

А.Б.Мазрухо, А.И.Шелухович, Г.Д.Харабаджакян, Г.Л.Карбышев, А.Н.Терентьев, В.Д.Кругликов, Л.В.Григоренко, В.В.Агафонова, И.К.Савельева, Д.И.Симакова, О.Г.Сокиркина, О.Г.Булахова, И.С.Егоренкова

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НОВОЙ ЭЛЕКТИВНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ (СЭДХ-М) ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ

ФГУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт»

Модернизирована ранее разработанная селективно-дифференциальная среда для культивирования *V. cholerae*. Показано, что модернизированная среда (СЭДХ-М) обладает необходимой чувствительностью и показателем прорастания. Рост на ней *E. coli* ингибировался полностью, а *P. vulgaris* – в значительной степени. Среда имеет выраженные дифференцирующие свойства: оранжевые колонии холерного вибриона четко отличаются от колоний сопутствующей микрофлоры. В лабораторных испытаниях среда СЭДХ-М продемонстрировала некоторые преимущества перед референс средой TCBS при выделении *V. cholerae* из контаминированных фекалий.

Ключевые слова: холера, селективные питательные среды, селективная среда для выделения холерного вибриона – СЭДХ-М, лабораторные испытания.

A.B.Mazrukho, A.I.Shelokhovich, G.D.Harabadzhakhian, G.L.Karbyshev, A.N.Terent'ev, V.D.Kruglikov, L.V.Grigorenko, V.V.Agaphonova, I.K.Savel'eva, D.I.Simakova, O.G.Sokirina, O.G.Bulakhova, I.S.Egorenkova

Evaluation of Biological Properties of New Selective Differential Medium for Cholera Vibrios Isolation Based on the Results of Laboratory Trials

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute

Previously developed selective differential medium for *V. cholerae* growth was modernized. The modernized medium called SDMV-M was shown to possess the required sensitivity and germination index. The growth of *E. coli* was entirely inhibited, that of *P. vulgaris* was inhibited considerably. The medium possessed good differentiating ability: orange *V. cholerae* colonies were clearly distinguished from concomitant microorganisms. In the laboratory trials SDMV-M demonstrated some advantages as regards *V. cholerae* isolation from contaminated faeces in comparison with the reference medium TCBS.

Key words: cholera, selective nutrient media, selective medium for *V. cholerae* isolation, laboratory trials.

В настоящее время предложены разнообразные селективные и селективные среды для выделения холерного вибриона от человека и из внешней среды. Лучшей среди них остается среда TCBS, разработанная около 50 лет назад и принятая ВОЗ в качестве референтной [2]. Данная среда обладает хорошими ростовыми, ингибирующими и дифференцирующими свойствами, стабильностью физико-химических показателей и надежностью в работе в стационарных и полевых условиях. В Ростовском противочумном институте разработана селективная среда СЭДХ, которая действующими Методическими указаниями МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» была регламентирована для проведения мониторинга холерных вибрионов в объектах внешней среды и исследования материала от людей.

Однако технологическая модификация производства одного из селективных компонентов среды (препарата «Прогресс») привела к изменению его свойств и сделала непригодным для использования в составе среды. В связи с этим была разработана новая среда с улучшенными селективными свойствами, получившая название СЭДХ-М (модернизированная).

Модернизация среды произведена за счет введения других, ранее не использовавшихся селективных агентов. Данное сообщение представляет результаты лабораторных испытаний среды.

Целью исследований является определение основных биологических показателей селективно-дифференциальной среды СЭДХ-М (чувствительность, показатель прорастания, скорость роста холерных колоний, ингибирующие и дифференцирующие свойства), а также оценка ее эффективности при исследовании испражнений от людей, искусственно контаминированных тест-штаммом холерного вибриона.

Материалы и методы

Испытания среды проводили в соответствии с утвержденной программой и действующими инструктивными материалами. Для испытаний представлено три серии сред, опыты проведены с трехкратной повторностью.

