

РАЗРАБОТКА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *B. PETRII*

DEVELOPMENT OF A DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC MEDIUM FOR IDENTIFICATION OF BACTERIA OF THE SPECIES *B. PETRII*

A. Lomakin
D. Vasilev
A. Mastilenko
A. Schestakow

Summary. The article is devoted to the development of the development of a differential diagnostic medium for the identification of bacteria of the species *Bordetella petrii*. The developed selective medium allows the identification of *B. petrii* bacteria within 48–72 hours. The developed nutrient media are specific in relation to bacteria-associates of other species and genera. The optimal composition of the medium is (per liter): sodium gluconate –20 g, casein hydrolyzate-3 g, yeast extract-1 g, monosubstituted potassium phosphate –1 g, bromothymol blue-0.08 g, bacteriological agar-15 g, cephalixin-0~<0.02 g. The indicator of the medium sensitivity is about 100 microbial cells.

Keywords: *Bordetella*, *B. petrii*. differential diagnostic environment, identification, substrat.

Ломакин Артём Андреевич

Аспирант, Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина
 artemy.lomakin@yandex.ru

Васильев Дмитрий Аркадьевич

Д.б.н, профессор, Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина
 dav_ul@mail.ru

Мастиленко Андрей Владимирович

К.б.н, доцент, Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина
 mav0608@yandex.ru

Шестаков Андрей Геннадьевич

К.б.н, доцент, Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина
 andrewschestakov@yandex.ru

Аннотация. Статья посвящена разработке дифференциально-диагностической среды для идентификации бактерий вида *Bordetella petrii*. Разработанная селективная среда позволяет выявить бактерии *B. petrii* в течении 48–72 часов. Разработанные питательные среды специфичны по отношению к бактериям-ассоциантам других видов и родов. Оптимальным составом среды является (на литр): глюконат натрия –20 г, гидролизат казеина- 3 г, дрожжевой экстракт- 1 г, калий фосфорнокислый однозамещенный –1г, бромтимоловый синий-0,08 г, агар бактериологический-15 г, цефалексин-0,02 г. Показатель чувствительности среды составляет около 100 микробных клеток.

Ключевые слова: Бордетелла, *B. petrii*. дифференциально -диагностической среда, идентификация, субстрат.

Введение

Бактерии *B. petrii* это неподвижные, грамотрицательные, преимущественно короткие или кокковидные палочки, в редких случаях более длинные и более широкие формы, которые иногда встречаются в виде цепочек. Обладают способностью к росту в температурном диапазоне от 25 °С до 42°С [4,8,9]. В отличие от других представителей рода растет и в анаэробных условиях при 30°С. При культивировании бактерий при 15 °С наблюдалось снижение активности роста, за исключением выделенных штаммов из объектов внешней среды [5].

Впервые бактерии вида *B. petrii* были выделены из окружающей среды (морских губках, травяные консорциумы, источников подземных вод, полигонов с отходами), позже появились сообщения выделении от людей с ослабленным иммунитетом, муковисцидозом и хронической легочной болезнью [3,6]. В работе Mahmoud F. Samy (2017) сообщалось о случае выделения этого патогена из молока верблюдов. Косвенно может свидетельствовать о возможности в участие в инфекционных процессов у животных. Тем не менее, роль *B. petrii* в инфекционной патологии все еще неясно. Этим и обусловлен наш интерес к данному виду микроорганизма [7].

Нами при анализе отечественной литературы не была найдена информация о схемах выделения бактерии *B. pertussis*. Если опираться на нормативные документы, то основными параметрами для дифференциальной диагностики, представленные в МР 3.1.2.0072–13 «Диагностика коклюша и паракоклюша» служат следующие признаки: рост на кровяном агаре, оксидазная активность, уреазы, тирозиназа, восстановление нитратов, утилизация цитратов и подвижность. В качестве питательной среды для посева исследуемого материала применяют картофельно-глицериновый агар (среда Борде-Жангу) и казеиново-угольный агар (КУА). Так же к среде добавляют в среды дефибрированную лошадиную или баранью кровь: в среду Борде-Жангу — 20%, в КУА — 10%. В качестве селективных добавок используют пенициллин или цефалексин (*Bordetella selective supplement*).

