

УСКОРЕННЫЙ СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

С.А. Габриелян

Национальный институт здравоохранения Министерства Здравоохранения Армении, Ереван, Армения

Резюме. Выявление цистиазной активности является наиболее важным тестом в лабораторной диагностике дифтерии, позволяющей дифференцировать потенциально токсигенные виды от других коринеформных бактерий. Первоначальный рецепт среды Пизу для выявления цистиазной активности был предложен в 1939–1940 гг., после чего неоднократно модифицировался (1982, 1989 гг.). В последней модификации среды Пизу в качестве питательной основы использовался агар Гивенталья–Ведьминой (АГВ). Мы предлагаем модифицированную среду Пизу на основе агара Мюллера–Хинтона, который обладает рядом преимуществ: высокой питательностью, стандартностью, прозрачностью и доступностью. Положительный результат реакции учитывают через 2–4 ч после инокуляции достаточного количества материала (чистая культура или ассоциация *C. diphtheriae* с другими микроорганизмами) в виде коричневого облака вокруг черных колоний. Коричневое облако отсутствует в верхней части пробирки (0,5–1 см). Модифицированный тест апробирован на 21 штамме *C. diphtheriae* (tox+), 9 штаммах коринеформных бактерий, референс-штаммах NCTC 10648, NCTC 10356, NCTC 3984. Модифицированная среда Пизу зарегистрирована в Патентном Бюро Армении (№ 1877 А2, 15.12.2006).

Ключевые слова: коринебактерии, цистиазная активность, модифицированная среда.

Введение

Сокращение сроков бактериологического исследования патологического материала при дифтерийной инфекции является крайне важным для ранней специфической терапии больного и организации противоэпидемических мероприятий. Определение токсигенности дифтерийного микроба считается основным при постановке диагноза дифтерии. Вторым по значимости тестом при идентификации *C. diphtheriae* и потенциально токсигенных *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, а также дифференциации от прочих коринебактерий является их цистиазная активность. В бактериологических лабораториях всего мира цистиазная активность коринебактерий определяется на среде Пизу или Тинсдейл.

Оригинальная пропись среды Пизу была предложена еще в 1939–1940 гг. Существенным недостатком этого теста являлась длительность времени учета результатов (18–48 ч).

Поэтому зарубежными исследователями был предложен альтернативный тест — определение пиразинамидазной активности [5]. И хотя время для учета этой реакции гораздо меньше (2–3 ч), ее результаты не всегда коррелируют с принадлежностью к потенциально патогенным штаммам [4]. В экспериментальных исследованиях различных авторов наблюдались расхождения при оценке патогенных свойств коринебактерий с использованием пиразинамидазного теста [4, 5]. Чаще всего отмечались ложноположительные реакции (10–20%), в то время как цистиазная активность полностью отражала принадлежность штамма к патогенным коринебактериям [6]. Полученный эффект имеет следующее объяснение.

Цистиназа является индуцибельным экзоферментом, вырабатываемым при наличии субстрата, то есть цистеина или цистина в составе белковых комплексов. Гены, кодирующие выработку этого фермента, расположены в хромосоме некоторых видов микроорганиз-

Автор:

Габриелян С.А., к.м.н., доцент, руководитель Научно-практического центра медико-биологических исследований Национального института здравоохранения Министерства здравоохранения Армении, Ереван, Армения.

Адрес для переписки:

Габриелян Сильва Амбарцумовна
0051, Армения, Ереван, ул. Комитаса, 49, к. 4.
Тел.: (3741) 23-69-01; (093) 32-74-89 (моб.).
E-mail: mbio@nih.sci.am; silva.gabrielyan.53@mail.ru

поступила в редакцию 18.06.2013
принята к печати 08.07.2013

© Габриелян С.А., 2013

мов из различных семейств, в том числе — трех видов коринебактерий: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*. При этом до сих пор нет информации о случаях мутаций в соответствующем участке генома коринебактерий.