В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов, полученные из музея живых культур

РостНИПЧИ: *Vibrio cholerae* O1 P-1 классический биовар – тест-штамм; *V. cholerae* O1 M-878 биовар эльтор – тест-штамм; *V. cholerae* non O1 P-9741 – тест-штамм; *V. cholerae* O139 MO-45; *V. cholerae* O139 P-16064; *V. cholerae* O139 P-16131; *V. cholerae* O139 P-17918; *V. cholerae* O1 16 классический биовар; *V. cholerae* O1 569В классический биовар; *V. cholerae* O1 1a биовар эльтор; *V. cholerae* O1 И-33 биовар эльтор; *V. cholerae* O1 1 биовар эльтор; *V. cholerae* O1 P-5879 биовар эльтор; *V. cholerae* O1 P-14863 биовар эльтор; *Escherichia coli* 18 – тест-штамм; *Proteus vulgaris* НХ 19 N222 – тест-штамм; *V. alginolyticus* 13076; *V. parahaemolyticus* 17094; *V. mimicus* 133534; *Comamonas sp.* P-6101; *Plesiomonas sp.* P-1035; *Aeromonas sp.* 16024; *Pseudomonas aeruginosa* 14; *Klebsiella sp.* 6; *Salmonella typhi* 1289; *Shigella dysenteriae* 13; *Enterococcus sp.* 11.

Питательные среды

Опытная: СЭДХ-М – электро-дифференциальная среда для выделения холерных вибрионов.

Контрольные среды лабораторного приготовления: агар Мартена (рН 7,6) – неселективная среда для культивирования холерных вибрионов; ХДС-агар (рН 7,8) – неселективная среда для культивирования и выделения холерных вибрионов [1]; СЭДХ – электро-дифференциальная среда РостНИПЧИ для выделения холерных вибрионов, заранее отконтролированных на соответствие инструктивным требованиям. Контрольная коммерческая селективная среда ТСBS – референтная среда ВОЗ, производства «Мерк» Германия [3].

Выращивание культур холерных вибрионов и приготовление их взвесей проводили согласно действующей инструкции. Штаммы микроорганизмов, не относящихся к вибрионам, инкубировали на соответствующих средах, их взвеси приготавливали в растворе хлорида натрия с помощью стандартного образца мутности ОСО 42-28-85-09П (2009).

Биологические показатели среды и критерии оценки

Для определения показателя чувствительности (наличие роста культуры при максимальном разведении взвеси клеток) производили высеv трех тест-штаммов холерного вибриона из разведений культур (начальная концентрация клеток 10^9 м.к.) 10^{-6} и 10^{-7} в объеме 0,1 мл, учет производили в течение 18 ч. На чувствительной среде должен отмечаться специфический рост культуры в виде типичных колоний диаметром не менее 1,0–1,5 мм.

Показатель прорастания определяли по количественному росту колоний на чашках при высеvе 10^2 и 10 м.к штаммов холерного вибриона. Согласно действующим стандартам при посеве 10^2 м.к. должно вырасти не менее 30 типичных колоний холерных вибрионов (30 %) диаметром минимум 1–1,5 мм, 10 м.к. – единичные колонии. При этом популяция должна быть стабильной: из сотни колоний не должно быть более двух атипичных по морфологии.

Скорость роста колоний тест-штаммов холер-

ного вибриона (посев 10^2 м.к.) оценивали по минимальному времени, в течение которого вибрионы образовывали типичные колонии диаметром не менее 1,0 мм.

Указанные показатели как опытной среды, так и сред сравнения изучались также еще на 11 музейных штаммах холерного вибриона.

