

ПРОБЛЕМИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Лабораторна діагностика часто значно полегшує встановлення діагнозу та етіології інфекційного патологічного процесу в організмі тварин, а отже, збільшує шанси на сприятливий перебіг корекції патології. В ході дослідження ідентифікація невідомого мікроорганізму займає важливе місце. При цьому лімітуючим фактором залишається виділення чистої культури ймовірно патогенного мікроорганізму (мікроорганізмів) з консорціуму автохтонної мікрофлори. Представлено аналіз складу та особливостей диференційно-діагностичних середовищ, придатних для експрес-виділення ентеробактерій із мікробних асоціацій тварин. Увага зосереджена на селективному середовищі – агар Мак-Конкі.

Ключові слова: мікробіологічна ідентифікація, лабораторна діагностика, чиста культура, диференційно-діагностичні середовища, агар Мак-Конкі.

Постановка проблеми

У сучасній лабораторній практиці виявлення систематичного положення (ідентифікація) збудника хвороби здійснюється в декілька етапів. Так, на перших стадіях роботи з бактеріальним матеріалом виділяють чисту культуру мікроорганізму, вивчають його базові морфологічні та біохімічні ознаки, відносять до певного роду. Надалі, для встановлення видової належності мікроба, обирають 11–30 фізіологічних ознак, які легко визначаються за допомогою напівавтоматичних та автоматичних тест-систем. Поява технологій для експрес-ідентифікації за допомогою сучасних приладів не відміняє можливості проведення подібних робіт в «ручному» режимі. Але необхідно зазначити, що лімітуючим етапом кожної ідентифікації є саме стадія виділення чистої культури збудника (збудників). Тому для спеціаліста лабораторії під час виявлення мікроорганізмів, домінуючих в клінічному чи патологічному матеріалі, послідовність використання живильних середовищ різних типів є актуальним питанням.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Запропонована американськими дослідниками схема родової ідентифікації патогенних або умовно-патогенних прокариот полягає в послідовному проведенні мікроскопічних та біохімічних досліджень (рис. 1). Зазначена стратегія дозволяє класифікувати бактерії 17 родів – кулясті, неспороутворюючі паличковидні та

бацили [8, 9]. Але така метода не дозволяє швидко визначити такі важливі для ветеринарного спеціаліста патогени як бактерії родів *Brucella*, *Enterococcus*, *Pasteurella*, *Hemophilus*, *Yersinia*, *Listeria*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Edwardsiella*, *Leptospira*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* та актиноміцети.