В нормативном документе «Лабораторном руководстве по диагностике коклюша, вызванного *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis*» (2014) Всемирной Организации Здравоохранения транспортной средой служит Regan-Lowe medium (угольная среда), для дифференциальной диагностики видов указанного рода используют Regan-Lowe Agar с добавлением цефалексина 0,4 мг/мл и 2,5 мл крови, так же применяют среду Борде-Жангу с добавлением крови и цефалексина. Свойствами для дифференциации *B. pertussis* от других видов, согласно этому нормативному документу, служат: неподвижность, рост на колумбийском агаре, среде МакКонки, и образование желтого пигмента [10]. В свою очередь является странным, что в этом списке свойств выделено образование желтого пигмента, потому что в статьях, опубликованных по данной тематике, не было указано о наличие такого признака, как пигментообразование (N.K Fry(2005), J.A Sáez-Nieto(2016), S. S. Kwon(2015)).

В британских медицинских указаниях «UK Standards for Microbiology Investigations Identification of *Bordetella* species» (2015) представлена схема диагностики видов бордетелл. На первом этапе посев полученного материала производится на угольный агар с добавлением цефалексина и культивируют в течении 3–7 суток при температуре 35–37°C. Колонии бордетелл будут гладкие, выпуклые, жемчужные, блестящие, серовато-белые и иметь маслянистую консистенцию. Следующим этапом проводят окраску по Граму и проверку наличия у выделенной бактерии фермента оксидазы. После этого этапа проводят серологическое типирование. Так же в ряде случаев проводят MALDI-TOF масс-спектрометрию и амплификации нуклеиновых кислот (NAAT). Дальнейшими этапами в электрофорез в пульсирующем поле, методы MLVA и секвенирование 16s рНК.

Для выделения и идентификации бактерий рода *Bordetella* в работах зарубежных авторов были ис-

пользованы Stainer Scholte Medium(S.M. Basheer,2015), Charcoal-Agar (Martini H. et al, 2017), Smith-Baskerville medium (Shin E.K. et al., 2007). В качестве селективного компонента обычно используют цефалексин.

Цель данной работы

Разработка дифференциально-диагностической среды для выделения и идентификации бактерий вида *B. pertussis*.

Для достижения поставленной цели нужно решить следующие задачи:

1. Подбор источников углерода и азота для дифференциально-диагностической среды, для идентификации бактерий вида *Bordetella pertussis*;
2. Подбор оптимальной концентрации селективного компонента (цефалексина) для дифференциально-диагностической среды
3. Определение чувствительности среды для идентификации бактериальных клеток *Bordetella pertussis*.

Материалы

Штаммы: в работе был использован референс-штамм *Bordetella pertussis*

ATCC BAA-461, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы УлГАУ.

Помимо этого, при определении специфичности сконструированных сред, а также в других исследованиях использовались штаммы бактерий- ассоциантов: *Escherichia coli* 078, *Yersinia enterocolitica* ATCC-23715, *Pseudomonas aeruginosa* 7, *Acinetobacter johnsonii* 105, *Serratia marcescens* 5, *Proteus mirabilis* 201, *Salmonella enteritidis* ATCC-13076, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Alcaligenes* spp B-5269, *Klebsiella pneumoniae* C 6, *Bacillus subtilis* 104, *Enterococcus faecalis* ATCC-29212, *Listeria monocytogenes* 766 № 367, *Bordetella bronchiseptica* 22067, *Bordetella avium* ATCC BAC103, *Bordetella hinzii* ATCC461, *Bordetella holmesii* ATCC51541, *Bordetella trematum* ATCC700309.

Для оценки роста *Bordetella pertussis* на различных средах их культивировали при температуре 36–37°C, агар LB по Lennox с соевым пептоном (Difco, BD), Бульон LB по Lennox (Difco, BD), глюконат натрия (Sigma-Aldrich, Франция), гидролизат казеина (TMmedia, Индия), дигидрофосфат калия (PanReac AppliChem, Германия), (PanReac AppliChem, Германия), натрия хлорид (PanReac AppliChem, Германия), дрожжевой экстракт (Россия),

бромтимоловый синий, агар бактериологический (Испания).

Результаты и обсуждение

Согласно литературным данным [1,2] и результатам исследований, полученных нами оптимальным источником углевода для роста бактериальных клеток служит глюконат и гидролизат казеина в качестве источника азота. Глюконат и гидролизат казеина были использованы из-за того, что бактерии *B. petrii* растут на коммерческих средах с этими субстратами в течении малого временного периода и с большой урожайностью. Поэтому нами был проведен подбор концентраций этих соединений. В первом варианте «Среда 1» использован глюконат натрия в концентрации 10 грамм на литр и гидролизата казеина в концентрации 1 грамм на литр, во втором «Среда 2»- глюконат натрия –15 г/л и гидролизат казеина-2 г/л, в третьем «Среда 3» глюконат натрия –20 г/л и гидролизат казеина-3 г/л, в четвертом варианте «Среда 4» глюконат натрия –40 г/л и гидролизат казеина-4 г/л,

В качестве базовой основы среды, которая выполняет роль минимального источника питательных веществ, поддержание калиево-фосфатного баланс и наделяет дифференциально-диагностическими свойствами, был использован дрожжевой экстракт в количестве 1 г/л, калий фосфорнокислый однозамещенный –1г/л, бромтимоловый синий-0,08 г/л, агар бактериологический-15 г/л. Дрожжевой экстракт служит источником питательных веществ для стимуляции роста бактериальных клеток, калий фосфорнокислый поддерживает калиево-фосфатный баланс в клетке, бромтимоловый синий-элективный компонент среды.