В то же время рядом исследователей выявлены мутации в гене, кодирующем пиразинамидазу у различных видов бактерий, в том числе — среди видов коринебактерий [3]. Поэтому при выявлении потенциально патогенных штаммов коринебактерий надежность и достоверность теста на цистиазную активность несомненно выше, чем теста на пиразинамидазу. В связи с этим рядом исследователей, в том числе отечественных, велись поиски такой рецептуры среды Пизу, при которой можно было бы сократить время учета реакции до нескольких часов [1, 2].

Как правило, все модификации среды были связаны с используемой при ее приготовлении основой. Агар Мартена, используемый в оригинальной прописи в качестве основы, был заменен на агар Д. В результате сроки учета сократились до 4 ч [2]. Дальнейшие модификации среды были обусловлены прекращением производства агара Д. Фельдманом Ю. и соавт. была предложена новая модификация среды с заменой агара Д на среду АГВ, используемую для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов [1]. При этом регламентированные сроки учета результатов остались прежними, и четкие результаты получались не ранее, чем через 18–24 ч.

Позже, в 1992 г. Colman G. et al., была предложена среда Тинсдейл (основа Тинсдейл + добавка Difco Тинсдейл), которая отличалась простотой приготовления и стандартностью [4]. Опыт использования этой среды в период последней эпидемии дифтерии в странах Восточной Европы, в том числе в Армении и в Украине, показал необходимость двукрат-

ного увеличения количества добавки в среду. Помимо этого, длительность сроков учета результатов (18–24 ч), а также сложность приобретения этой среды, ограничивали ее применение.

Поэтому целью настоящей работы была разработка новой модификации среды, которая была бы лишена недостатков предыдущих, а компоненты среды были бы доступны для всех лабораторий.

Материалы и методы

В работе были использованы: 17 штаммов *C. diphtheriae* v. *gravis* tox(+); 4 штамма *C. diphtheriae* v. *mitis* с «молчащим» геном токсигенности и 9 штаммов разных видов коринебактерий. В качестве контролей использовались штаммы:

- NCTC 10648 — положительный (tox+) контроль;
- NCTC 10356 — отрицательный (tox–) контроль;
- NCTC 3984 — слабopоложительный (tox±) контроль.

Были проведены три серии испытаний разработанной модификации среды Пизу на основе агара Мюллера–Хинтона в сравнительном изучении с той же средой, приготовленной на основе агара АГВ. Отработаны оптимальное количество основы модифицированной среды, сроки учета результатов определения цистиазной активности и критерии оценки.

Результаты

Результаты определения цистиазной активности штаммов коринебактерий на модифицированной среде Пизу (основа — агар Мюллера–Хинтона) представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 1, у 15 (88,2%) штаммов *C. diphtheriae* v. *gravis* из 17, обладающих цистиазной активностью, положительный резуль-

ТАБЛИЦА 1. ЦИСТИАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КОРИНЕБАКТЕРИЙ НА МОДИФИЦИРОВАННОЙ СРЕДЕ ПИЗУ (ОСНОВА — АГАР МЮЛЛЕР–ХИНТОНА)

Штаммы	Число штаммов	Токсигенность	Количество (+) проб Пизу в динамике				
			2 ч	4 ч	6 ч	18 ч	24 ч
<i>C. diphtheriae</i> v. <i>gravis</i>	17	+	15*	17	17	17	17
<i>C. diphtheriae</i> v. <i>mitis</i>	4	МГ	2	2	4	4	4
<i>C. xerosis</i>	5	–	0	0	0	0	0
<i>C. hofmanni</i>	4	–	0	0	0	0	0
NCTC 10648	1	+	1	1	1	1	1
NCTC 10356	1	–	0	0	0	0	0
NCTC 3984	1	±	0	0	1	1	1

Примечание: * — положительный результат регистрировался уже через 1 ч 45 мин; МГ — штаммы с «молчащим» геном токсинообразования.

