

---

---

# МІКРОБІОЛОГІЯ

---

УДК 579.852.13: 616.34-002-078

Воронкіна І. А., Дяченко В. Ф., Городницька Н. І., Кхедер С. С., Бирюкова С. В.

## ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИДІЛЕННЯ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* З ДОСЛІДЖУВАНОГО МАТЕРІАЛУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ З РІЗНИМИ ПОЖИВНИМИ СЕРЕДОВИЩАМИ

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології

ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

anaerob.lab@ukr.net

Робота є частиною НДР «Удосконалення бактеріологічних методів виділення токсигенних штамів *Clostridium difficile*» (шифр роботи НАМН 138/2017, державний реєстраційний номер 0117U002282).

**Вступ.** Захворювання, пов'язані з *Clostridium difficile* інфекцією, представляють собою серйозну проблему для сучасної медицини. Основною передумовою розвитку цих захворювань вважається прийом антибіотиків та інших препаратів, що пригнічують нормальну мікрофлору кишківника та сприяють швидкому розвитку клостридіальної інфекції [4,2].

Ентероколіти, обумовлені *C. difficile*, вважаються нозокоміальними захворюваннями, внутрішньо-лікарняні випадки можуть мати епідемічний характер, а при виникненні спалахів можуть охоплювати до 30% від числа всіх пацієнтів стаціонару [5]. Діагноз захворювання встановлюється за сукупністю клінічної картини з ознаками ентероколіту або псевдомембранозного коліту (ендоскопічно) та за допомогою бактеріологічних та інших лабораторних методів діагностики [1,3]. Найбільш часто використовують методи імуноферментного виявлення антитіл до токсинів *C. difficile* у фекаліях (ІФА), ПЛР – для пошуку генів, кодуєчих продукцію токсинів, та методи встановлення ферментів або продуктів життєдіяльності мікроорганізмів *C. difficile*, найчастіше – метод визначення глутаматдегідрогенази (ГДГ) [10].

Але всі перераховані методи мають свої обмеження. Так, метод ІФА має відносно невисоку чутливість, обумовлену антигенною гетерогенністю циркулюючих штамів. Специфічність та чутливість різних тест-систем ІФА варіюють від 40 до 100%. Відмічається, що метод ампліфікації ДНК (ПЛР) призводить, в значній мірі, до гіпердіагностики, бо виявлення локусів токсигенності не завжди корелює з експресією цих генів. Метод визначення ГДГ також може призводити до гіпердіагностики в зв'язку з тим, що глутаматдегідрогеназа – це метаболічний фермент, схожий на аналогічні ферменти інших клостридій, особливо *Clostridium sordelli*. Тому цей метод може використовуватись лише як скринінговий [7].

Таким чином, використання культуральних методів виявлення збудника *C. difficile* та встановлення його токсигенних властивостей не втрачає своєї важливості, незважаючи на наявність різних лабораторних методів діагностики. Науковими дослідженнями останніх років, спрямованими на порівняльне вивчення різних методів культивування та ростових якостей поживних середовищ, встановлено, що найбільш ефективним є спосіб термічної обробки досліджуваного матеріалу з послідовним висівом на селективне середовище (найчастіше циклосерин-цефокситин фруктозний агар) [9].

**Мета дослідження.** Метою досліджень було експериментальне порівняння різних поживних середовищ для найбільш ефективного виділення *C. difficile* з клінічного матеріалу. У зв'язку з труднощами виділення *C. difficile* (кількість бактерій в кишківнику хворих через наявність рідких частих випорожнень може значно зменшуватись) було порівняно ефективність висіву матеріалу з транспортного середовища на селективний агар, або висів спочатку на різні рідкі середовища збагачення, а потім – на селективний агар. Також вивчалась ефективність транспортного середовища Еймса для забору та збереження виживаємості *C. difficile* протягом 1-5 діб.

**Об'єкт і методи дослідження.** Використовували такі поживні середовища: транспортне середовище Еймса, бульйон Шадлера (Himedia, Індія); бульйон з серцево-мозковою витяжкою модифікований (Himedia, Індія); селективний циклосерин-цефокситин фруктозний агар - ССФА (фірма Himedia), модифікований кров'яний агар.

