

УДК: 616.34:[57.083.1:579.842.17]Enterobacterium

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБА ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ДИСБАКТЕРИОЗА КИШЕЧНИКА

Е.Ф. Завгородняя, В.А. Шмыленко

ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Российская Федерация

Представлены результаты исследований по разработке нового способа идентификации цитратассимилирующих энтеробактерий. В последние годы, ввиду значительного увеличения циркуляции этих микроорганизмов у лиц с дисбиотическим состоянием кишечника, возникла необходимость в большем объеме их идентификации. Предлагается простой и не затратный способ идентификации этой группы микроорганизмов при помощи ограниченного набора тестов. Способ защищен патентом на изобретение.

Ключевые слова: условно-патогенные бактерии (УПБ), цитратассимилирующие энтеробактерии.

IMPROVEMENT OF ENTEROBACTERIA IDENTIFICATION METHOD DURING THE DIAGNOSIS OF INTESTINAL DYSBACTERIOSIS

E.F. Zavgorodnyaya, V.A. Shmilenko

FBIS Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service on consumers rights protection and human wellbeing, Khabarovsk, Russian Federation

The article presents the results of research on the development of a new method of citrate assimilating enterobacteria identification. In recent years, due to the significant increase in the circulation of these microorganisms among persons with disbiotic bowel condition, there is a need for their identification on a larger scale. A simple and cost-effective method of identification of this group of microorganisms using a limited set of tests was proposed. The method is protected by a patent.

Key words: opportunistic pathogenic bacteria (OPB), citrate-assimilating enterobacteria.

Проблема дисбактериоза кишечника продолжает оставаться актуальной, несмотря на значительное количество научных и научно-практических работ в этой области, регистрируемое в последнее время. Актуальность проблемы во многом связана со значительной распространенностью этого состояния как у детей, так и у взрослых, формирующегося под влиянием различных факторов, имеющих непрекращающуюся тенденцию к росту [1,2,4,5,6].

В ходе микробиологической диагностики этого нарушения выяснилось, что свыше 70,0% всех дисбактериозов связано с увеличением в микробном пейзаже условно-патогенных бактерий (УПБ), в том числе, цитратассимилирующих энтеробактерий [2,7].

К цитратассимилирующим бактериям семейства Enterobacteriaceae относятся представители различных родов и видов, обладающие способностью использовать цитрат натрия как единственный источник углерода. При посеве такого микроорганизма на питательную среду, содержащую цитрат натрия (среду Симмонса), в ходе реакции происходит сдвиг pH в щелочную сторону, в результате чего среда окрашивается в ярко-синий цвет (исходная среда имеет зеленую окраску).

К наиболее часто встречаемым в медицинской практике цитратассимилирующим энтеробактериям относятся: род Клебсиелла – *K.pneumoniae* (с подвидами пневмонии, озены и риносклероматис), *K.oxytoca*; род Цитробактер – *C.amalonaticus*, *C.freundii*, *C.koseri*, *C.youngae*; род Энтеробактер – *E.aerogenes*, *E.cloacae*; род Сепрация – *S.marcescens*, *S.plymuthica*, *S.rubidaea*; род Провиденция; род Протеус – *P.vulgaris*, *P.mirabilis*.

Эти микроорганизмы являются условно-патогенными. Они в незначительных количествах могут находиться в толстом отделе кишечника человека, составляя его так называемую «нормальную» микрофлору. При дисбиотических нарушениях кишечника (дисбактериозе) количество условно-патогенной микрофлоры, и в том числе цитратассимилирующих бактерий, может значительно увеличиться и превысить возрастную норму, что выявляется при целенаправленной микробиологической диагностике и требует соответствующего лечения. Кроме того, нельзя не учитывать и факт значительного увеличения изоляции при дисбактериозах кишечника многокомпонентных микробных ассоциаций, в состав которых, как правило, входят цитратассимилирующие бактерии, а также возможно-

сти этих микроорганизмов вызывать инфекционные заболевания с кишечной и внекишечной локализацией.