Для выявления показателя ингибиции и дифференцирующих свойств среды производили одновременный посев на чашки контрольного штамма холерного вибриона *V. cholerae* O1 M-878 биовара эльтор и микробов-ассоциантов *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Электро-питательная среда при посеве в объеме 0,1 мл смеси, содержащей холерный вибрион в концентрации 10^3 м.к./мл, а также кишечную палочку и протей – по 10^7 м.к./мл, должна обеспечивать рост холерного вибриона и полностью подавлять рост кишечной палочки. Допускается рост изолированных колоний указанного штамма протей. Должна наблюдаться четкая дифференциация представителей рода *Vibrio* от протей по морфологии и окраске колоний.

Для дополнительной характеристики ингибирующих и дифференцирующих свойств среды СЭДХ-М производились посевы указанного штамма холерного вибриона в той же дозе и сопутствующей смеси микроорганизмов-ассоциантов – кишечной палочки и протей, взятых в более высокой концентрации по сравнению с той, которая предусмотрена нормативными условиями испытаний. Ассоцианты высевались на чашку по 0,1 мл из пробирок с концентрациями 10^{10} м.к./мл. Помимо этого, способность среды СЭДХ-М выявлять холерные вибрионы проверялась при посеве испражнений здорового человека, разведенных до концентрации 10 МЕ мутности стандарта ОСО 42-28-85-09 П, что соответствует $0,93 \cdot 10^9$ м.к./мл для микробов кишечной группы, и искусственно контаминированных культурой холерного вибриона *V. cholerae* O1 M-878 биовара эльтор до концентрации 10^3 м.к./мл. В этом случае высеv 0,1 мл взвеси испражнений соответствовал посеву на пластинку среды 10^2 м.к. холерного вибриона.

Для проверки ингибирующих свойств среды СЭДХ-М по отношению к морфологически сходным с вибрионами микроорганизмам (комамонас, плезимонос, аэромонас), некоторых галофильных вибрионов, псевдомонад, сальмонелл, клебсиелл, шигелл, протей, кишечной палочки и энтерококка производили их посев по 10^6 м.к. на чашку с параллельным высеvом холерного вибриона в дозе 10^2 м.к. Результаты опыта учитывали после инкубации в термостате в течение 24 ч.

Результаты и обсуждение

Приготовленная среда СЭДХ-М представляет собой непрозрачную агаровую пластинку черного фиолетового цвета, рН (8,4±0,1). Микроорганизмы

Таблица 1

Показатели прорастания среды СЭДХ-М и сред сравнения для холерных вибрионов

Биовар холерных вибрионов	Кол-во штаммов	Кол-во выросших колоний на средах при посеве 100 и 10 м.к. (соответственно числитель и знаменатель), М±m, P – 0,05				
		СЭДХ-М	Агар Мартена	ХДС-агар	СЭДХ	TCBS
Классический	3	31±3 4±1	40±4 6±1	39±4 3±1	47±3 5±1	38±2 3±1
Эль Тор	6	43±2 3±1	40±2 6±1	35±2 4±1	43±3 5±1	36±2 4±1
O139	4	38±2 3±1	48±1 4±1	38±1 3±1	40±2 4±1	41±1 3±1
Non O1	1	40±1 3±1	50±1 4±1	35±1 4±1	30±1 5±1	32±3 2±1

Примечание. В числе испытанных культур холерных вибрионов находились три тест-штамма.

рода *Vibrio* образуют на среде СЭДХ-М колонии оранжевого цвета, при рассматривании в стереомикроскоп с косым верхним освещением – оранжевые с темно-коричневым центром и узким ободком синеватой прозрачной периферии, гладкие, блестящие, выпуклые, при пробе иглой образуется короткий тяж («полувязкость»). Для колоний вибрионов на данной среде не характерно тускло-желтоватое свечение, жидковатая консистенция без тяжа, гомогенность без синеватого пояса периферии и темно-коричневого центра. Колонии оранжевых типичных холерных вибрионов хорошо агглютинируются соответствующими О-холерными сыворотками в реакции агглютинации на стекле. Микроскопически в материале из оранжевых колоний – типичные грам-отрицательные подвижные вибрионы.

