

Возможности набора ДС-ДИФ-КОРИНЕ для идентификации микроорганизмов рода *Corynebacterium*, включая *C. diphtheriae*

Г.А. Сорокина¹, Н.В. Залесских¹, А.П. Обрядина¹, Т.И. Уланова¹,
А.Н. Бурков¹, А.Г. Нехорошева², Л.З.Скала², И.Н. Лукин²

¹ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород;

²ООО «Медроект-3», Москва

Резюме

Набор ДС-ДИФ-КОРИНЕ позволяет идентифицировать 20 видов коринебактерий, включенных в Определитель бактерий Берги (1997 г.) [4], в т. ч. биовары *gravis* и *mitis*, и вариант *belfanti* возбудителя дифтерии, а также определять его токсигенные свойства. Тест-система готова к использованию, в ее составе есть все необходимые компоненты для проведения бактериологического исследования при поиске дифтероидов и диагностике дифтерии. Представленные данные показывают высокую диагностическую эффективность нового набора ДС-ДИФ-КОРИНЕ. Набор ДС-ДИФ-КОРИНЕ имеет государственную регистрацию в Росздравнадзоре от 18.05.2010 г., адаптирован к автоматическому считыванию на спектрофотометре и включен в программы Микроб-Автомат и Микроб-2.

[4]

Введение

ООО « Научно-производственное объединение « Диагности-ческие системы » уже более десяти лет выпускает наборы реагентов для идентификации энтеробактерий (ПБДЭ) и для идентификации стафилококков (ПБДС), в которых осуществляется визуальный учет результатов биохимических реакций. Современные спектрофотометры типа “Multiskan”, “iEMS-Reider” или “Multiskan-Ascent” (фирмы “TERMO-Labsystems”, Финляндия) с вертикальной фотометрией позволяют производить автоматическое считывание биохимических реакций по плотности микробной суспензии как придонно, так и поверхностно растущих микроорганизмов. Так как существующие версии ПБДЭ и ПБДС не могут быть прочитаны автоматически, поэтому при усовершенствовании выпускаемых и конструировании новых наборов был подобран новый носитель для субстратно-индикаторных смесей – плоскодонные полистироловые планшеты для иммуноферментного анализа, которые подходят для автоматического прочтения спектрофотометром. С использованием таких планшетов разработаны наборы нового поколения для идентификации энтеробактерий ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-24, ДС-ДИФ-ЭНТЕРО-12, ДС-ДИФ-САЛЬМОНЕЛЛА, сконструированы наборы для идентификации коринебактерий ДС-ДИФ-КОРИНЕ, для идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий ДС-ДИФ-НЕФЕРМ, а также в качестве дополнительно-

го теста бумажные полоски для определения бактериальной цитохромоксидазы ДС-ОКСИДАЗА.

Цель настоящей работы – оценка набора ДС-ДИФ-КОРИНЕ, предназначенного для биохимической идентификации коринебактерий, включая *C. diphtheriae*, и определения токсигенных свойств возбудителя дифтерии. Дифтерия это острое инфекционное заболевание, вызываемое токсигенными штаммами *C. diphtheriae* [1,2,3,5,6]. Быстрое и точное микробиологическое подтверждение клинического диагноза лежит в основе эпидемиологического надзора за циркуляцией инфекции, особенно на ранних стадиях заболевания. Выявление токсигенности у выделенных штаммов *C. diphtheriae* является самым важным тестом для диагноза дифтерии. Некоторые виды коринебактерий являются естественными патогенами скота или грызунов; некоторые входят в состав нормальной флоры кожи и слизистых человека. Однако в последние десятилетия клиническая роль оппортунистических коринебактерий возросла – их все чаще выделяют как возбудителей воспалительных гнойно-септических и респираторных заболеваний от лиц с вторичными иммунодефицитами, подвергавшихся иммунодепрессивной терапии после тяжелых операций, наркоманов, онкологических и гематологических больных, ВИЧ – инфицированных, престарелых. Устойчивость некоторых видов (*C. jeikeium*, *C. cystitidis*, *C. amycolatum*) к общеприменяющимся антибиотикам (пенициллинам, ами-

[1,2,3,
5,6]

ногликозидам, хинолонам) способствует их распространению как агентов госпитальной инфекции [1].