ТАБЛИЦА 2. ЦИСТИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ *C. DIPHTHERIAE* И В АССОЦИИ С ДРУГИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ НА МОДИФИЦИРОВАННОЙ СРЕДЕ ПИЗУ

Штаммы	Число штаммов	Количество (+) проб Пизу в динамике				
		2 ч	4 ч	6 ч	18 ч	24 ч
<i>C. diphtheriae</i> v. <i>gravis</i>	15	15	15	15	15	15
<i>C. diphtheriae</i> v. <i>gravis</i> + <i>S. aureus</i> + <i>C. albicans</i>	3	2	3	3	3	3
NCTC 10648	1	1	1	1	1	1
NCTC 10356	1	0	0	0	0	0

тат регистрировался уже через 1 ч 45 мин — 2 ч после постановки теста. Через 4 ч после инкубации у всех 17 штаммов *C. diphtheriae* v. *gravis* цистиназная активность на модифицированной среде Пизу четко проявлялась.

Определение цистиназной активности *C. diphtheriae* в ассоциации с другими микроорганизмами на модифицированной среде Пизу показало, что наличие ассоциантов практически не влияет на время проявления положительного результата (табл. 2).

На рис. (III обложка) представлена сравнительная картина модифицированной среды Пизу для определения цистиназной активности потенциально-токсигенных коринебактерий.

Рецептура модифицированного теста

Для приготовления 100 мл модифицированной среды Пизу необходимо:

1. основа среды — 1,7 г агара Мюллера–Хинтона прокипятить в 90 мл дистиллированной воды до полного растворения;

2. раствор цистина — в 10 мл дистиллированной воды внести 0,5 г NaHCO₃ (гидрокарбоната натрия), довести до кипения, добавить 0,15 г α-цистина, вновь довести до кипения. В горячую основу агара Мюллера–Хинтона добавить 2 мл приготовленного раствора цистина, тщательно перемешивая, довести pH до 7,7 и простерилизовать 10 мин при 0,5 атмосферы. Остудить стерильную среду до 40–37°C, быстро добавить 1,5 мл 10% гипосульфита натрия, 1 мл 10% уксуснокислого свинца (Pb(CH₃COO)₂), приготовленного *ex tempore*, и 10 мл инактивированной лошадиной сыворотки в перечисленной очередности. Готовую среду разлить по 3–4 мл в пробирки диаметром не более 1 см. Посев испытуемой культуры проводится вертикально уколом.

Посевная доза микроорганизмов должна быть максимально возможной (полная бактериологическая петля диаметром 2 мм). Посев инкубируется 18–24 ч при температуре 37°C с просматриванием результатов через 2–3 ч. При наличии у коринебактерии фермента цистиназы в пробирке происходит образование коричневого облачка вокруг черного роста микроорганизмов по ходу укола. В верхней части среды (0,5–1 см) коричневого облачка не образуется.

Обсуждение

Предлагаемая модификация среды Пизу для определения цистиназной активности коринебактерий позволяет сократить сроки идентификации *C. diphtheria*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* на 18–20 ч (положительный результат регистрируется через 2–4 ч вместо 18–24 ч). Четкость получаемых результатов обеспечивает достоверность учета теста. Помимо этого, агар Мюллера–Хинтона, используемый в предлагаемой модификации среды в качестве основы, в настоящее время более доступен (используется в рутинной практике бактериологических лабораторий для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов), достаточно питателен для дифтерийных бактерий, стандартен, прозрачен. Перечисленные качества агара Мюллера–Хинтона обеспечивают преимущества модифицированной среды Пизу и унифицированность определения цистиназной активности коринебактерий.

Модифицированная среда Пизу для определения цистиназной активности коринебактерий запатентована как изобретение (№ 1877 А2, 15.12.2006 г.).

Список литературы

1. Фельдман Ю.М., Маханева Л.Г., Ляха А.И. Новая модификация среды Пизу для ускоренной идентификации *Corynebacterium diphtheriae* на основе среды АГВ // Лабораторное дело. — 1989 — № 4. — С. 69–70.
2. Фельдман Ю.М., Мельник Н.С. Способ ускоренной идентификации *Corynebacterium diphtheriae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1982. — № 3. — С. 18–20.

Ссылки 3–6 см. в References (с. 350). See References for numbers 3–6 at p. 350.

THE ACCELERATED METHOD FOR IDENTIFICATION OF PATHOGENIC CORYNEBACTERIUM

Gabrielyan S.A.