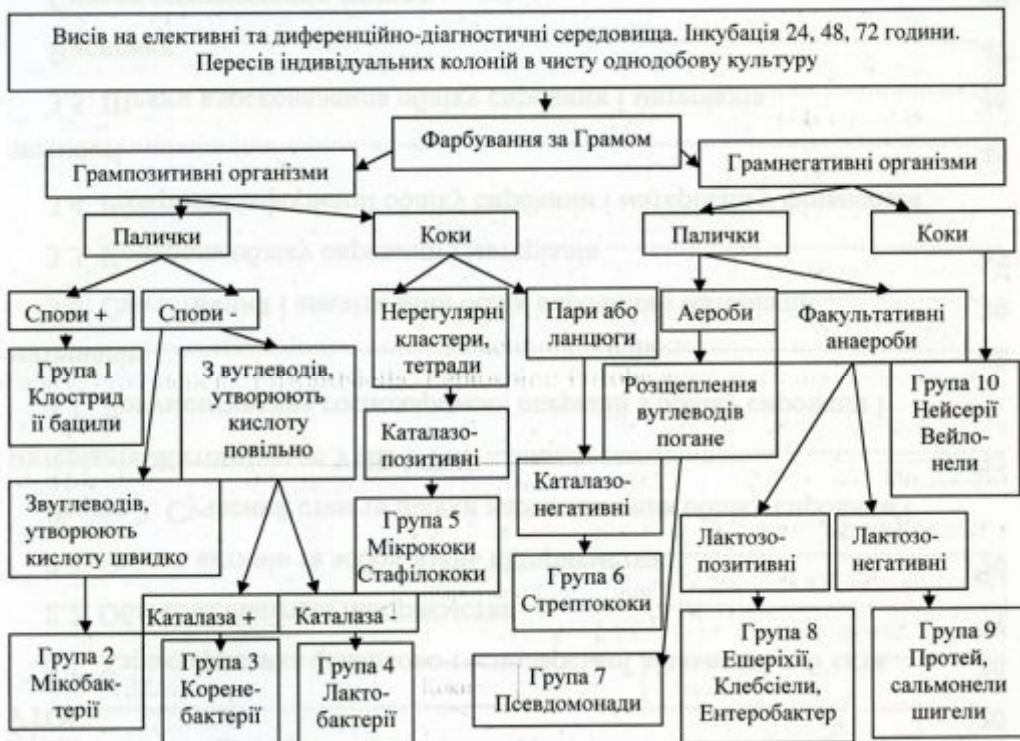


Рис. 1. Схема родової ідентифікації мікроорганізмів

Перед початком будь-якої лабораторної процедури, для визначення переліку можливих збудників, співробітник лабораторії аналізує клінічні прояви хвороби. Загальновідомо, що шкірні ураження можуть бути викликані мікроорганізмами роду *Staphylococcus* та *Streptococcus*, актиноміцетами та мікроскопічними грибами. Причинами запальних неспецифічних процесів сечостатевої системи можуть бути бактерії родини *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Gaerdanella* тощо. Але напрямки дизбіотичних змін у тварин і людини при аналізі пластичності мікробних асоціацій, науковцями досі не систематизовані. Тому будь-яка ідентифікація пов'язана з обробкою великого масиву теоретичної інформації за літературними джерелами, та копіткою, методично виваженою експериментальною роботою [5, 7].

Мета, завдання та методика досліджень

Об'єктами дослідження являються умовно патогенні резидентні мікроорганізми мікробних консорціумів організму тварин.

Видова ідентифікація за наявності чистої культури найчастіше спирається на тести, що характеризують здатність мікробів до перетравлення вуглеводів та їх похідних (сахарози і глюкози, рамнози і арабінози, целобіози і ксилози, ескуліну, малонату і цитрату, маніту, дульцитолу та сорбітолу), до виділення певних ферментів (аргініндігідролази, уреази, β -D-галактозидази, орнітин- та лізіндекарбоксилази), до утворення індолу та сірководню. Додатково визначають можливість утворення мікроорганізмами таких метаболітів як цитохромоксидаза, триптофандезаміназа та ацетоїн.

Результати досліджень

У сучасних лабораторіях докладне вивчення цукролітичних, протеолітичних та ферментативних властивостей мікробів проводиться за допомогою аналізаторів, безумовними перевагами яких є технологічність, можливість стандартизації результатів, економічність при виконанні великої кількості аналізів, а суттєвими недоліками – висока вартість приладів та витратних матеріалів [4,10]. Українські науковці не завжди мають фінансові можливості для закупівлі дорогих аналізаторів чи регулярного поновлення діагностичних тест-наборів. Ще одною проблемою є складність роботи з облігатними анаеробами, які в значній кількості наявні у мікробних асоціаціях шлунково-кишкового та уrogenітального тракту. Тому під час аналізу патологій в зазначених системах органів мікробіологи намагаються корелювати розвиток «негативних» процесів із кількістю, біологічною активністю та видовим складом факультативних анаеробів.

Відомо, що в певних випадках саме їх надмірний розвиток і є причиною виникнення дисбіозів шлунково-кишкового тракту та статевої системи. Так, в нормі, 1 г вагінального слизу містить 10^9 анаеробних мікроорганізмів, метаболіти яких знижують кислотність середовища до 4,0 і обмежують розвиток факультативних анаеробів. Через це у фізіологічно здорових тварин із вагінального слизу виділяють лише поодинокі клітини аеробів та мікроаерофілів. Збільшення їх кількості, отримане в накопичувальних культурах, з високою імовірністю говорить про серйозні зрушення в складі мікробних асоціацій [1, 3, 5].