[1]

Материалы и методы

Стандартные образцы. Отраслевой стандартный образец мутности бактериальных взвесей стеклянный на 10 ЕД (ОСО 42-28-85-06П).

Клинические штаммы. 120 клинических изолятов коринебактерий: *C.diphtheriae gravis* токсигенный – 11 штаммов, *C.diphtheriae gravis* нетоксигенный – 1 штамм, *C.diphtheriae mitis* токсигенный – 1 штамм, *C.diphtheriae mitis* нетоксигенный - 3 штамма, нетоксигенные коринебактерии - 104 штамма.

Референсные штаммы. 6 штаммов из ГКПМ ФГУЗ ГИСК им. Л.А. Тарасевича РФ: *C.diphtheriae gravis* токсигенный № 75, *C.diphtheriae mitis* токсигенный "Сеньков", *C.diphtheriae mitis* нетоксигенный № 203-АГ, *C.ulcerans* № 675, *C.pseudodiphtheriticum (hofmanii)* № 25, *C.xerosis* № 72а.

Тест-системы сравнения. «Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов (СИБ): набор № 5 «Для идентификации коринебактерий дифтерии», набор № 7 «Для определения токсигенности коринебактерий дифтерии» ФГУП "НПО" Микроген" МЗ РФ.

Результаты и обсуждение

Контрольные штаммы коринебактерий хранили при температуре – 20°C в эппендорфах в смеси триптиказосоевого бульона, глицерина и сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС), производства ООО «Биолот» или ФГУП «НПО «Микроген» (80,0 мл + 10,0 мл + 10,0 мл). Для восстановления культур содержимое эппендорфа переносили в питательный бульон с сывороткой КРС (4 мл + 0,4 мл) и инкубировали при температуре (37±0,5)°С в течение 16-20 часов. Затем культуры из бульона высевали на коринебакагар (КБА) или 10% сывороточный агар и инкубировали при температуре (37±0,5)°С в течение 18-24 часов [2,3,5]. Суточную агаровую культуру контрольных штаммов использовали для выявления цистиназы в пробе Пизу, для определения токсигенности в модифицированной пробе Элека и для приготовления микробного инокулята в 0,5% пептонной воде (согласно инструкции на тест-систему ДС-ДИФ-КОРИНЕ).

[2,3,5]

В составе набора ДС-ДИФ-КОРИНЕ среда для определения цистиназы предлагается в готовом полужидком виде в герметично закрытых стеклянных флаконах, высота столбика среды (1,5±0,2) см. Для выявления цистиназы использовали коммерческие среды производства ФГУН ГНЦПМ и ФГУП «НПО «МИКРОГЕН» МЗ РФ, а также собственную среду, приготовленную из отдельных компонентов. Питательную среду готовили согласно «Инструкции по пригото-

лению» с последующей обработкой, позволяющей более длительное хранение готовой среды, т.к. обычно готовая среда может храниться не более 1 месяца при температуре 4°C [2,3,5]. Для постановки пробы Пизу суточную агаровую культуру контрольных штаммов засеивали бактериологической петлей d=2 мм «уколом» в столбик среды для определения цистиназы, инкубацию проводили при температуре (37±0,5)°C в течение 16-24 часов. Положительные результаты начинали формироваться уже через 6-8 часов. Описание внешнего вида среды представлено в таблице 1, результаты работы среды представлены в таблице 2.