National Public Health Institute of Armenia Ministry of Health, Yerevan, Armenia

Abstract. The detection of cystinase activity is one of most important tests in the laboratory diagnosis of diphtheria, giving the opportunity to differentiate potential toxigenic species from other coryneform bacteria. The original recipe of Pizu media for detection of cystinase activity, proposed in 1939–1940, was modified several times (1982, 1989) for different reasons. In the last modification the Pizu media was prepared by using the AGV media as a nutritional base. We suggest a modification of Pizu media using Mueller-Hinton agar as nutritional basis. The Mueller-Hinton agar has a number of advantages: higher nutritional value, standardization, transparency and availability. A positive result is defined within 2–4 hours after inoculation of enough quantity of material (pure culture or *C. diphtheriae* in association with other microorganisms) as a brown halo surrounding black colonies. The brown halo does not appear in the upper part of the media (0,5–1 cm). The modified media was checked with 21 strains of *C. diphtheriae* (tox+), nine strains of coryneform bacteria, control strains NCTC 10648, NCTC 10356, NCTC 3984. The modified Pizu media is registered in the RA mental property agency as an invention (no. 1877 A2, 15.12.2006).

Key words: *Corynebacterium*, the cystinase activity, the modified nutrient medium.

Author:

Gabrielyan S.A. ✉, PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Scientific and Practical Center of Medicobiological Researches, National health care institute of Armenia Ministry of Health
0051, Armenia, Yerevan, Komitas str., 49, 4.
Phone: (3741) 23-69-01; (093) 32-74-89 (mobile).
E-mail: mbio@nih.sci.am; silva.gabrielyan.53@mail.ru

References

1. Fel'dman Yu.M., Makhaneva L.G., Lyabakh A.I. Novaya modifikatsiya sredy Pizu dlya uskorennoy identifikatsii *Corynebacterium diphtheriae* na osnove sredy AGV [The new modification of Pisu medium for rapid identification of *Corynebacterium diphtheriae* based on AGV medium]. *Laboratornoe delo — Laboratory diagnostics*, 1989, no. 4, pp. 69–70.
2. Fel'dman Yu.M., Mel'nik N.S. Sposob uskorennoy identifikatsii *Corynebacterium diphtheriae* [The method of rapid identification of *Corynebacterium diphtheriae*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii — Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1982, no. 3, pp. 18–20.
3. Boshoff H.M., Mizrahi V. Expression of *Mycobacterium smegmatis* pyrazinamidase in *Mycobacterium tuberculosis* confers hypersensitivity to pyrazinamide and related amides. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, no. 19, pp. 5479–5485.
4. Colman G., Weaver E., Efstratiou A. Screening tests for pathogenic corynebacteria. *J. Clin. Pathol.*, 1992, vol. 45, pp. 46–48.
5. Sulea I.T., Pollice M.C., Barksdale L. Pyrazine carboxylamidase activity in *Corynebacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, vol. 30, no. 2, pp. 466–472.
6. Wattiau P., Janssens M., Wauters G. *Corynebacterium simulans* sp. nov., a nonlipophilic, fermentative *Corynebacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, vol. 50, pp. 347–353.

Received 18.06.2013

Accepted 08.07.2013

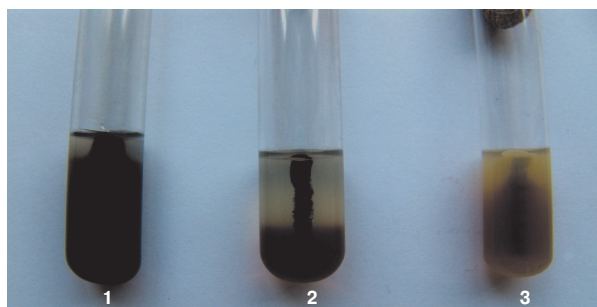


Рисунок. Сравнение результатов цистиазной активности коринебактерий с использованием модифицированной и классической среды Пизу

Примечания: 1 — положительный тест на модифицированной среде; 2 — отрицательный тест на модифицированной среде; 3 — положительный тест на немодифицированной (классической) среде.