Роботу з факультативними анаеробами – маркерами дисбіозів, які переважно належать до умовно-патогенних резидентних мікробів, цілком доступно проводити, використовуючи стандартизовані елективні, диференційно-діагностичні середовища. Ще 30 років тому, коли ідентифікація проводилася із застосуванням лише чашок Петрі та пробірок, для первинного виділення ентеробактерій провідні лабораторії США використовували 27 поживних середовищ: 21 агарове та 6 рідких (78 % та 22 % відповідно). Для первинного

виділення факультативних анаеробів із статевої системи людини американські дослідники використовували шоколадний, кров'яний, дезоксихолат-лактозний, телуритний агари [9]. Такий набір твердих середовищ дає можливість виділити колонії стафілококів, стрептококів, нейссерій, псевдомонад, протей, гемофільних паличок і дріжджів – збудників кандидозу.

Остаточна ідентифікація ентеробактерій здійснювалася за допомогою тестів «строкатого ряду», для якого застосовували бульйони та напіврідкі середовища [11]. При цьому використання твердих середовищ залишалося достатньо високим і на цьому етапі роботи. Залежно від підгрупи (коліформи, ентерококи, мікроби групи сальмонел) агарові поживні середовища використовувалися в 29–50% аналізів.

Кількість специфічних агарових середовищ, за рахунок модифікацій їх складу багатьма закордонними та вітчизняними фірмами, з кожним роком зростає [2, 6, 11]. Наприклад, агар Мак-Конкі – одне з перших селективних середовищ для культивування коліформних бактерій та сальмонел – зараз існує в 12-ти модифікаціях. Базова рецептура середовища включає пептичні переварені тваринні білки, лактозу, натрію хлорид, солі жовчних кислот, барвник нейтральний червоний.

У модифікованих варіантах середовища лактоза замінюється на інозид або сорбіт, до нейтрального червоного додається кристалічний фіолетовий, або зазначені два барвника замінюються бромтимоловим синім. Концентрація компонентів також може зазнавати змін: кількість нейтрального червоного варіює від 0,003 до 0,075 г/л; солей жовчних кислот – від 1,5 до 5; переварені тваринні тканини замінюються на желатину з гідролізатом казеїну. Кількість агару коливається в межах 12–15 г/л, а кислотність середовища найчастіше коливається в інтервалі $7,1 \pm 0,2$, і лише в окремих варіантах сягає 7,4–7,6.

Комбінації компонентів дозволяють поділити агари Мак-Конкі на 6 груп:

- агари з нейтральним червоним (№ 1);
- агари зі збільшеною кількістю нейтрального червоного та жовчних солей (№ 2);
- агари з двома барвниками та значним вмістом желатини (№ 3);
- агари з двома барвниками та заміною лактози інозитом або сорбітом (№ 4–5);
- агар з бромтимоловим синім (№ 6).

Із варіацією складових змінюється і селективність середовища, тому заміна компонентів дозволяє принципово змінити перелік виділених мікробів (табл. 1).