Результаты, отражающие биологические показатели и эффективность выделения холерных вибрионов из различных смесей и субстратов на проверяемой среде СЭДХ-М и средах сравнения, представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 1, показатели прорастания СЭДХ-М и других сравниваемых сред по отношению к 14 испытанным штаммам холерных вибрионов, включая и три контрольных, соответствовали требуемой норме. Все испытанные среды (опытная

и контрольные) характеризовались достаточной чувствительностью в отношении всех взятых в работу штаммов: при посеве 10 м.к. выростали единичные колонии холерного вибриона. Все колонии холерных вибрионов обладали морфологией, характерной для соответствующих сред: оранжевые, гладкие – на СЭДХ-М, желтые, гладкие – на СЭДХ и TCBS, полупрозрачные и прозрачные, гладкие – на агаре Мартена и ХДС-агаре.

Скорость роста холерных вибрионов на среде СЭДХ-М, СЭДХ и TCBS составила 14–16 ч, на среде Мартена и ХДС-агаре – 12 ч, когда их колонии достигали 1,0 мм в диаметре и отличались типичной для соответствующих сред морфологией. Атипичных колоний не зарегистрировано.

В табл. 2 представлены данные, характеризующие ингибирующие и дифференцирующие свойства испытываемых сред, т.е. способность их к селективному выявлению холерного вибриона в присутствии микробов-ассоциантов. При посеве требуемых инструкцией смесей холерного вибриона (10² м.к.), кишечной палочки и протей (по 10⁶ м.к.) на чашках со средой СЭДХ-М выростало не менее 30 оранжевых колоний холерных вибрионов диаметром до 2,0 мм, рост ассоциантов подавлялся. Аналогичный результат был получен и на среде TCBS. На среде СЭДХ ингибция

Таблица 2

Элективное выделение холерных вибрионов на среде СЭДХ-М и средах сравнения из искусственных смесей с *E. coli* и *P. vulgaris* и с нативными испражнениями здорового человека

Состав смеси и исходные концентрации микроорганизмов, м.к./мл	Кол-во микроорганизмов в 0,1 мл посева, м.к.	Рост колоний ХВ и другой микрофлоры через 14–16 ч на средах:			
		СЭДХ-М	Агар Мартена	СЭДХ	TCBS
<i>V. cholerae</i> O1 М-878 биовар эльтор – 10 ⁵	10 ²	40±2 оранжевых колоний ХВ*	Рост в виде газона <i>E. coli</i> и <i>P. vulgaris</i>	2 желтые колонии ХВ в газоне роста <i>E. coli</i> и <i>P. vulgaris</i>	32±1 желтые колонии ХВ
<i>E. coli</i> 18 – 10 ⁷	10 ⁶				
<i>P. vulgaris</i> НХ 19 № 222 – 10 ⁷	10 ⁶				
<i>V. cholerae</i> O1 М-878 биовар эльтор – 10 ³	10 ²	42±3 оранжевых колоний ХВ	Рост в виде газона <i>E. coli</i> и <i>P. vulgaris</i>	Рост в виде газона <i>E. coli</i> и <i>P. vulgaris</i>	1 желтая колония ХВ в газоне роста <i>P. vulgaris</i> зеленого цвета
<i>E. coli</i> 18 – 10 ¹⁰	10 ⁹	40–60 мелких черных колоний <i>P. vulgaris</i>			
<i>Pr. vulgaris</i> НХ 19 № 222 – 10 ¹⁰	10 ⁹				
<i>V. cholerae</i> O1 М-878 биовар эльтор – 10 ³	10 ²	26±2 оранжевых колоний ХВ	Рост газонном кишечной флоры	1 желтая колония ХВ в газоне роста кишечной флоры	12±1 желтых колоний ХВ
Испражнения, разведенные примерно до 10 ⁹	10 ⁸				

*ХВ – холерный вибрион.

микробов-ассоциантов была слабой, что значительно затрудняло поиск колоний холерных вибрионов.