Порівнювали різні схеми культурального виділення *C. difficile* з досліджуваного матеріалу: висів з транспортного середовища Еймса на ССФА (контроль); з транспортного середовища Еймса на бульйон Шадлера, потім на ССФА (схема 1); з транспортного середовища Еймса на бульйон з серцево-мозковою витяжкою модифікований, потім на ССФА (схема 2).

Музейні штами *Clostridium difficile* № 258, № 281 та клінічний свіжевиділений штам вирощували 48 годин на модифікованому кров'яному агарі в анаеробних умовах. Готували мікробні зависі 2,0 за

Mc Farland, робили серію десятикратних розведень у фосфатно-буферному розчині в інтервалі від  $10^7$  до  $10^3$  КУО/мл. З цих розведень по 0,1 мл висівали на рідкі та тверді поживні середовища згідно вказаних схем, вирощували 48 годин в анаеробних умовах. Вираховували кількість вирослих колоній.

Теплову обробку для всіх варіантів висіву проводили при  $80^\circ\text{C}$  на водяній бані протягом 20 хвилин.

Статистичну обробку проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2007. Результати підрахунків кількості мікробних клітин (КУО) було виконано як мінімум в двох паралельних повторях і трансформовано в десяткові логарифми [8,10].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Результати порівняльного вивчення різних методів виділення *Clostridium difficile* показали, що при використанні схем з висівом на рідкі середовища збагачення (схеми 1 та 2) з усіх розведень виділялась досліджувана культура в кількості від  $2,42 \pm 0,32$  до  $5,12 \pm 0,34$  (lg КУО/мл). При використанні тільки твердого середовища ССФА досліджувана культура висівалась лише з найбільшого розведення –  $10^7$  КУО/мл в кількості  $3,24 \pm 0,51$  (lg КУО/мл).

При порівнянні ефективності схем 1 та 2 проміж собою встановлено, що в усіх випадках вірогідно значущої різниці між цими схемами не виявлено. Таким чином, використання перевірених рідких середовищ збагачення підвищувало ефективність виділення *C. difficile* з усіх розведень. Результати досліджень наведені в **таблиці 1**.

Ефективність транспортного середовища Еймса для забору та збереження виживаємості *C. difficile* протягом 1-5 діб вивчали в експерименті шляхом внесення мікробних сумішей музейних штамів *C. difficile* № 258, № 281 та клінічного штаму в пробірки з середовищем Еймса в кінцевій концентрації  $10^7$  КУО на 1 мл. Зберігали пробірки при температурі  $+4^\circ\text{C}$  та робили висіви на ССФА, підраховували кількість вирослих колоній. Результати досліджень наведені в **таблиці 2**.

**Висновки.** Проведеними дослідженнями встановлено, що найбільш ефективною схемою виділення *C. difficile* з експериментального матеріалу був пересів з транспортного середовища Еймса в рідкі середовища збагачення (бульйон Шадлера або бульйон з серцево-мозковою витяжкою), а потім – на циклосерин-цефокситин фруктозний агар. Ефективність цих схем виділення статистично не відрізнялась між собою.

На відміну від використання лише середовища ССФА, схеми виділення з застосуванням рідких середовищ збагачення дозволяли виділяти бактерії *C. difficile* з усіх перевірених розведень культури.

Таблиця 1.

**Ефективність різних схем виділення *C. difficile***

	Кількість вирослих колоній (lg КУО/мл) з розведення:		
	$10^7$	$10^5$	$10^3$
	(M ± m)	(M ± m)	(M ± m)
БШ, ССФА (схема 1)	$4,96 \pm 0,24$	$3,32 \pm 0,61$	$2,42 \pm 0,32$
БСМВ, ССФА (схема 2)	$5,12 \pm 0,34$	$3,26 \pm 0,54$	$2,78 \pm 0,27$
Контроль – ССФА	$3,24 \pm 0,51$	Н/р	Н/р

**Примітки:** БШ – бульйон Шадлера, ССФА – селективний циклосерин-цефокситин фруктозний агар, БСМВ – бульйон з серцево-мозковою витяжкою модифікований, Н/р – немає росту, КУО/мл – колонієутворюючі одиниці в мл., \* –  $p < 0,05$  проти контролю, M – середнє значення кількості вирослих колоній (lg КУО/мл), m – стандартна помилка середнього значення кількості вирослих колоній.