Таблиця 1. Рости характеристики бактерій на агарих Мак-Конкі

Група агарів Мак-Конкі	Змінний компонент	Роди мікроорганізмів та культуральні ознаки
№ 1 (M008, M008B)	нейтральний червоний 0,003 г/л + жовчні солі 1,5 г/л	Enterobacter, Esherichia – рожеві або червоні колонії; Enterococcus – блідо-рожеві або червоні колонії; Proteus, Salmonella та Shigella – безбарвні колонії
№ 2 (M008A, M082, M082A)	нейтральний червоний 0.004 -0,075 г/л+ жовчні солі 5 г/л	Enterobacter – рожеві або червоні колонії; Esherichia – рожеві або червоні колонії з преципітатом жовчних солей; Enterococcus та Staphilococcus– блідо-рожеві або червоні колонії; Proteus, Salmonella та Shigella – безбарвні колонії
№ 3 (M081, M081B)	нейтральний червоний 0,003 г/л + кристалвіолет 0,001 г/л + желатина 17 г/л	Enterobacter – рожеві або червоні колонії; Esherichia – рожеві або червоні колонії з преципітатом жовчних солей; Enterococcus – безбарвні або рожеві колонії; Proteus, Salmonella та Shigella – безбарвні колонії
№ 4 (M298)	нейтральний червоний 0,003 г/л + кристалвіолет 0,001 г/л + сорбіт 10 г/л	геморагічні Esherichia – безбарвні колонії; Salmonella, Shigella – безбарвні колонії; звичайні Esherichia – блідо-рожеві або червоні колонії
№ 5 (M051)	нейтральний червоний 0,03 г/л + кристалвіолет 0,001 г/л + інозит 10г/л	тільки Klebsiella – рожеві колонії
№ 6 (M061)	бромтимоловий синій 0,03г/л + жовчні солі 1,5 г/л	Enterobacter та Esherichia – жовті колонії; Proteus, Salmonella та Shigella – безкольорові або світло-блакитні колонії

Використання двох чи трьох варіантів таких агарів дозволяє без перешкод ідентифікувати паличковидні та кулясті мікроорганізми 8 родів. Схожість культуральних ознак у бактерій родів Salmonella, Shigella та геморагічних Esherichia (безбарвні), Enterobacter, Enterococcus та Staphilococcus (блідо-рожеві) вимагає введення до схеми інших типів диференційно-діагностичних середовищ. Ними можуть бути елективні сольові агари для кокових мікробів або вісмут-сульфідний агар для продуцентів сірководню [6, 11].

Висновки та перспективи подальших досліджень

Максимальну кількість ізолятів ентеробактерій із мікробного матеріалу можна отримати, використовуючи різні модифікації агару Мак-Конкі. Родову ідентифікацію ізолятів можна провести після додаткового висіву колоній на інші

елективні диференційно-діагностичні середовища, кількість яких залежить від мікробного пейзажу отриманих накопичувальних культур.

Запропонована в роботі схема буде використана для ідентифікації факультативно-анаеробних бактерій, виділених із різних видів мікробного матеріалу: змиви із статевої системи корів в нормі та за розвитку ендометриту, змиви із статевої системи кобил української верхової породи за інтенсивного розвитку в останніх факультативно-анаеробних мікроорганізмів.

Література

1. Автоматичні системи ідентифікації бактерій: Медичні статті [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://i-medic.com.ua>.
 2. Висмут-сульфит агар (агар Вильсона-Блера) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.algimed.ru>.
 3. Нюансы микробоценоза половых органов [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://med.uni.com/Microbiologi/rep/123/17-34.html>.
 4. Обладнання для клінічної лабораторії: лабораторія Леонардо [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://lab-leonardo.com>.
 5. Определитель бактерий Берджи: справочное издание: в 2-х т. / [под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др.]. – 9-ое изд. – М. : Мир, 1997. – т. 1. – 800 с.
 6. Сухие микробиологические питательные среды и их основы [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.himedialabs.ru>.
 7. BBL Manual of Products and Laboratory Procedures / [editor Paul A. Rounde]. – Cockeysville, Maryland: BBL Division of Becton, Dickinson and Company, 1968. – 211 p.
 8. Clinical veterinary microbiology / P. J. Quinn, M. E. Carter, B. Markey, G. R. Carter – Edinburgh: Mosby, 2004. – 648 p.
 9. Dwight C. Hirsh. Veterinary microbiology / Dwight C. Hirsh, Yuan Chung Zee. – Blackwell Science, 1999. – 479 p.
 10. Equine Infectious Diseases / Alan J. Guthrie, Joanne Hardy, Christiane Herden [et al.]; edited by Debra C. Sellon, Maureen T. Long. – St. Louis: Elsevier, 2007. – 653 p.
 11. Ronald M. Handbook of microbiological media Atlas / M. Ronald. – 3rd ed. – London; New York; Washington: CRC PRESS, 2004. – 2051 p.
-
-