Идентификации, как таковой, группы цитратассимилирующих бактерий, дающих возможность определить не только род, но и вид, а иногда и подвида, используя при этом ограниченный набор тестов, в доступной нам литературе не встретилось [8,9,13].

Наибольшую популярность в последние годы приобрели автоматические бактериологические анализаторы для микрообъемной идентификации, в том числе, энтеробактерий. В нашей стране широкое распространение получил метод идентификации бактерий с помощью баканализатора Vitek – 2 Compact (производства фирмы Bio Merieux, Франция). Подобной техникой оснащены крупные лаборатории и медицинские центры. Такого типа баканализаторы позволяют быстро, без значительных физических затрат и при этом с большой точностью идентифицировать значительное число известных микроорганизмов. Однако большим недостатком идентификации микроорганизмов с помощью этого баканализатора является высокая стоимость как самой аппаратуры, так и расходных материалов к ней, что делает невозможным исследование большого объема материала; кроме того, такая аппаратура едва ли доступна для маленьких лабораторий или других небольших медучреждений. При использовании подобных анализаторов для идентификации цитратассимилирующих энтеробактерий происходит необоснованный расход тест-систем, так как для каждого штамма микроорганизма аппарат использует 64 диагностических теста, тогда как цитратассимилирующие бактерии не требуют такого количества, а могут быть определены с помощью гораздо меньшего набора, что позволяет значительно удешевить их идентификацию, сохранив при этом достаточно высокую точность.

Известен ряд методов идентификации энтеробактерий, число и эффективность которых из года в год повышается. Наиболее востребованными и достаточно точными являются макро- и микрообъемные методы биохимической идентификации: использование СИБов - систем индикаторных бумажных, ПБДЭ – пластин биохимических, диагностирующих энтеробактерии – обе системы производства «Микроген», г. Нижний Новгород [8,13]. Однако обе эти системы не лишены недостатков, так, для системы ПБДЭ необходимо наличие большого числа (20) лунок с субстратами и требуется использования таких тестов, которые при идентификации цитратассимилирующих бактерий могут быть опущены или заменены другими. Кроме того, при использовании этой системы нередко бывают затруднения при учете результатов в связи с недостаточным размером лунки, что сказывается как на точности посева, так и - на учете результатов.

Наиболее близким является способ использования СИБов, дающий возможность провести идентификацию с помощью 13 тестов, но он неудобен технически, требует значительных затрат рабочего времени, лабораторной посуды с предварительным ее мытьем, заготовкой, стерилизацией и некоторыми другими манипуляциями, что также увеличивает время выполнения исследования, трудозатраты и, в конечном итоге - его стоимость. Кроме того, способ с использованием СИБов обладает низкой глубиной идентификации: он предназначен только для межродовой и межвидовой идентификации и не способен определить подвида микроорганизма.

Цель исследования – разработка способа идентификации цитратассимилирующих энтеробактерий с использованием ограниченного набора тестов.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили цитратассимилирующие условно-патогенные энтеробактерии, изолированные из фекалий 490 детей и взрослых с выявленными дисбиотическими нарушениями. Основными диагностирующими тестами были: учет образования индола и сероводорода (на МПБ или 1% пептонной воде), подвижности (на 0,3 % агаре) и ассимиляции цитрата натрия (на среде Симмонса). Всего в параллельных опытах изучено 150 культур цитратассимилирующих энтеробактерий. Исследование кишечной микробиоты и оценку результатов проводили по стандартной методике [11], идентификацию штаммов УПБ – классическим микробиологическим методом, с помощью СИБов «Микроген» (Нижний Новгород), баканализатора Vitek 2 Compact 30 и предлагаемого нами способа.