Таблиця 2.

**Ефективність транспортного середовища Еймса для забору та збереження культури *C. difficile* протягом 1-5 діб**

Кількість вирослих колоній lg (M ± m) КУО/мл різних штамів <i>C. difficile</i> :			
Час (год)	№258	№281	Клінічний
24	$3,28 \pm 0,24$	$4,36 \pm 0,41$	$4,56 \pm 0,68$
48	$3,21 \pm 0,27$	$4,24 \pm 0,37$	$4,42 \pm 0,58$
72	$3,19 \pm 0,33$	$4,32 \pm 0,44$	$4,38 \pm 0,53$
96	$3,16 \pm 0,31$	$4,18 \pm 0,39$	$4,52 \pm 0,66$
120	$3,20 \pm 0,28$	$4,22 \pm 0,43$	$4,36 \pm 0,63$
1 год (контроль)	$3,27 \pm 0,24$	$4,37 \pm 0,36$	$4,54 \pm 0,59$

**Примітки:** \* –  $p < 0,05$  проти контролю, КУО/мл – колонієутворюючі одиниці в мл., M – середнє значення кількості вирослих колоній (lg КУО/мл), m – стандартна помилка середнього значення кількості вирослих колоній.

Перевірка ефективності середовища Еймса для забору та збереження культур *C. difficile* протягом 1-5 діб показала, що кількість вирослих колоній статистично не змінювалась протягом всього терміну збереження.

**Рекомендації.** Виходячи з вищевказаного, рекомендуємо проводити виділення бактерій *C. difficile* з експериментального матеріалу за допомогою рідких середовищ збагачення – бульйону Шадлера або бульйону з серцево-мозковою витяжкою модифікованого з подальшим висівом на циклосерин-цефокситин фруктозний агар.

Середовище Еймса забезпечує збереження культури *C. difficile* в клінічному матеріалі протягом 5 діб.

**Перспективи подальших досліджень.** Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення біологічних властивостей штамів *C. difficile*, виділених від хворих за допомогою використання найбільш ефективних бактеріологічних схем, та розробку живильних середовищ для встановлення токсигенної активності збудника.

**Література**

1. Zinchuk O.M. Suchasni aspekty Clostridium-difficile–infekcii / O.M. Zinchuk, G.L. Stolar // Infekciyni chvoroby. – 2014. – № 3. – S. 5-12.
2. Kushnir I.E. Antibiotikoasocijovana diarea / I.E. Kushnir // Lyky Ukrainy. – 2008. – № 3 (119). – S. 44-47.
3. Lysuk Ju.S. Pseudomembranosny kolit – actualna problema suchasnoi antibiotikoterapii / Ju.S. Lysuk, I.A. Bokotey, O.I. Zanic, V.P. Andruschenko // Kharkivska hirurgichna shkola. – 2012. – № 2 (53). – S. 89-92.
4. Solovey N.V. C. difficile kak osnovnoy vzbuditel antibiotiko-associrovannuh diarey: sovremennoe sostoyanie problemy / N.V. Solovey, I.A. Karpov, O.Ch. Glas, O.A. Kotovich // Clinicheskaya infectologia i parazitologia. – 2013. – № 3. – S. 102-119.
5. Howell M.D. Iatrogenic gastric acid suppression and the risk of nosocomial Clostridium difficile infection / M.D. Howell [et al.] // Archives of internal medicine. – 2010. – Vol. 170, № 9. – P. 784-790.
6. Koch A.C. Methods for general and molecular bacteriology / A.C. Koch, D. Gerhardt, R.G.E. Murray [et. al.] // ASM Press Growth measurement. – 1994. – P. 254-257.
7. Novak-Weekley S.M. Clostridium difficile testing in the clinical laboratory by use of multiole testing algorithms / S.M. Novak-Weekley, E.M. Marlowe, J.M. Miller // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 889-893.
8. Paulson D.S. Biostatistics and microbiology: a survival manual / D.S. Paulson // Springer Science and Bussiness Media. – 2008. – P. 100.
9. Tiffany Hink A systematic evaluation of metod to Optimize culture-based recovery of Clostridium difficile from stool specimens/ Tiffany Hink, Carey-Ann D. Burnham, Eric Dubberke // Anaerobe. – 2013. – № 19. – P. 39-43.
10. Wilcox M.H. Point-counterpoint. What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of Clostridium difficile infection / M.H. Wilcox, T. Planche, F.C. Fang, P. Gilligan // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 4347-4353.

