинского университета

Плановая вакцинопрофилактика коклюша, проводимая в нашей стране с 1959 г., значительно снизила заболеваемость и смертность от него во многих регионах. Однако с 80-х г. наблюдается рост частоты данного заболевания, что обусловлено в основном накоплением значительного числа непривитых детей [6, 8, 9]. Так, в 1992—1993 гг. заболеваемость в Республике Татарстан составляла соответственно 23,2 и 30,6, в Российской Федерации — 16,2 и 26,5 на 100 тыс. населения. Рост заболеваемости коклюшем регистрируется также во всем мире.

Существенные изменения за годы специфической профилактики произошли и в клинике коклюшной инфекции: участились случаи легких и стертых форм, затрудняющих клиническую диагностику данного заболевания [1, 7]. В связи с этим возросла роль микробиологических методов диагностики, в частности бактериологического. Однако последний мало чувствителен из-за позднего проведения исследований и плохого качества коммерческой питательной среды — казеиново-угольного агаря (КУА).

Основным условием для успешной бактериологической диагностики коклюша является качество питательной среды. Широко используемые питательные среды для выделения бордепелл нестандартны, имеют ряд недостатков и не обеспечивают высокую высеиваемость возбудителя из материала от больных и лиц, контактировавших с ними. Поэтому целью наших исследований являлась разработка новой питательной среды, удовлетворяющей физиологические потребности бордепелла и обеспечивающей наиболее полное удаление ингибиторов роста коклюшных микробов.

Известно, что возбудитель коклюша требует для поддержания роста определенный набор аминокислот: цистеина, пролина, метионина, серина, глутамина, глицина, аланина, никотиновой кислоты, аспарагина, а также наличия в среде различных солей — железистых, магниевых, хлоридов, фосфатов и факторов роста. Исходя из этого, в качестве основы для питательной среды нами была выбрана коммерческая среда № 199 (Паркера), содержащая все необходимые для роста *B. pertussis* аминокислоты, соли и витамины. Кроме того, из данных литературы известно, что на этой среде хорошо растут микробы, требовательные к питательным средам: менингококк и др. [3].

Для подбора оптимального сорбента к плотному варианту питательной среды № 199 с 3—4% агара с pH 7,2—7,4 добавляли различные дозы латекса (от 0,05 до 2%), силикагеля (от 0,05 до 2,5%), крахмала (0,5—1,5 г/л),

активированный уголь в концентрации 3 г/л, как и в среде КУА. Посевы эталонных штаммов коклюшных бактерий №№ 3747, 353, 475, 305 и 251 на питательные среды производили методом «капли». Посевная доза составляла  $5 \times 10^8$  микробных клеток в объеме 0,1 мл. Посевы помещали в термостат при 37°C в условиях повышенной влажности и выдерживали их в течение 5 суток. Результаты регистрировали через 24, 48, 96 и 120 часов. Исследования показали, что на данных вариантах питательной среды коклюшные бактерии не росли.

В следующих сериях опытов для обогащения среды питательными веществами к агарилизованной среде № 199, содержащей уголь или другие сорбенты, добавляли 10% крови кролика, нуклеинат натрия (4 мг/мл и 12 мг/мл), нуклеинат натрия и дрожжевой экстракт (от 0,15% до 0,9%), витамины группы В в качестве факторов роста: рибофлавин в дозах от 0,2 до 1,6 мг и тиамина бромид в тех же дозах. Однако и на этих вариантах питательной среды роста бордепелл не наблюдалось. Было предположено, что отсутствие роста исследуемых культур связано с недостаточным количеством аминного азота в составе среды № 199. Для оптимального роста коклюшных бактерий из данных литературы в питательной среде должно быть 170—180 мг% аминного азота. В связи с этим было определено его содержание в среде № 199. Оно оказалось равным 1,14 мг%. В следующих сериях опытов для повышения содержания аминного азота в составе среды № 199 были использованы гидролизат крови (отходы гамма-глобулинового производства после сепарирования крови и отделения сыворотки или плазмы) и аминопептид, препарат, получаемый путем ферментативного гидролиза белков крови крупного рогатого скота [2]. В качестве сорбента в среду вносили ионообменную смолу АВ-17 [4].