Результаты и обсуждение

Результаты проделанной работы позволили предложить новый способ идентификации цитратассимилирующих энтеробактерий [12]. В предлагаемом способе, включающем пересев изучаемой колонии микроорганизмов, выросших на средах Эндо или Симмонса, первичная идентификация производится с использованием ограниченного набора тестов: индолообразование, продукция сероводорода, подвижности и утилизации цитрата натрия, по характеру изменения которых изучаемые микроорганизмы вначале подразделяются на шесть условных групп, а в дальнейшем, в зависимости от принадлежности к определенной группе, используется основной и, при необходимости, дополнительный для каждой группы тест, а именно: лизин и при необходимости мочевины - для I группы; лизин и, при необходимости, (последовательно) сорбит, аргинин и рамноза – для III группы; фенилала-

нин, а в дальнейшем малонат натрия – для IV группы; фенилаланин и в дальнейшем лактоза – для VI группы; бактерии II и V группы идентифицируются только по первичным тестам (табл.1).

В схему включены роды, виды, и подвиды цитратассимилирующих энтеробактерий в соответствии с [10,14].

Способ осуществляется следующим образом: чистую культуру изучаемого микроорганизма, выросшую на чашечных средах Эндо или Симмонса, засевают на мясо-пептонный бульон (МПБ) или 1% пептонную воду (для определения продукции индола и сероводорода), на 0,3% полужидкий мясо-пептонный агар (для определения подвижности) и на пробирочную среду Симмонса (для определения утилизации цитрата натрия). В том случае, если изучаемый штамм изолирован со среды Симмонса, посев на эту среду в пробирке не делается. После инкубации посевов в термостате при 37,0 °C в течение 18 – 20 час производят учет результатов; при этом идентифицируемые микроорганизмы в зависимости от изменения указанных субстратов могут быть отнесены к одной из шести групп:

к I группе относятся неподвижные бактерии, не продуцирующие индол и сероводород и ассимилирующие цитрат натрия при росте на среде Симмонса –

Klebsiella pneumoniae с подвидами (ssp. *pneumoniae*, ssp. *ozenae*, ssp. *rhinoscleromatis*), основным тестом для дифференциации которых является лизин, а дополнительным – мочевиная.

к II группе относятся неподвижные бактерии, продуцирующие индол, не образующие сероводород и ассимилирующие цитрат натрия; в эту группу входит только единственный вид – *Klebsiella oxytoca*, который окончательно дифференцируется уже по первичным тестам.

III группа включает подвижные бактерии, не продуцирующие индол и сероводород и утилизирующие цитрат натрия – *Enterobacter cloacae* ssp. *cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica* и *Serratia rubidaea*, основной дифференцирующий тест группы – **лизин**, дополнительные тесты – сорбит и аргинин и при необходимости дальнейшей идентификации – рамноза.

IV группа включает подвижные штаммы, образующие индол и не образующие сероводород, а также ассимилирующие цитрат натрия – *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter koseri*, а также бактерии рода *Providencia*. Основной дифференцирующий тест группы – **фенилаланин**, дополнительный – малонат натрия.

V группа объединяет подвижные штаммы, продуцирующие индол и сероводород и ассимилирующие цитрат; сюда, как и во II группу, относится единственный вид – *Proteus vulgaris*, который дифференцируется по первичным четырем тестам (отдельные штаммы этого микроорганизма могут не утилизировать цитрат).

Роды и виды бактерий, составляющие VI группу, подвижны, не продуцируют индол и продуцируют сероводород, в большинстве утилизируют цитрат натрия – *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae*. Основной дифференцирующий тест группы – **фенилаланин**, дополнительный – лактоза.