Табл.
1, 2

В состав набора ДС-ДИФ-КОРИНЕ входят бумажные диски диаметром 0,6 см, содержащие 5 МЕ/диск антитоксина диагностического дифтерийного. Для приготовления бумажных дисков использовали антитоксин диагностический дифтерийный, очищенный ферментолитом и специфической сорбцией, производства ФГУП «НПО «Микроген». Определение токсигенности штаммов *C.diphtheriae* проводили в модифицированной пробе Элека в чашках Петри с агаровым гелем [3, 6,7,8,9]. Для приготовления чашек использовали коринетоксагар производства ФГУН ГНЦПМ, сыворотку крови КРС ООО «Биолот» или ФГУП «НПО «Микроген», чашки Петри диаметром 9 см готовили согласно Инструкции по приготовлению (17 мл коринетоксагара и 3 мл сыворотки крови КРС). На такой чашке можно разместить до 4-х дис-

[3,6,7,
8,9]

ков с антитоксином и, соответственно, до 20 «бляшек» культур (по 5 «бляшек» вокруг каждого диска, чередуя «бляшки» токсигенного штамма и «бляшки» испытуемого штамма). Постановку пробы проводили согласно инструкции по применению набора реагентов ДС-ДИФ-КОРИНЕ, т.е. бактериологической петлей $d=2$ мм суточную агаровую культуру размещали «бляшками» на расстоянии 0,6-0,7 см от края диска с антитоксином, диаметр «бляшки» - 0,7 см, инкубацию чашек проводили при температуре $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ в течение 16-24-48 ч. Линии иммунопреципитации между диском с антитоксином и токсигенным штаммом были различимы уже через 18 часов инкубации, через 24 часа хорошо сформированы, а через 48 часов соединены друг с другом при расположении токсигенных штаммов рядом. Для сравнения использовали набор СИБ № 7 «Для определения токсигенности коринебактерий дифтерии» ФГУП "НПО" Микроген" МЗ РФ и методику определения токсигенности штаммов *C.diphtheriae* с лабораторным изготовлением бумажных полосок с дифтерийным антитоксином. Получено 100% совпадение результатов.

Кроме отечественных питательных сред для определения токсигенности в модифицированной пробе Элека использовали Columbia agar, Fluka; Bovine Serum Adult, Sigma; Newborn Calf Serum, Sigma. Из различных комбинаций (агар + сыворотка) выбраны оптимальные для чашек Петри диаметром 9 см (15 мл + 4 мл) и для чашек Петри диа-

[7]

метром 4 см (2,5 мл + 0,7 мл) [7]. Размещение дисков и «бляшек» культур на больших чашках аналогично сказанному выше, на маленьких чашках можно разместить 1 диск и 5 «бляшек» культур вокруг него. Результаты работы дисков с дифтерийным антитоксином (после приготовления и в процессе хранения) на отечественном коринетоксагаре и колумбийском агаре представлены в таблице 3.

Табл. 3

Полученные данные показывают идентичность результатов определения токсигенности *C.diphtheriae* при использовании отечественного коринетоксагара и колумбийского агара и могут применяться в рутинной лабораторной практике.

Сухие субстратно-индикаторные среды для определения утилизации глюкозы, сахарозы, крахмала, мальтозы, фруктозы, галактозы, редукции нитратов и разложения мочевины расположены в лунках стрипов планшета для иммуноферментного анализа. В составе набора стерильная 0,5% пептонная вода рН 7,4-7,6, стерильное вазелиновое масло и раствор реактива Грисса (для теста «редукция нитратов»). Из суточной агаровой культуры штаммов коринебактерий готовили микробную взвесь в 0,5% пептонной воде плотностью 10 ЕД ОСО 42-28-85-06 П или 3 степени по шкале McFarland. По 0,15 мл микробного инокулята одного штамма вносили в 8 лунок одного вертикального стрипа, для создания анаэробных условий в тесте с мочевиной вносили 0,05 мл вазелинового масла. Планшет, накрытый крышкой и поме-

щенный в полиэтиленовый пакет, инкубировали при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С от 16 до 24 ч. По окончании инкубации вносили 0,05-0,1 мл раствора реактива Грисса в тест с нитратами и проводили учет результатов (либо визуально, либо автоматически на спектрофотометре).

Для сравнения работы биохимических тестов использовали СИБ набор № 5 «Для идентификации коринебактерий дифтерии», который содержит бумажные диски с глюкозой, сахарозой, крахмалом и мочевиной. В аналогичных тестах тест-системы ДС-ДИФ-КОРИНЕ получено 100% совпадение с результатами работы СИБ и с классическими пробирочными средами.

