УДК: 616:579.61-61:001.89 (616-07:061.62)

Н.М. Поліщук[1] , А.І. Севальнєв[1], Ю.М. Волжин[1], Н.Я. Коврига[1], І.Ю. Кучма[2]

ЖИВИЛЬНЕ СЕЛЕКТИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ЗБУДНИКІВ ІЄРСИНІОЗІВ

[1]Запорізька обласна санітарно-епідеміологічна станція,

[2]Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України

Ключові слова: *живильне середовище, ієрсинії, диференційні властивості, селективні властивості.*

Ключевые слова: *питательная среда, иерсинии, дифференциальные свойства, селективные свойства.*

Key words: *nutrient medium, Yersinia, differential properties, selective properties.*

Наведено результати розробки живильного середовища, що дозволяє значно підвищити ефективність виявлення збудника ієрсиніозів з різних видів досліджуваного матеріалу. Експериментальним шляхом дібрано 3 варіанти середовища, які можна використовувати при виявленні ієрсиній, адже вони сприятимуть отриманню бажаного результату протягом дослідів. Доведено, що нове живильне середовище для виділення ієрсиній за чутливістю, ростовими та диференційними якостями має суттєві переваги перед звичайним середовищем Ендо, традиційно використовуваним у лабораторній практиці.

Представлены результаты разработки питательной среды, которая позволяет значительно повысить эффективность выявления возбудителей иерсиниозов из разных видов исследуемого материала. Экспериментальным путем подобраны 3 варианта среды, которые могут использоваться при выявлении иерсиний и будут способствовать получению желаемого результата в ходе опытов. Доказано, что новая питательная среда для выделения иерсиний по чувствительности, ростовым и дифференциальным качествам имеет существенные преимущества перед обычной средой Эндо, которая традиционно используется в лабораторной практике.

The results of development of nutrient medium which allows considerably to promote efficiency of exposure of exciters of Yersinioziss from different types of probed material are given in the article. In experimental way 3 variants of medium are chosen which can be used for the exposure of Yersinia and will forward the receiving of the desired result during experiments. It is proved that new nutrient medium for the selection of Yersinia has substantial advantages as for sensitiveness, growning-up and differential qualities as compared with the ordinary medium of Endo, which is traditionally used in laboratory practice.

Важливим етапом лабораторної діагностики кишкового ієрсиніозу є отримання чистої культури збудника, однак існуючі методи детекції ієрсиній мають доволі низький рівень чутливості. Тому питання створення чутливого середовища для швидкого виділення ієрсиній з досліджуваного матеріалу є актуальним протягом багатьох років. При конструюванні живильного середовища виникають труднощі, пов'язані з тим, що кишкові ієрсинії мають спільне середовище існування з іншими представниками сімейства ентеробактерій, і в досліджуваному матеріалі завжди наявна велика кількість мікрофлори, що пригнічує розмноження ієрсиній [1,2]. Отже, живильне середовище має характеризуватись покращеними інгібуючими властивостями відносно до супутньої флори, хорошими диференційними й селективними властивостями. Незважаючи на значну кількість існуючих варіантів диференційно-діагностичних середовищ («Иерсиния-агар», СБТС, середовище Серова, CIN-агар (Schiemann) тощо), можна констатувати факт, що жодне з них не є універсальним та, на жаль, не відповідає вимогам сучасної лабораторної практики: в мінімальні строки забезпечити виділення збудників ієрсиніозів [1,3–8].

МЕТА РОБОТИ

Розробити живильне середовище для виділення кишкових ієрсиній, в якому за рахунок оптимізації складу компонентів, що стимулюють ріст ієрсіній та пригнічують ріст супутньої мікрофлори, забезпечується підвищення рівня селективності. Актуальність мети зумовлена труднощами бактеріологічної діагностики ієрсиніозів у хворих, а також індикації ієрсиній у різних видах досліджуваного матеріалу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Використано мікробіологічні, інформаційні та статистичні методи досліджень. Діагностичну цінність дослідного середовища за чутливістю, показниками проростання, диференційними й інгібуючими властивостями вивчали порівняно з живильним середовищем Ендо. В експерименті використовували штами *Y. enterocolitica*, ізольовані від хворих і з об'єктів довкілля, штами *Y. kristensenii*, *Y. pseudotuberculosis* та *E. coli, P. vulgaris, K. pneumoniae, S. marcescens, E. aerogenes*, отримані з колекції НДІ стандартизації і контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.А. Тарасевича. Чутливість дослідного середовища оцінювали за мінімальною посівною дозою (10 та 100 м.к. на чашку), при якій на середовищі відзначено зростання колоній *Y. enterocolitica*. Облік результатів проводили через 24 та 48 годин інкубації висівів за температури 28ºС. Для вивчення інгібуючих властивостей живильного середовища готували розведення мікробів-асоціантів *E. coli, P. vulgaris, K. pneumoniae, S. marcescens* та *E. aerogenes* (посівна доза – 10^6 м.к. на чашку). Диференційні властивості експериментального середовища (забарвлення колоній, змінення кольору середовища під колоніями та навколо них) визначали при огляді посівів ієрсиній і мікробів-асоціантів. Фізичні властивості визначали візуально за зовнішнім виглядом середовища, його кольором, прозорістю. Статистичну обробку даних проводили за стандартною методикою визначення (M±m) та за допомогою критерію Стьюдента. Достовірність розрізнень оцінювали при рівні вірогідності $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті модельних дослідів отримали оптимальний склад середовища, що забезпечує найповніше виявлення збудників з різних видів досліджуваного матеріалу:

© Н.М. Поліщук, А.І. Севальнєв, Ю.М. Волжин, Н.Я. Коврига, І.Ю. Кучма, 2012

	(г/л)
Агар Ендо сухий	40,0–50,0
Сахароза	14,0–20,0
Генцианвіолет	0,005–0,02
Фурадонін (активної речовини)	0,01–0,02
Лінкоміцин	0,5–1,5
Триптофан	0,01–0,02
Диметилсульфоксид	1,2–2,4
Дистильована вода	до 1 л
pH	7,4±0,2

Використання агару Ендо, збагаченого сахарозою та триптофаном, забезпечує підвищені ростові якості середовища. До компонентів, що забезпечують необхідний рівень селективності, зокрема пригнічення росту супутньої мікрофлори (у тому числі штамів *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. aerogenes*), належить генцианвіолет, фурадонін, диметилсульфоксид і лінкоміцин.

Експериментальним шляхом дібрали 3 варіанти середовища, які можна використовувати при виявленні ієрсиній, адже вони сприятимуть отриманню бажаного результату протягом дослідів (*табл. 1*).

Таблиця 1

Варіанти експериментального середовища для виділення збудників ієрсиніозів

Компонент	Варіант 1	Варіант 2	Варіант 3
Агар Ендо сухий, г/л	45,0	50,0	40,0
Сахароза, г/л	16,0	20,0	14,0
Генцианвіолет, г/л	0,01	0,02	0,005
Фурадонін (активної речовини), г/л	0,15	0,02	0,01
Лінкоміцин, г/л	1,0	1,5	0,5
Триптофан, г/л	0,015	0,02	0,01
Диметилсульфоксид, г/л	1,9	2,4	1,2
Дистильована вода, г/л	до 1 л	до 1 л	до 1 л

У загальній повсякденній практиці бактеріологічних досліджень з виділення *Y. enterocolitica* з різних матеріалів (випорожнення людей, змиви з об'єктів, харчі тощо) рекомендовано використовувати перший варіант дослідного середовища, в якому компоненти взято в середніх концентраціях. При дослідженні значно забруднених сторонньою мікрофлорою матеріалів (змиви з овочів, ґрунт, випорожнення тварин, органи загиблих тварин тощо) рекомендовано використовувати варіант 2 з підвищеними селективними властивостями і вищою концентрацією інгібіторів супутньої мікрофлори. Для досліджень матеріалу, малозабрудненого сторонньою мікрофлорою (вода, готові кулінарні вироби, змиви на підприємствах громадського харчування тощо), рекомендовано використовувати середовище з низьким вмістом інгібіторів.

Для приготування основи живильного середовища в колбі в 1л холодної дистильованої води ретельно розмішують 40 г сухого агару Ендо та 20 г сахарози, нагрівають, у гарячий агар додають наважку триптофану, кип'ятять 3–5 хвилин до повного розчинення, не допускаючи пригорання. Після охолодження основи до 45–50ºС, вносять послідовно робочі розчини генцианвіолету, фурадоніну і лінкоміцину. Середовище ретельно перемішують і розливають в чашки Петрі з розрахунку 100 мл середовища на 5–6 чашок діаметром 95 мм. Готове середовище набуває бузкового кольору. Чашки слід оберігати від прямих сонячних променів. Термін зберігання чашок з середовищем становить не більше 7 діб за температури 4ºС.

Для приготування робочого розчину фурадоніну 1 г активної речовини вносять до стерильного флакона з 100 мл диметилсульфоксиду (питома вага 1,2), ретельно розмішують, кип'ятять до розчинення на водяній бані 5 хв. Робочий розчин зберігають під гумовою пробкою в темному місці за кімнатної температури. Термін використання робочого розчину складає 2 тижні. На 1 л основи вносять згідно до рецептів 0,5, 1 або 2 мл робочого розчину, що відповідає кінцевим концентраціям 5, 10 та 20 мг/л активної речовини.

Для приготування 1% робочого розчину генцианвіолету 1 г фарбника розчиняють у 100 мл стерильної дистильованої води або 100 мл 96°С етилового спирту. Розчин зберігають під гумовою пробкою за кімнатної температури. Термін використання водного розчину – 1 місяць, спиртового – 1 рік. На 1 л основи додають 0,5–1–2 мл розчину генцианвіолету, що відповідає кінцевій концентрації 5–10–20 мг/л.

Лінкоміцин використовують у вигляді30 % офіцинального розчину.

Результати дослідження показників чутливості зазначених варіантів середовища та середовища Ендо в умовах різного мікробного навантаження наведено в *таблиці 2*.

Таблиця 2

Порівняльний аналіз показників чутливості культурального методу детекції *Y. enterocolitica* в умовах різного мікробного навантаження

Мікробне навантаження ієрсиніями на об'єм живильного середовища, КУО/мл	Середовище Ендо (M±m)	Пропоноване середовище		
		Варіант 1 (M±m)	Варіант 2 (M±m)	Варіант 3 (M±m)
10^2	0,7±0,02	3,4±0,03*	1,4±0,01	5,3±0,02**
10^3	17,2±0,9	28,7±1,1*	20,4±0,6	40,1±2,1**

Примітка: рівень достовірності відмінностей * – <0,05; ** – <0,01.

У результаті здійснених досліджень встановлено, що початкове зростання *Y. enterocolitica* у вигляді дрібних колоній відбувалось через 18 годин інкубації посівів при 28ºС. Колонії *Y. enterocolitica* на 2 добу були фіолетового кольору, з сухою матовою поверхнею або з незначним блиском, з піднятим центром, діаметр – до 1–2 мм. Колонії декількох штамів мали вигляд «гудзиків», «беретів» з западаючим центром. Збудник псевдотуберкульозу зростав у вигляді дрібних (0,5 мм) сухуватих колоній кольору середовища. Культура *Y. kristensenii* вже на 1 добу на дослідному середовищі росла у вигляді прозорих, випуклих, з блиском колоній, діаметр – 0,5–1 мм. Через 42 години колонії ставали крупними (1–2 мм), випуклими, маслянистими, з рівними краями, фіолетового кольору.

У *таблиці 3* наведено результати дослідження селективних властивостей варіантів середовища та середовища Ендо відносно до штамів-асоціантів при культивуванні протягом 24 годин при 28ºС (посівна доза – 10^7 КУО/мл).

При посіві суміші поряд зі збудником кишкового ієрсиніозу зростали колонії мікробів-асоціантів, але диференціація *Y. enterocolitica* від культур *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* за зовнішнім виглядом (величина, колір, консистенція) можлива вже через 24 години культивування. Так, *E. coli* росла у вигляді яскравих малинових, крупних, маслянистих з металевим блиском колоній. Культура *K. pneumoniae* відрізнялась зростанням пишних, слизистих, темно-малинових, крупних

© Н.М. Поліщук, А.І. Севальнєв, Ю.М. Волжин, Н.Я. Коврига, І.Ю. Кучма, 2012

Таблиця 3

Порівняльний аналіз селективних властивостей середовища для виділення збудників ієрсиніозів відносно до штамів-асоціантів

Штам	Середовище Ендо	Дослідне середовище		
		Варіант 1	Варіант 2	Варіант 3
E. coli ATCC 25922 (F-50)	Більше 200 колоній	До 35 колоній	Одиничні колонії	Ріст відсутній
E. aerogenes 10006	Більше 200 колоній	Одиничні колонії	Ріст відсутній	Ріст відсутній
K. pneumoniae K-56	Зливний ріст	До 50 колоній	Одиничні колонії	Ріст відсутній
P. vulgaris НХ 19 № 22	Виражене роїння	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній
S. marcescens 1	Більше 200 колоній	Ріст відсутній	Ріст відсутній	Ріст відсутній

(до 3 мм в діаметрі) колоній. При посіві штаму *E. aerogenes* виявлено ріст крупних (1,5–2 мм) колоній, що мали рожеве забарвлення, маслянисту, гомогенну консистенцію. Вивчення біологічних властивостей культур *Y. Enterocolitica*, вирощених на всіх трьох варіантах експериментального середовища, встановило, що за своїми властивостями вони не відрізнялись від культур кишкових ієрсиній, культивованих на агарі Ендо.

Як видно з наведених даних, сукупність суттєвих ознак дозволяє досягти бажаного технічного результату, підвищити чутливість методу детекції та покращити селективні властивості середовища порівняно з прототипом. Середовище не складне в приготуванні, готується протягом 5 хвилин, не потребує фільтрації та стерилізації завдяки додаванню препаратів, що пригнічують ріст сторонньої мікрофлори. Щільність агару забезпечує посів культур без пошкодження поверхні середовища. Введення до складу агару недорогих компонентів, що підвищують його якість, є економічно вигідним. Використання пропонованого живильного середовища дає можливість знизити витрати полівуглеводних середовищ на етапі відбору підозрілих колоній, що, в свою чергу, економить витрати інших середовищ і реактивів.

За результатами проведеної роботи отримано патент «Живильне селективне середовище для виділення бактерій роду Yersinia». Пат. 56554 Україна, МПК (2006): C12N 1/20, C12Q 1/04 (опубл. 25.01.2011. – Бюл. 2).

ВИСНОВКИ

1. Нове живильне середовище для культивування ієрсиній має переваги перед звичайним середовищем Ендо, що традиційно використовується в лабораторній практиці. Дослідне середовище забезпечує ріст штамів *Y. enterocolitica* вже через 18–24 години інкубації при 28ºС. На середовищі не пригнічується зростання культур *Y. pseudotuberculosis*, *Y. kristensenii*, що дає додаткові можливості для виділення інших збудників ієрсиніозів.

2. Експериментальне середовище характеризується хорошими диференційними й селективними властивостями, завдяки чому за морфологією колонії ієрсиній легко відрізняються від колоній клебсиел, кишкової палички, ентеробактеру, пригнічується зростання протею і серацій.

3. Використання запропонованого живильного середовища в мікробіологічній практиці замість середовища Ендо не тільки дозволяє підвищити якість дослідження за рахунок вираженіших диференційних властивостей, але й сприяє зниженню собівартості мікробіологічних досліджень за рахунок недорогих компонентів і зниження витрат полівуглеводних середовищ на етапі відбору підозрілих колоній.

Перспективи подальших досліджень. Застосування нового живильного середовища в лабораторній практиці значно підвищить результативність виявлення збудників ієрсиніозів з різних видів досліджуваного матеріалу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Иерсинии и иерсиниозы / Под ред. *Ценевой Г.Я*. – СПб., 2006. – 168 с.
2. *Ценева Г.Я.* Биологические свойства иерсиний и лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза / *Г.Я. Ценева, Е.А. Воскресенская, Н.Ю. Солодовникова [и др.]*. – СПб., 2001. – С. 45–48.
3. Validation of a method for the detection of virulent Yersinia enterocolitica and their distribution in slaughter pigs from conventional and alternative housing systems // *Veterinary Microbiology*. – V. 117. – №2–4. – P. 219–228. – doi:10.1016/j.vetmic.2006.06.002.
4. *Ценева Г.Я.* Новая среда накопления для выделения бактерий рода Yersinia / *Г.Я. Ценева, Е.Ю. Смирнова, В.Г. Мессороши, Н.А. Рыбакова* // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – №6. – С. 39-40.
5. *Паньшина Е.Ф*. Ростовые и дифференцирующие и ингибирующие свойства питательной среды для иерсиний / *Е.Ф. Паньшина, Л.П. Титов* // Здравоохранение: научно-практический ежемесячный журнал. – 2007. – №11. – С. 20–22.
6. Диагностическая ценность новой питательной среды для выделения и культивирования возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза / *Л.В. Саяпина, Т.И. Анисимова, Г.М. Сергеева, И.В. Касина, Г.П. Шведун, М.В. Храмов* // Журнал микробиологии и эпидемиологии. – 2000. – №6. – С. 15–18.
7. Yersinia selective agar Bas acc. to Schiemann (CIN-agar) – Режим доступу: http:// www.mibius.de
8. Пат. № 2101342 Питательная середа для выделения возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза, сухая. – Режим доступу: http://www.iers-cr.koi.db.htm

Відомості про авторів:

Поліщук Н.М., к. мед. н., зав. бактеріологічної лабораторії Запорізької облСЕС.

Севальнєв А.І., головний державний санітарний лікар Запорізької області, к. мед. н., доцент, зав. каф. загальної гігієни ЗДМУ.

Волжин Ю.М., зав. епідеміологічного відділу Запорізької обласної СЕС.

Коврига Н.Я., зав. лабораторії відділення особливо небезпечних інфекцій Запорізької обласної СЕС.

Кучма І.Ю., к. мед. н., професор каф. клінічної імунології та мікробіології ХМАПО.

Адреса для листування:

Поліщук Наталія Миколаївна. 69037, м. Запоріжжя, вул. Рекордна, 27, Запорізька обласна санітарно-епідеміологічна станція.

Тел: (061) 233 61 80, (061) 233 70 64. E-mail: zpoblses@ukr.net

Поступила в редакцию 14.05.2012 г.