Было приготовлено 3 варианта среды. 1-й вариант содержал в качестве источника аминного азота гидролизат крови, добавляемый в агарилизованную среду № 199 в соотношении 1 : 2; смолу АВ-17 вносили в среду из расчета 1% перед автоклавированием при 0,5 атм в течение 30 минут. Во 2-м варианте в агарилизованную среду № 199, кроме гидролизата крови, добавляли аминопептид (90 мл на 100 мл среды). Сорбентом служила ионообменная смола АВ-17 в том же количестве, что и в первом варианте. 3-й вариант включал те же компоненты, что и 2-й вариант, но в более высокой концентрации: на 100 мл агарилизованной питательной среды № 199 вносили 100 мл гидролизата крови и 100 мл аминопептида и

Таблица 1

Сравнительная характеристика эффективности разработанных питательных сред для выделения *B. pertussis*

Среды	Количество опытов	Среднее количество колоний	
		посевная доза = 1000 м. т.	посевная доза = 500 м. т.
Вариант 1	4	26,00 ± 1,52	14,50 ± 2,52
Вариант 2	4	25,75 ± 1,70	12,50 ± 1,91
Вариант 3	4	33,25 ± 3,30	24,25 ± 2,49
КУАМ	4	9,56 ± 1,29	3,50 ± 0,57
КУАД	4	3,33 ± 0,96	0,33 ± 0,08

Таблица 2

Кратность различий средних величин количества выросших колоний *B. pertussis* на различных питательных средах

Сравниваемые варианты сред	Посевная доза (м. т./0,1 мл)	
	1000	500
КУАД-1	7,8	19,3
КУАД-2	7,7	17,2
КУАД-3	9,9	32,6
КУАМ-1	2,7	4,0
КУАМ-2	2,7	3,4
КУАМ-3	3,5	6,7
КУАМ—КУАД	2,9	4,9

добавляли 2% сорбента. Данная среда отличалась тем, что ее агаризацию производили питательным агаром, содержавшим ферментативный гидролизат кормовых дрожжей и хлорид натрия. Во все три варианта среды для ее затемнения вносили 0,1% активированного угля. Качество новых вариантов питательной среды сравнивали со средами КУАД, выпускавшейся Дагестанским НИИ по производству питательных сред, и КУАМ (МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского), широко используемых в практике здравоохранения (табл. 1, 2).

Разработанные варианты сред существенно превышают по эффективности как КУАД, так и КУАМ. Наибольшей эффективностью обладал 3-й вариант среды, который в 3,5 ( $P < 0,05$ ) и 9,9 раза ( $P < 0,05$ ) соответственно превышал высыпаемость коклюшных бактерий при посевной дозе, равной 1000 микробных тел (м. т.), по сравнению с вариантом среды КУАМ и КУАД и в 6,7 ( $P < 0,05$ ) и 32,6 раза ( $P < 0,05$ ) при посевной дозе в 500 микробных тел.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны три новые высокоэффективные полусинтетические питательные среды для выделения *B. pertussis*.
2. Все вновь разработанные среды превосходят по высыпаемости применяемую в практике здравоохранения среду КУА.
3. Наиболее эффективной питательной средой является 3-й вариант полусинтетической среды.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белогорская Е. Б., Кузнецова Л. А./Ка-занский мед. ж.—1985.—№ 5.—С. 392—394.
2. Зорина Л. М., Рузаль Г. И., Исхакова С. Х. и др. Актуальные вопросы микробиологии, эпидемиологии, иммунологии и инфекционных болезней.—Харьков, 1987.
3. Костюкова Н. Н. и др./Лабор. дело.—1979.—№ 5.—С. 266—269.
4. Лурьев А. А. Сорбенты и хроматографические носители.—М., 1972.
5. Методические указания МЗ СССР по применению физико-химических методов контроля питательных сред.—М., 1973.
6. Сергеев В. П., Дзагуров С. Г./ЖМЭИ.—1984.—№ 7.—С. 29.
7. Самсонова В. С., Шакирова Р. Г., Ма-маева Е. А. и др./ЖМЭИ.—1986.—№ 6.—С. 29—32.
8. Сухорукова Н. Л., Корженкова М. П. и др./ЖМЭИ.—1982.—№ 8.—С. 112—115.
9. Токаревич Т. К., Иванов В. П./ЖМЭИ.—1971.—№ 2.—С. 42.

Поступила 25.04.95.

## NEW NUTRIENT MEDIUM FOR THE ISOLATION OF PERTUSSIS PATHOGENE

N. N. Amerkhanova, A. N. Savinova

## Summary

Three variants of nutrient medium for the isolation of *B. pertussis* are developed, where the commercial medium N 199 (Parker) is the basis. The comparative study of the quality of the developed variants of the nutrient medium and the casein-coal agar medium of Dagestan production and the casein-coal agar medium of Moscow production shows that the new nutrient media do better than the casein-coal agar medium of Dagestan as well as the casein-coal agar medium of Moscow, particularly effective is the 3 variant.