Увеличение посевной дозы кишечной палочки и протей до 10^9 м.к. при прежней дозе холерного вибриона несколько снижало ингибирующую активность среды СЭДХ-М – на чашке появлялось до 60 мелких черноватых колоний протей, которые, однако, не мешали росту, обнаружению и снятию иглой 40 оранжевых колоний холерных вибрионов. Для облегчения последней процедуры необходим стереомикроскоп с косым освещением. Кишечная палочка на данной среде ингибировалась полностью. Среда TCBS при посевах столь высоких концентраций ассоциантов позволяла выявлять лишь единичные желтые колонии холерных вибрионов среди густого роста протей голубовато-зеленоватого цвета, т.е. по элективности была немного слабее опытной среды. Среда СЭДХ по этому свойству полностью уступала средам СЭДХ-М и TCBS.

Сходные результаты получены и при посеве контаминированных тест-штаммом холерного вибриона испражнений здорового человека. В этом случае среда СЭДХ-М оказалась также несколько более эффективной, чем TCBS. Среда СЭДХ, как и в предыдущем случае, была недостаточно элективной.

Среда СЭДХ-М подавляла рост *V. parahemolyticus*, *V. mimicus* и значительно тормозила рост *V. alginolyticus*, при этом окраска колоний последнего была темно-бурой. *Comamonas sp.* и *Plesiomonas sp.* подавлялись полностью, *Aeromonas sp.* вырастал на среде в виде мелких колоний желтоватого цвета, которые легко можно было отличить от оранжевых колоний вибрионов. Псевдомонады, клебсиеллы, сальмонеллы, шигеллы и кишечная палочка на данной среде не росли. Протей прорастал в виде черных мелких колоний. *Enterococcus sp.* только при посеве весьма высоких концентраций микроба (10^9 м.к.), рос на среде СЭДХ-М в виде очень мелких сероватых колоний, легко отличимых от холерных вибрионов.

В результате проведенных лабораторных ис-

пытаний установлено, что испытуемая элективно-дифференциальная среда СЭДХ-М по показателям чувствительности и прорастания, а также скорости роста колоний холерного вибриона соответствует требованиям Методических указаний МУ 3.3.2.2124-06 и не уступает контрольным средам: неселективным – агару Мартена и ХДС и селективной – референтной среде ВОЗ – TCBS, а по показателю ингибиции микробов-ассоциантов и дифференцирующему свойству несколько превосходит последнюю. Предполагается апробация среды СЭДХ-М в ходе мониторинга водных объектов внешней среды на наличие холерного вибриона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазрухо А.Б., Каминский Д.М., Телесманич Н.Р. Использование новых питательных сред на этапах подготовки сотрудников специализированных противоэпидемических бригад к работе в зонах чрезвычайных ситуаций. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2010; 3:75–80.
2. American Society for Microbiology. Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. 1985.
3. MERCK Microbiology Manual. Darmstadt; 1996. 405 p.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Mazrukho A.B., Kaminskii D.M., Telesmanich N.R. [Application of new nutrient media at different stages of training of specialized anti-epidemic teams personnel for work in emergency situations zones]. Mediko-Biol. Socio-Psykhol. Probl. Bezop. Chrezv. Sit. 2010; 3: 75–80.

Authors:

Mazrukho A.B., Shelokhovich A.I., Harabadzhakhian G.D., Karbyshev G.L., Terent'ev A.N., Kruglikov V.D., Grigorenko L.V., Agaphonova V.V., Savel'eva I.K., Simakova D.I., Sokirina O.G., Bulakhova O.G., Egorenkova I.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. M.Gor'kogo St., 117/40, Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Мазрухо А.Б., Шелохович А.И., Харабаджакян Г.Д., Карбышев Г.Л., Терентьев А.Н., Кругликов В.Д., Григоренко Л.В., Агафонова В.В., Савельева И.К., Симакова Д.И., Сокиркина О.Г., Булахова О.Г., Егоренкова И.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 09.03.11.