Для интерпретации полученных результатов при визуальном учете в составе набора ДС-ДИФ-КОРИНЕ есть таблица биохимических свойств коринебактерий, каталог кодов, «ключ». Данные вспомогательные пособия упрощают процедуру идентификации исследуемых культур коринебактерий. Набор дополнен флаконом-капельницей для внесения реактива Грисса, крышкой-капельницей для внесения вазелинового масла, цветным указателем.

Из клинических изолятов 109 (90,8%) штаммов были идентифицированы правильно, включая *C.diphtheriae mitis* и *C.diphtheriae gravis* токсигенные и нетоксигенные, 5 (4,17%) штаммов не были идентифи-

цированы, 6 (5%) штаммов имели сомнительную идентификацию. Все контрольные штаммы (100%) были идентифицированы правильно.

Набор ДС-ДИФ-КОРИНЕ в 2009 прошел испытания в ФГУЗ ГИСК им. Л.А. Тарасевича РФ и получил в Росздравнадзоре от 18.05.2010 г. РУ №ФСР 2010/07815.

Для автоматизированного учета планшеты набора адаптированы к планшетному фотометру «iEMS-Reader» с вертикальной фотометрией. Адаптация планшетов к спектрофотометру проводилась силами специалистов ООО «Медпроект-3» (г. Москва) и методического центра по обучению и внедрению программы «Микроб-автомат» и «Система микробиологического мониторинга «МИКРОБ» (СМММ) на базе бактериологической лаборатории ГУЗ «Городская клиническая больница №15 им. О.М. Филатова», г. Москва (микробиолог, к.м.н. А.Г. Нехорошева; химиотерапевт, к.м.н. Л. З. Скала и программист И.Н. Лукин). Набор получил рекомендацию для использования при идентификации коринебактерий в рамках программ «Микроб-автомат» и «Микроб-2».

Выводы

1. Представленные данные показывают высокую диагностическую эффективность нового набора ДС-ДИФ-КОРИНЕ. Срок годности набора ДС-ДИФ-КОРИНЕ – 12 месяцев. Комплекс тестов, включенный в набор ДС-ДИФ-КОРИНЕ, позволяет идентифицировать до вида практи-

чески все коринебактерии, описанные в Определителе бактерий Берги (1997 г.).

2. Модификация среды для определения цистиназы в пробе Пизу позволяет использовать ее на протяжении всего срока годности набора.

3. Бумажные диски с дифтерийным антитоксином для модифицированной пробы Элека сохраняют специфическую активность на протяжении длительного срока хранения (более 12 месяцев).

4. Получены идентичные результаты определения токсигенности *C. diphtheriae* при использовании отечественного коринетоксагара и колумбийского агара.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Костюкова Н.Н. Возбудитель дифтерии и условно-патогенные коринебактерии. // Клин. лаб. диагн.- М.: 2001.-№6 – С.25-31
2. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: Руководство.-М. : Информ.-издат. центр Госкомсанэпиднадзора, 1995.- 76с.
3. Мазурова И.К., Мельников В.Г., Комбарова С.Ю., Борисова О.Ю., Жилина Н.Я. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции. Методические указания МУ 4.2.698-98 (Утв. МЗ РФ 09.01.98).- М., 1998, 47 с.
4. Определитель бактерий Берги.- М.: Мир, 1997.- Т.1-2
5. Приказ №450 МЗ СССР от 02.04.1986 г. «О мерах по предупреждению заболеваемости дифтерией»
6. Babych E.M., Ryzhkova T.A., Kalinichenko S.V., Sklyar N.I. /General characteristic of the methods for detection of diphtheria toxin // Annals of Mechnikov Institute, 2008, N 4, p. 19-21
7. Engler K.H., Glushkevich T., Masurova I. K., George R.C., Efstratiou A. /A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory // J. Clin. Microbiol.,1997, Feb; Vol. 35, N 2 – p. 495-498.
8. Engler K.H., Koslov R. S., Copping S. J. / International external quality assessment scheme for the laboratory diagnosis of diphtheria // J. Med. Microbiol., 2001, Vol. 50, p. 1006-1012
9. Schubert J.H., Bickham S.T., Wiggins G. L. / Tissue culture method for toxigenicity testing of *Corynebacterium diphtheriae* // Appl. Microbiol., 1968, Nov; Vol. 16, N 11- p. 1748-1752

Таблица 1.