Для изучения на способность *Bordetella petrii* ATTC BAA-461 к росту на данных средах было проведено культивирование при 37°C в течении 72 часов. На всех чашках был рост через 24 часа в начале штриха. Через 48 часов инкубирования рост бактерий был с образованием отдельных колоний на всех вариантах тестируемых сред.

При этом стоит отметить что при выращивании *B. petrii* на данных типах среды колонии имеют 2 разных морфотипа: первые- серые, мелкие (диаметром 1–2 мм), выпуклые, с ровным краем, глянцевые. Вторые — сине-зеленые с белым краем, плоские, с неровным краем, глянцевые. На наш взгляд, обусловлено тем, что в среде присутствуем два источника углерода (гидролизат казеина и глюконат натрия). Изменение цвета среды связано с окислением глюконата натрия и накоплением продукта метаболизма бактерий 2-кето-глюконата в среде. Гидролизат казеина и дрожжевой экстракт обеспечивают

бактерии азотом и другими питательными веществами, необходимыми для поддержки роста. Дикалий гидрофосфат служит источником калия и фосфора. Изменение цвета индикатора бромтимолового синего указывает на наличие или отсутствие фермента отвечающего за утилизацию глюконата натрия. В случае, если у бактерий данный фермент отсутствует цвет среды изменяется на желтый. При наличии этого фермента у бактерий цвет среды изменяется с зеленого на синий, и колонии обладают следующим морфотипом: сине-зеленые с белым краем, плоские, с неровным краем, глянцевые.

Следующим этапом нашего исследования была изучена чувствительность данных питательных сред. Для этого было произведено титрование *Bordetella petrii* ATTC BAA-461, выросших LB-бульоне, через 24 часа культивирования. Показатель урожайности *B. petrii* на LB-бульоне в 1 мл составил $7 \cdot 10^7$ клеток.

Рост бактерий на разработанных средах был через 48 часов культивирования при температуре 37°C. Нами было установлено, что рост бактериальных колоний на «Среде 1» был только на чашках с пятым и шестым разведениями. Показатель КОЕ оставил $9 \cdot 10^6$. На «среде 2» наблюдаемая картина была идентичной той, что была на «среде 1». Показатель КОЕ составил $1,1 \cdot 10^7$. Так как роста колоний не было на чашках с седьмым разведением на среде «1» и «2».

На «среде 3» через 48 часов культивирования рост был на чашке с пятого по седьмое разведение. Количество выросших на поверхности чашки колоний составило 3 (КОЕ $-3 \cdot 10^7$). На «среде 4» на чашке с седьмым разведением показатель колониеобразующих единиц оставил $1 \cdot 10^7$.

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что наиболее оптимальной основой для является среды концентрации глюконата натрия и гидролизата казеина, используемые в «среда 3» Такой вывод можно сделать исходя из полученных нами показателей колониеобразующих единиц. На «среде 1» и «среде 2» этот показатель составил 10^6-10^7 . На среде «3» и «4» показатель 10^7 , только на этих двух средах был рост бактериальных клеток в чашках с седьмым разведением (Таблица 1). Из-за того, что среды «3» и «4» обладают одинаковой чувствительностью, не является целесообразным использовать «среду 4», т.к. увеличение концентрации компонентов в питательной среде не повысило ее чувствительность.

Для изучения дифференциально -диагностических свойств «среды 3» был произведен посев следующих бактерий: *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *Alcaligenes spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia*

Таблица 1. Специфичность «среды 3», содержащей 20 г/л глюконата натрия и 3 г/л гидролизата казеина, для идентификации *B.petrii*