УДК 579.852.13: 616.34-002-078

**ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИДІЛЕННЯ CLOSTRIDIUM DIFFICILE З ДОСЛІДЖУВАНОВОГО МАТЕРІАЛУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ З РІЗНИМИ ПОЖИВНИМИ СЕРЕДОВИЩАМИ**

**Воронкіна І. А., Дяченко В. Ф., Городницька Н. І., Кхедер С. С., Бирюкова С. В.**

**Резюме.** Проводили порівняльне вивчення ефективності виділення Clostridium difficile з досліджуваного матеріалу в експерименті з різними поживними середовищами. Проведеними дослідженнями встановлено, що найбільш ефективною схемою виділення *C. difficile* з експериментального матеріалу був пересів з транспортного середовища Еймса в рідкі середовища збагачення (бульйон Шадлера або бульйон з серцево-мозковою витяжкою), а потім – на циклосерин цефокситин фруктозний агар. Ефективність цих схем виділення статистично не відрізнялась між собою. На відміну від використання лише середовища ССФА, схеми виділення з застосуванням рідких середовищ збагачення дозволяли виділяти бактерії *C. difficile* з усіх перевірених розведень культури.

Проведеними дослідженнями встановлено, що найбільш ефективною схемою виділення *C. difficile* з експериментального матеріалу був пересів з транспортного середовища Еймса в рідкі середовища збагачення (бульйон Шадлера або бульйон з серцево-мозковою витяжкою), а потім – на циклосерин-цефокситин фруктозний агар.

На відміну від використання лише середовища ССФА, схеми виділення з застосуванням рідких середовищ збагачення дозволяли виділяти бактерії *C. difficile* з усіх перевірених розведень культури.

Перевірка ефективності середовища Еймса для забору та збереження культур *C. difficile* протягом 1-5 діб показала, що кількість вирослих колоній статистично не змінювалась протягом всього терміну збереження. Таким чином, середовище Еймса забезпечує збереження культури *C. difficile* в клінічному матеріалі протягом 5 діб.

**Ключові слова:** *Clostridium difficile*, ефективні схеми виділення збудника з досліджуваного матеріалу.

УДК 579.852.13: 616.34-002-078

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ CLOSTRIDIUM DIFFICILE ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С РАЗЛИЧНЫМИ ПИТАТЕЛЬНЫМИ СРЕДАМИ**

**Воронкина И. А., Дьяченко В. Ф., Городницкая Н. И., Кхедер С. С., Бирюкова С. В.**

**Резюме.** Проводили сравнительное изучение эффективности выделения Clostridium difficile из исследуемого материала в эксперименте с разными питательными средами. Проведенными исследованиями установлено, что наиболее эффективной схемой выделения *C. difficile* из экспериментального материала был пересев с транспортной среды Эймса в жидкие среды обогащения (бульон Шадлера или бульон с сердечно-мозговой вытяжкой), а потом – на циклосерин-цефокситин фруктозный агар. Эффективность использования этих схем выделения статистически не отличалась между собой. В отличие от использования лишь среды ССФА, схемы выделения с применением жидких сред обогащения позволяли выделять бактерии *C. difficile* из всех исследованных разведений культуры.