СХЕМА ОПТИМАЛЬНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ ЦИТРАТАССИМИЛИРУЮЩИХ
ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ИМЕЮЩИХ МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

№ груп- пы	Характер изменений первичных тестов	Названия микроорганизмов	Основной тест	Результат теста	Допол- нительный тест	Результат теста	Допол- нительный тест	Результат теста
1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	Индол - H ₂ S - Подвиж- ность - Ср.Сим- монса +	Klebsiella pneumoniae ssp.pneumoniae; Klebsiella pneumoniae ssp.ozenae; Klebsiella pneumonia ssp.rhinoscleromatis;	ЛИЗИН	- Klebsiella pneumoni- ae ssp.rhinoscleromatis; + Klebsiella pneumoniae ssp.pneumoniae; Klebsiella pneumoniae ssp.ozenae	МОЧЕВИНА	Klebsiella pneumonia ssp.ozenae; + Klebsiella pneumonia ssp.pneumoniae		
II	Индол + H ₂ S - Подвиж- ность - Ср.Сим- монса +	Klebsiella oxytoca						
III	Индол -- H ₂ S -- Подвиж- ность + Ср.Сим- монса +	Enterobacter cloacae ssp.cloacae; Enterobacter aerogenes ; Serratia marcescens; Serratia plymuthica ; Serratia rubidaea	ЛИЗИН	- Enterobacter cloacae ssp.cloacae; Serratia plymuthica; + Enterobacter aerogenes; Serratia marcescens; Serratia rubidaea;	СОРБИТ АРГИНИН	+ Enterobacter cloacae ssp.cloacae - Serratia plymuthica - Serratia rubidaea; + Enterobacter aerogenes; Serratia marcescens	РАМНОЗА	- Serratia marcescens + Enterobacter aerogenes

Таблица 1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
IV	Индол + H ₂ S - Подвижность + Ср.Симмонса +	Citrobacter amalonaticus; Citrobacter koseri ; Providencia spp.	ФЕНИЛАЛАНИН	– Citrobacter amalonaticus; Citrobacter koseri + Providencia spp.	МАЛОНАТ НАТРИЯ	– Citrobacter amalonaticus; + Citrobacter koseri		
V	Индол + H ₂ S + Подвижность + Ср.Симмонса +	Proteus vulgaris						
VI	Индол - H ₂ S + Подвижность + Ср.Симмонса +	Proteus mirabilis; Citrobacter freundii; Citrobacter youngae	ФЕНИЛАЛАНИН	+ Proteus mirabilis – Citrobacter freundii; Citrobacter youngae	ЛАКТОЗА	+ Citrobacter freundii – Citrobacter youngae		

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И ПОЯСНЕНИЯ:

ssp. - подвида бактерий;
 spp. - род бактерий

Для сравнения основных параметров предлагаемого способа было произведено параллельное изучение одних и тех же штаммов цитратассимилирующих энтеробактерий с использованием трех способов: с помощью индикаторных дисков (СИБ), производства «Микроген», Нижний Новгород, баканализатора Vitek- 2 Compact 30, производства фирмы «Bio Merieux, Франция и предлагаемого способа.

Таблица 2

Сравнительная характеристика отдельных способов идентификации

Название способа	СИБ (система индикаторная бумажная), набор № 2 для межродовой и межвидовой дифференциации энтеробактерий, производство «Микроген», г.Нижний Новгород.	Баканализатор Vitek-2 Compact 30, производства фирмы «Bio Merieux», Франция	Предлагаемый способ
Количество используемых тестов	13	64	Не более 7
Число исследованных штаммов	150	40	150
Глубина идентификации	Род, вид	Род, вид, подвид	Род, вид, подвид
Точность идентификации	97,3% (146 штаммов)	Основной способ сравнения 100,0 %	97,3% (146 штаммов)
Стоимость идентификации одного штамма	397,2 руб.	Более 1 400 руб.	261,7 руб.

Результаты, полученные при этом, свидетельствуют о высокой точности предлагаемого способа, практически не уступающего способам сравнения. Кроме того предлагаемый способ дает возможность идентифицировать большинство микроорганизмов не только до рода и вида, но и до подвида, также, как при использовании высокоточного способа с использованием баканализатора Vitek- 2 Compact 30, тогда как способ с использованием СИБов идентифицирует только до рода и вида. Количество используемых тестов значительно меньше у предлагаемого, чем у способов сравнения. Стоимость исследования одного микроорганизма у предлагаемого способа в 1,5 раза меньше, чем при применении СИБов, и в 5,4 раза ниже, чем при использовании баканализатора Vitek- 2 Compact 30. Кроме того, предлагаемый способ поможет проводить идентификацию цитратассимилирующих штаммов энтеробактерий без использования импортной техники и расходных материалов, что является своего рода средством импортозамещения.