Определение цистиназы в пробе Пизу

Внешний вид среды во флаконе	Положительная проба Пизу	Отрицательная проба Пизу
Желеобразная масса светло-желтого цвета с небольшим белым осадком на дне. Допустимо образование небольшого количества конденсата.	Черный след по ходу «укола» и темно-коричневое облако вокруг него в виде воронки или диффузное.	Светлый след от «укола» с отдельными темными точками без облака.

Таблица 2.

Результаты сравнения работы готовой среды для определения цистиназы в пробе Пизу
(через 16-24 часа инкубации)

Штаммы коринебактерий		<i>C.diphtheriae</i> <i>gravis</i> токсигенный № 75	<i>C.diphtheriae</i> <i>mitis</i> токсигенный «Сеньков»	<i>C.ulcerans</i> № 675	<i>C.pseudo</i> <i>diphtheriticum</i> (<i>hofmanii</i>) № 25	<i>C.xerosis</i> № 72a
Питательная среда						
Среда для определения цистиназы в пробе Пизу сухая, ФГУН ГНЦПМ	После приготовления	+	+	+	-	-
	Хранение 10 суток (+20-24)°С	+	+	+	-	-
	Хранение 1г 3мес (+4-8)°С	+	+	+	-	-
Питательная среда для идентификации коринебактерий по тесту расщепления цистина сухая, ФГУП «НПО «МИКРОГЕН» МЗ РФ	После приготовления	+	+	+	-	-
	Хранение 10 суток (+20-24)°С	+	+	+	-	-
	Хранение 1г 3 мес (+4-8)°С	+	+	+	-	-
Среда для определения цистиназы в пробе Пизу производства ООО «НПО ДС»	После приготовления	+	+	+	-	-
	Хранение 10 суток (+20-24)°С	+	+	+	-	-
	Хранение 1г 3мес (+4-8)°С	+	+	+	-	-

Таблица 3.

Результаты сравнения работы дисков с дифтерийным антитоксином в модифицированной пробе Элека на разных агаровых средах

Питательная среда	Штаммы	<i>C.diphtheriae</i> <i>gravis</i> токсигенный № 75	<i>C.diphtheriae</i> <i>mitis</i> токсигенный «Сеньков»	<i>C.ulcerans</i> № 675	<i>C.diphtheriae</i> <i>mitis</i> нетоксигенный 203 АГ
	Диски с антитоксином дифтерийным				
Коринетоксагар ФГУН ГНЦПМ, сывор. КРС Биолот; чашка Петри d=9 см (17 мл + 3 мл)	После приготовления	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
	Хранение 4г (+4-8) °С	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
	СИБ набор № 7 «Для определения токсигенности коринебактерий дифтерии» ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
Colombia agar, Bovine Serum, Adult ; чашка Петри d=9 см (15 мл + 4 мл)	После приготовления	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
	Хранение 4г (+4-8) °С	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
Colombia agar, Bovine Serum, Adult; чашка Петри d=4 см (2,5 мл + 0,7 мл)	После приготовления	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
	Хранение 4г (+4-8) °С	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
Colombia agar, Newborn Calf Serum; чашка Петри d=9 см (15 мл + 4 мл)	После приготовления	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
	Хранение 4г (+4-8) °С	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
Colombia agar, Newborn Calf Serum; чашка Петри d=4 см (2,5 мл + 0,7 мл)	После приготовления	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -
	Хранение 4г (+4-8) °С	Токс +	Токс +	Токс -	Токс -

Статья опубликована в журнале «Клиническая лабораторная диагностика» №7 – 2012, С.50-53