Проведенными исследованиями установлено, что наиболее эффективной схемой выделения *C. difficile* из экспериментального материала был пересев с транспортной среды Эймса в жидкие среды обогащения (бульон Шадлера или бульон с сердечно-мозговой вытяжкой), а затем – на циклосерин-цефокситин фруктозный агар.

В отличие от использования только среды ССФА, схемы выделения с применением жидких сред обогащения позволяли выделять бактерии *C. difficile* из всех проверенных разведений культуры.

Проверка эффективности среды Эймса для забора и сохранения культур *C. difficile* на протяжении 5 суток показала, что количество выросших колоний статистически значимо не изменялось на протяжении всего периода сохранения культуры. Таким образом, среда Эймса обеспечивает сохранение культуры *C. difficile* в клиническом материале на протяжении 5 суток.

**Ключевые слова:** *Clostridium difficile*, эффективные схемы выделения возбудителя из исследуемого материала.

UDC 579.852.13: 616.34-002-078

### **A COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE ISOLATION OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE FROM CLINICAL MATERIAL IN AN EXPERIMENT WITH DIFFERENT NUTRIENT MEDIA**

**Voronkina I. A., Dyachenko V. F., Gorodnitskaya N. I., Kheder S. S.,  
Birukova S. V.**

**Abstract.** Diseases associated with *Clostridium difficile* infection are a serious problem for modern medicine.

The use of culture methods to detect *C. difficile* pathogen and its toxic properties does not lose its importance, despite the presence of various laboratory methods of diagnosis. Scientific researches of last years aimed at comparative study of different methods of cultivation and growth qualities of nutrient media, it has been established that the method of heat treatment of the researched material with subsequent sowing on a selective medium (most often cycloserine-cefoxitin fructose agar) is most effective.

*The purpose of the research* was to experimentally compare different nutrient media for the most effective isolation of *C. difficile* from clinical material. Due to the difficulty of isolating *C. difficile* (the number of bacteria in the intestines of patients can be significantly reduced due to the presence of liquid frequent feces), the effectiveness of seeding the material from the transport medium on a selective agar was comparable, or first hanging in the different liquid media of enriching, and then on selective agar.

Also, the effectiveness of the transport media by Aims for catching and maintaining the survival of *C. difficile* for 1-5 days was studied.

The effectiveness of the transport media by Aims for catching and maintaining the survival of *C. difficile* for 1-5 days was studied in the experiment by introducing microbial mixes of the museum strains of *C. difficile* No. 258, No. 281 and the clinical strain into test tubes by Aims at a final concentration of  $10^7$  CFU per 1 ml. They were kept at +4°C and sown on the CCFA, counted the number of grown colonies.

We conducted a comparative study of the effectiveness of the isolation of *Clostridium difficile* from clinical material in an experiment with different nutrient media. Conducted the comparative study of effectiveness of the isolation of *Clostridium difficile* from the clinical material in an experiment with different nutrient media. Undertaken studies it is set that the most effective scheme of isolation of *C. difficile* from clinical material was subculturing from a transport media by Aims in the liquid media of enriching (Schadler broth or modified broth with cardio-brain extraction), and then to selective cycloserin-cefoxitin fructose agar. Effectiveness of these scheme of isolation statistically did not differ inter se. Unlike the use only of solid media of CCFA, the scheme of isolation with the use of liquid media of enriching allowed to distinguish to the bacterium of *C. difficile* from all tested breeding of culture.

Coming from foregoing, recommend to conduct the isolation of bacteria of *C. difficile* from clinical material by means of the use of liquid media of enriching – Schadler broth or modified broth with cardio-brain extraction with the further sowing on cycloserin-cefoxitin fructose agar.

Testing the effectiveness of the transport media by Aims for catching and maintaining the survival of *C. difficile* for 1-5 days was showed that the number of grown colonies has not statistically changed throughout the shelf-life.

Thus, the transport media by Aims ensures the preservation of culture of *C. difficile* in clinical material for 5 days.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, effective schemes of isolation of strains of *C. difficile* from the researched material.

*Рецензент – проф. Лобань Г. М.*  
Стаття надійшла 19.08.2017 року