Бактерии	Рост	Цвет колоний
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Через 48 часов	Синий
<i>Bordetella holmesii</i>	Подавлен	
<i>Bordetella avium</i>	Подавлен	
<i>Bordetella trematum</i>	Подавлен	
<i>Bordetella hinzii</i>	Через 48 часов	Синий
<i>Alcaligenes spp</i>	Подавлен	
<i>Escherichia coli</i>	Через 24 часов	Желтый
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Через 24 часов	Желтый
<i>Citrobacter freundii</i>	Через 24 часов	Желтый
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Через 72 часов	Желтый
<i>Salmonella enteritidis</i>	Через 24 часов	Желтый
<i>Seracia marcescens</i>	Через 24 часов	Синий
<i>Proteus mirabilis</i>	Через 24 часов	Желтый
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Подавлен	
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Подавлен	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Через 24 часов	Синий
<i>Listeria monocytogenes</i>	Через 48 часов	Желтый
<i>Staphylococcus aureus</i>	Подавлен	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Подавлен	
<i>Bacillus subtilis</i>	Подавлен	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Через 24 часов	Желтый

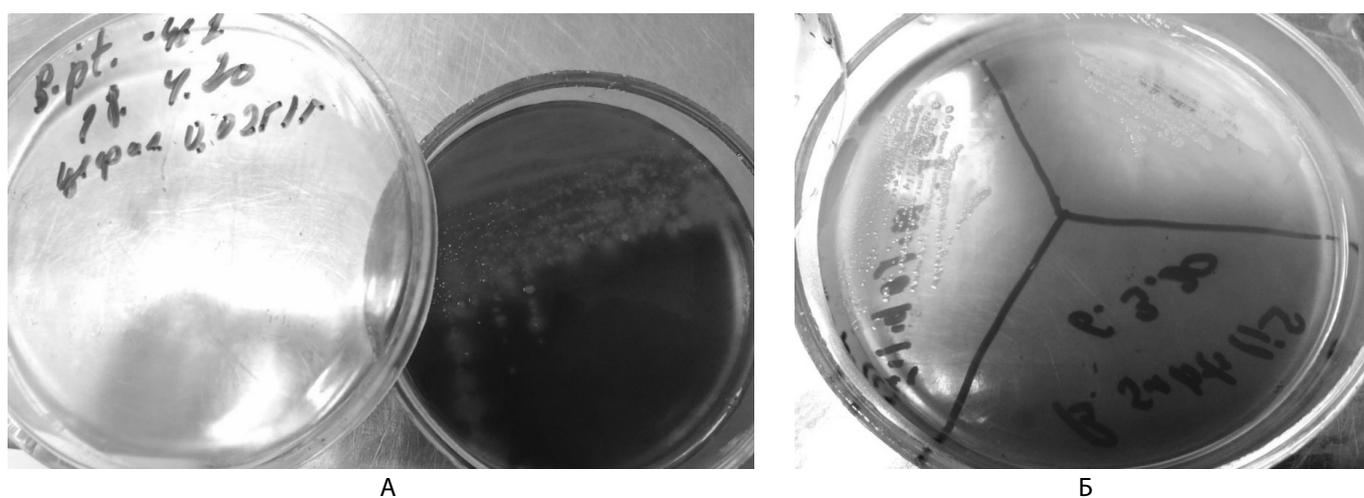


Рис. 1. А-Рост бактерий *B.petrii* на среде 3 с цефалексином в концентрации 0,02 грамма на литр через 48 часов культивирования при температуре 37°C. Б- Рост бактерий (по часовой стрелке) *B. subtilis* 104, *Pr. mirabilis* 201, *E.coli* 078 на среде 3 через 48 часов культивирования при температуре 37°C.

pseudotuberculosis, *Salmonella enteritidis*, *Seracia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter johnsonii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*. Результаты представлены в таблице 2.

Из выше приведённой таблицы можно сделать вывод, что на «среде 3» подавляется рост таких бактерий *B. subtilis*, *St. aureus*, *E. faecalis*, *Alcaligenes spp*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter johnsonii* и ряд представителей рода *Bordetella* (*B. holmesii*, *B. avium*, *B. trematum*). Бактерии, за исключением *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *Ps. aeruginosa*, *S. marcescens*, растут через 24–72 часа культивирования с образованием желтых колоний и окислением продуктами жизнедеятельности среды (Рисунок 1). Бактерии *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *Ps. aeruginosa*, *S. marcescens* при тех же условиях защелачивают среду. В случае *B. bronchiseptica* и *B. hinzii* это связано, что бактерии способны утилизировать только гидролизат казеина, *Ps. aeruginosa* и *S. marcescens* окисляют глюконат натрия.