Способ был внедрен в работу лаборатории бактериальных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора.

В течение последних трех лет с помощью предлагаемого метода нами было идентифицировано более 450 штаммов цитратассимилирующих энтеробактерий, изолированных от лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника.

Выводы

1. Разработан новый способ идентификации цитратассимилирующих энтеробактерий [12], дающий возможность определить не только их род, но и вид и даже подвид, используя при этом ограниченный набор тестов.

2.Способ обладает высокой точностью, требует минимального набора питательных сред и незначительных трудозатрат, а стоимость его в несколько раз ниже всех использованных в исследовании способов идентификации.

3. Указанный способ идентификации может быть применен при проведении исследований на выявление дисбиотических нарушений кишечника, а также при диагностике инфекционных заболеваний, как кишечной, так и внекишечной локализации, обусловленных УПБ.

Литература

1. Белокрысенко С.С. Дисбактериоз кишечника с точки зрения микробиолога //Клинич. лаб.диагностика. – 2010.- №7. – С.47-49.

2. Бисенева Н.М., Абжалимов А.Б., Митус М.Н. и др. Динамика выделения условно-патогенных энтеробактерий при дисбактериозе кишечника // Национальные приоритеты России. – 2009. -№2. – С.235-236.
3. Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника у взрослых. – М.: КМК Scientific Press, 2003. – 224 с.
4. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. –М.,ГОЭТАР – Медиа, 2007. – 333 с.
5. Булатова Е.М., Богданова Н.М., Лобанова Е.А. и др. Кишечная микробиота: современные представления. // Педиатрия. – 2009. – Т.87, №3.-С.104-110.
6. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. П/р. Е.И. Ткаченко и А.Н. Суворова – 2 изд.. С. Петербург: ИнформМед, 2009. -276 с.
7. Завгородняя Е.Ф., Сташкевич Л.А., Битус Е.А. Характеристика кишечных биоценозов у детей с дисбиотическими нарушениями. //Дальневосточный журнал инфекционной патологии». – 2010. - №17. – С.148-152.
8. Идентификация энтеробактерий и стафилококков.: Информационные материалы./ Сасова В.А.,Залесских Н.В., Н.Новгород. -2007. –С.6-27.
- 9.Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями /Килессо В.А., Прямухина Н.С., Тендетник Ю.Я., Ющенко Г.В., Голубева И.В., Киселева Б.С., Хоменко Н.А. –М., 1984. – С.5-33.
10. Определитель бактерий Берджи / Ред. Дж. Хоулт и др.,- Изд. 9. - М.: Мир.,1997. - 430 с.
11. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500. 11.00004. 2003). Приказ МЗ РФ № 231 от 9 июля 2003г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных, Дисбактериоз кишечника». – М., 2003. -173 с.
- 12 (Пат.) № 2646101(RU) на изобретение «Способ оптимальной идентификации наиболее часто встречающихся цитратассимилирующих энтеробактерий,имеющих медицинское значение» / Завгородняя Е.Ф., Шмыленко В.А., Бюллетень «Изобретения и полезные модели» № 7 от 01.03.2018.
13. Сиволодский Е.П. Систематика и идентификация энтеробактерий 4 изд.,- С.Петербург, 2015, - 55 с.
14. «Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology», 2005, 2,Vol.2, В.,Р.587-850.

Сведения об авторах:

Ответственный автор: *Завгородняя Елена Федоровна* – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории бактериальных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, тел. (4212)32-88-93, e-mail: adm@hniiem.ru