Исходя из анализа литературы, нами был выбран в качестве селективного компонента цефалексин. В ходе исследования были использованы его следующие концентрации 0,02 и 0,04 грамма на литр. Эти концентрации были добавлены к «среде 3». Изучение чувствительности среды для идентификации клеток *Bordetella petrii* использован метод описанный выше. Показатель КОЕ *B. petrii* в LB-бульоне после 24 часов культивирования составил $2 \cdot 10^8$. Экспериментально нами было установлено, что при добавлении 0,02 грамм цефалексина к среде 3 на чашке с шестым разведением выросло 2 колонии (КОЕ $2 \cdot 10^6$). При добавлении 0,04 грамм цефалексина КОЕ составило $1 \cdot 10^5$. Таким образом чувствительность «среды 3» с цефалексином составила 100 бактериальных клеток.

При добавлении к среде 3 цефалексина в количестве 0,02 г/л подавляется рост следующих бактерий: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*.

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что на среде «3» с цефлексином подавляется рост следующих бактерий: *B. subtilis*, *St. aureus*, *E. faecalis*, *Alcaligenes spp*, *Aeromonas salmonicida*, *Acinetobacter johnsonii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, ряд представителей рода *Bordetella* (*B. holmesii*, *B. avium*, *B. trematum*). Такая селективность обусловлена используемым в среде источником углерода (глюконатом натрия) и селективным компонентом, цефалексином.

По результату проведённой работы нами была предложена среда со следующим составом (на литр): глюконат натрия –20 г, гидролизат казеина– 6 г, дрожжевой экстракт– 1 г, калий фосфорнокислый однозамещенный –1г, бромтимоловый синий–0,08 г, агар бактериологический–15 г, цефалексин–0,02 г. Нами рекомендован следующий способ приготовления. Основу среды без цефалексина автоклавируют в течении 20 минут при 121⁰С. После охлаждения среды до 40–50⁰С добавить селективный компонент.

ВЫВОДЫ

По результату проведенных исследований нами была разработана дифференциально-диагностическая среда для идентификации *Bordetella petrii*. Оптимальным составом среды является (на литр): глюконат натрия –20 г, гидролизат казеина– 3 г, дрожжевой экстракт– 1 г, калий фосфорнокислый однозамещенный –1г, бромтимоловый синий–0,08 г, агар бактериологический–15 г, цефалексин–0,02 г. Показатель чувствительности среды составляет около 100 микробных клеток. На среде «3» с цефлексином подавляется рост следующих бактерий: *B. subtilis*, *St. aureus*, *E. faecalis*, *Alcaligenes spp*, *A. salmonicida*, *A. johnsonii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *S. enteritidis*, *P. mirabilis*, *Str. pyogenes*, ряд представителей рода *Bordetella* (*B. holmesii*, *B. avium*, *B. trematum*). Такая селективность обусловлена используемым в среде источником углерода (глюконатом натрия) и добавлением селективного компонента цефалексина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мاستиленко А.В., Ломакин А. А., Пронин К. Н. Изучение биологических свойств бактерий видов *B. petrii* и *B. trematum* //Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. — 2018. — № . 3 (43).
2. Мастиленко А.В., Ломакин А. А., Шестаков А. Г. Исследование метаболизма *Bordetella petrii* при росте на различных источниках углерода и азота //Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. — 2019. — № . 4 (48).
3. Hamidou Soumana I., Linz B., Harvill E. T. Environmental origin of the genus *Bordetella* //Frontiers in microbiology. — 2017. — Т. 8. — С. 28.
4. Lechner M. Charakterisierung des Umweltkeims *Bordetella petrii*. Untersuchungen zur genomischen Variabilität und zum Bvg Regulon. — 2008.
5. Lechner M. et al. Genomic island excisions in *Bordetella petrii* //BMC microbiology. — 2009. — Т. 9. — № . 1. — С. 141.

6. Linz B. et al. Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species // *BMC genomics*. — 2016. — Т. 17. — №. 1. — С. 767.
7. Samy M.F. et al. Microbial Quality and Molecular Identification of Pathogenic Bacterial Strains Collected from Raw Camel's Milk in Taif Region // *Journal of Camel Practice and Research*. — 2017. — Т. 24. — №. 1. — С. 89–98.
8. Tazato N. et al. Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. — 2015. — Т. 65. — №. 12. — С. 4830–4838.
9. von Wintzingerode F. et al. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. — 2001. — Т. 51. — №. 4. — С. 1257–1265.
10. World Health Organization et al. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *bordetella pertussis*/*bordetella parapertussis*: update 2014. — World Health Organization, 2014. — №. WHO/IVB/14.03

© Ломакин Артём Андреевич (artemy.lomakin@yandex.ru), Васильев Дмитрий Аркадьевич (dav_ul@mail.ru),
Мастиленко Андрей Владимирович (mav0608@yandex.ru), Шестаков Андрей Геннадьевич (andrewschestakov@yandex.ru).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина