

УДК 616.98:578.828.6

## УДОСКОНАЛЕННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ БАРТОНЕЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Похил С.І., Бондаренко О.В., Тимченко О.М.,  
Бондаренко А.В.\*

Інститут мікробіології та імунології  
ім. І.І. Мечникова АМН України,

\*Харківський державний медичний університет  
МОЗ України

### Вступ

В теперішній час під терміном “бартофельозна інфекція” (бартофельоз) об’єднують велику групу досить відмінних за клінічним перебігом захворювань, етіологічним агентом яких є бактерії роду *Bartonella*. У формі генералізованої інфекції або локального запального процесу при бартофельозі у хворих можуть вражатись практично всі органи і системи [1-7]. Серед більш ніж 20-ти відомих сьогодні видів і підвидів *Bartonella* здатність викликати захворювання у людей доказана для 9-ти із них: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. vinsonii* (підвидів *vinsonii*, *arupensis* та *berkhoffii*), *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae*, *B. grahamii*, *B. washo-ensis* [8-13]. Простежується виразний взаємозв’язок між певними видами бартофельозу і специфічною формою перебігу бартофельозу. Вид *B. bacilliformis* традиційно вважається збудником хвороби Карріона (з маніфестацією у формі гарячки Оройа чи Перуанської бородавки) [2, 8], *B. quintana* - етіологічним агентом первинної бактеремії – окопної гарячки (синоніми траншейна, Волинська, п’ятидобова, пароксизмальна гарячка) [3], *B. grahamii* асоціюється із грахамельозами [10], *B. henselae* – домінує в ролі збудника хвороби від котячих подряпин, бацілярного ангіоматозу шкіри, паренхіматозного бацілярного гепатиту та пілідозу [4, 6, 7], тощо. Однак, взаємозв’язок між клінічними проявами захворювання і таксономічним видом етіологічного агента не є абсолютним [4, 5, 8, 12, 13]. Це положення, поряд з великою клінічною варіабельністю та поліетіологічністю бартофельозної інфекції (БІ), обґрунтовує визначальну роль лабораторних досліджень в її діагностиці. В стандартах ВООЗ (WHO Recommended Surveillance Standards Second edition WHO/CDS/CSR/ISR/99.2) не подано рекомендацій щодо застосування методів і критеріїв етіологічної лабораторної діагностики бартофельозу [14]. Європейська робоча група по *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia* і *Bartonella* (EUWOG) основними критеріями для лабораторної ідентифікації видів бартофельозу визначила склад жирних кислот клітинної стінки цих мікроорганізмів, специфічність фінгерпринтів при ПЛР-індикації з довільними праймерами (RAPID-PCR), фінгерпринтів сайт-специфічної ендонуклеазної рестрикції ПЛР-ампліконів структурних чи функціональних генів (RELP-PCR) та фінгерпринтів при ПЛР-індикації з системою праймерів для ампліфікації повторюваних екстрагенних паліндромних елементів (REP-PCR) [15-19]. В теперішній час з метою етіологічної діагностики бартофельозу

активно застосовуються і більш прості в технологічному відношенні методи: шкірно-алергічні проби із специфічним антигеном, методи імуноферментного аналізу, імуноблотингу, імунофлюоресценції, світлової мікроскопії пофарбованих посрібленням за Warthin-Starry (або за Steiner) біопатів та мікробіологічний аналіз зразків клінічного матеріалу з метою виділення штампів бартофельозу [4, 6, 7, 13, 20]. Застосування останнього методу дає можливість описувати нові види *Bartonella*, які здатні спричиняти захворювання у людей, вивчати біологічні властивості збудника, досліджувати механізми патогенезу БІ на лабораторних моделях, визначати чутливість клінічних штампів до протимікробних препаратів, тощо. Проте, і до теперішнього часу, мікробіологічний метод діагностики бартофельозу не знайшов широкого застосування в практиці охорони здоров’я через необхідність здійснювати надзвичайно тривале культивування посівів (від 14-ти до 40-ка діб) в атмосфері збагаченій CO<sub>2</sub> з використанням складних поживних середовищ (шоколадного і триптиказного агару, середовища із серцево-мозковим екстрактом, кров’ю та ін.) [21-24].

Метою цієї роботи було удосконалення поживних середовищ для прискорення первинного виділення бартофельозу із зразків клінічного матеріалу та подальшого культивування їх чистих ізолятів.

### Матеріали та методи

Об’єктом дослідження були 9 штампів бактерій роду *Bartonella*, інгредієнти-стимулятори росту та різні типи поживних середовищ, які тестувались для визначення загальних показників їх якості та на здатність забезпечувати ріст бартофельозу.

Штами *Bartonella* spp. мали таке походження: типовий штам *B. henselae* CCUG 30454 BT, отриманий із Culture Collection, University of Göteborg, Department of Clinical Bacteriology (Guldhedsg, 10, S-41346, Göteborg, Швеція), інші 8 штампів *Bartonella* spp. були виділені з травня 2005 року по лютий 2006 року в лабораторії нових та маловивчених інфекційних захворювань (ЛНМІЗ) Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України (ІМІ ім. І.І. Мечникова) із зразків клінічного матеріалу (кров, біопат із дермальних ангіом і папул) від хворих на БІ (хворобу від котячих подряпин - ХКП, бацілярний ангіоматоз - БА).

Протестовані такі поживні середовища: 2%-й м’ясо-пептонний агар (МПА) і середовище для визначення антибіотикочутливості (АГВ) виробництва НАН України ІБОХН Державного експериментального заводу медичних препаратів (м. Київ), 2%-й агар із мозково-серцевим екстрактом (ВНІА) (ВНІА – Brain Heart Infusion Agar) фірми “Fluka BioChemica” (Швейцарія), Лурія-Бертані агар (ЛБА – Luria Bertane Agar) і буферний вугільно-дріжджовий агар (BCYE) (BCYE – buffered charcoal-yeast extract agar) фірми “Difco” (США), середовища для виділення і культивування бруцел - еритрит-агар (ЕА), бордетел - козеїно-вугільний агар (КВА), стафілококів – молочно-жовтково-сольовий агар (МЖСА), гемокультур і стрептококів (СВГКС), мікроорганізмів роду *Candida* – агар Сабура (СабураА),

ентеробактерій – агар Ендо (ЕндоА), сальмонел – вісмут-сульфіт-агар (ВСА) і шигел – агар Плоскірева (ПлоскіреваА) виробництва НВО “Питательные среды” (м. Махачкала, РФ), середовища для виділення і культивування нейсерій та корінебактерій - сироватковий агар (СА) та для культивування молочнокислих бактерій – МРС 4 (МРС 4) виробництва ЗАТ “Біолік” (м. Харків, Україна), 5%-ий кров’яний агар (КА) і різні типи шоколадного агару (ША), виготовлені із дотриманням традиційної [25, 26] та оптимізованої рецептури (ТША і ОША, відповідно) в ЛНМІЗ ІМІ ім. І.І. Мечникова. В якості основного середовища для виділення і вирощування бартонел використовували ОША, який містить на 1 літр: Д-глюкози – 5,0 г, дефібринованої крові (барана або кролика) – 80,0 мл, поживної агаризованої основи (2%-ий LBA, 2%-ий ВНІА, 2%-ий ЕА) – 915,0 мл. Для приготування якісного ОША необхідно дотримуватись таких правил: агаризована основа повинна бути розплавлена і охолоджена до  $t^{\circ}=(50-55)^{\circ}\text{C}$ ; до основи середовища слід додати 40%-ий стерильний розчин глюкози до кінцевої її концентрації 0,5% (об’єм/об’єм); дефібриновану кров барана (або кролика) необхідно додавати невеликими порціями до кінцевої її концентрації 8,0% (об’єм/об’єм) при постійному перемішуванні; середовище прогривають на водяній бані, повільно підвищуючи температуру до 70-80  $^{\circ}\text{C}$ . Оптимально прогріте середовище – ОША набуває червоно-коричневого кольору (недостатньо прогріте має світло-коричневий колір, надмірно прогріте – темно-коричневий).

В якості стимуляторів росту штамів бартонел з метою більш швидкого формування макроколоній на агаризованих середовищах були випробувані такі інгредієнти: гемін (ГЕМ) (ГЕМ – хлорофенілпропорфірін, Х-фактор росту) виробництва НВО “Биохимреактив” (Олайський завод хімічних реактивів, РФ); стимулятор росту чумного мікроба - СРЧМ (СРЧМ – компоненти гемолізованої крові барана, які містять Х і V фактори росту) - Середньоазійського науково-дослідного протичумного інституту МОЗ Казахстану (м. Алма-Ати); суміш продуктів ферментативного гідролізу дріжджів - ЕНКАД (ЕНКАД містить піримідинові нуклеозид-3-фосфати та олігорибонуклеозиди з кінцевим 3-фосфатом) - ЗАТ “Біолік” (м. Харків, Україна); суміш для стимуляції росту - ДПД (ДПД – суміш в співвідношенні 1:1:1 - дипіримидил піримидин (тетраметокси)-етиканін 0,5%-ий стерильний розчин, тетраетилтетраметокси-феніл-ізохіноліну 2,0%-ий стерильний розчин, фенілметилбензімідазол 1,0%-ий стерильний розчин), синтезована в лабораторії імунореабілітології ІМІ ім. І.І. Мечникова (Мартинов А.В., неопубліковані матеріали). Концентрації інгредієнтів, які додавали до поживних середовищ, представлено в таблицях 1, 2, 3. При цьому, СРЧМ, ЕНКАД, ДПД є стерильними препаратами, їх вносили в охолоджені до  $t^{\circ}=(50-55)^{\circ}\text{C}$  поживні середовища з дотриманням правил асептики. Аміачно-водний розчин ГЕМ перед внесенням в поживні середовища стерилізували холодним способом – шляхом фільтрації через фільтр SLGS з порами розміром 0,22 мкм фірми “Millipore” (США).

Стандартизовані у стерильному 0,15 М фосфатно-сольовому буфері (рН=7,0) до 0,023 за показником одиниць оптичної щільності (о.о.щ.) (вимірювання проводили на колориметрі фотоелектричному концентраційному КФК-2МП-УХЛЧ при  $\lambda=590$  нм) суспензії штамів бартонел дозовано (по  $10^{-1}-10^{-4}$  мл) висівали на поверхню поживних середовищ. Культивування посівів здійснювали при  $t^{\circ}=(35\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$  в атмосфері з 5%  $\text{CO}_2$  строком від 10-ти до 40-ка діб.

Оцінку якості поживних середовищ здійснювали у відповідності із загальними бактеріологічними вимогами [27]. Окрім оптимальних показників рН, Eh, ізотонічності, вологості, достатньої буферності та стерильності, які забезпечувались чітким дотриманням визначеної технології приготування, поживні середовища тестували на ростові якості: наявність і кількість колоніє утворюваних одиниць (КУО); швидкість росту бартонел – час культивування, необхідний для формування макроколоній видимих неозброєним оком; характеристика фенотипів макроколоній бартонел; збереження типових мікробіологічних властивостей у штамів бартонел, вирощених на поживних середовищах: морфологічних, тинкторіальних, біохімічних, серотипічних [22, 23].

Фотографування макроколоній культур бартонел здійснювали цифровим фотоапаратом “Olympus C-7070 Wide Zoom” в умовах макрозйомки.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики [28].

## Результати та їх обговорення

Штами *Bartonella* spp. не росли на переважній більшості досліджених нами універсальних (загального призначення) і елективних поживних середовищах (МПА, АГВ, ВНІА, LBA, ВСУЕ, ЕА, КВА, МЖСА, СВГКС, СабуроА, ЕндоА, ВСА, ПлоскіреваА, СА, МРС4) при їх культивуванні в оптимальних умовах впродовж 40-ка діб. Без додаткового внесення крові або її компонентів, навіть, такі багаті на ростові компоненти середовища як ВНІА, LBA, ВСУЕ, ЕА, КВА, СА не придатні для вирощування бартонел, що цілком узгоджується із даними інших авторів [8, 9, 11, 21, 22, 23]. На КА типовий штам *B. henselae* CCUG 30454 ВТ при тривалій інкубації давав слабкий ріст із утворенням дуже дрібних колоній. Останні стають ледь видимими неозброєним оком лише на 8-му чи, навіть, 10-ту добу вирощування, а впродовж 14-ти діб інкубування досягають розмірів 0,5-0,8 мм в діаметрі, мають атипові фенотипічні характеристики: майже правильну округлу форму, трохи випуклий профіль, гладку поверхню сіруватого кольору, рівний край. Клінічні свіжовиділені ізоляти бартонел впродовж 24-х діб інкубування не утворювали видимих макроколоній на КА.

На ТША всі досліджені нами штамми бартонел давали задовільний ріст в період з 12-ої по 16-ту добу інкубування. Більш ефективними для первинного виділення і культивування штамів *Bartonella*

spp. виявилися оптимізовані варіанти шоколадного агару (ОША), які виготовляли на основі LBA, EA, ВНІА. Всі ОША характеризуються задовільною технологічністю при виготовленні, добре стандартизуються за показниками: активності іонів водню (показник рН становив  $(7,0 \pm 0,1)$ ); окисно-відновлювального (редокс) потенціалу (показник  $E_h$  змінювався від  $-120$  мВ до  $-30$  мВ); буферної ємності (при тривалому вирощуванні мікроорганізмів в атмосфері з 5%  $CO_2$  вихідне значення рН зменшувалось не більше ніж на 0,1); вологості ( $a_w$  – показник активності води в середовищі становив  $(0,97 \pm 0,01)$ ), його оптимальне значення вдається утримувати впродовж тривалої інкубації посівів в умовах вологої камери при використанні ексикатора) і осмотичного тиску ( $\pi$  - розрахований показник осмотичного тиску середовища складав 28,38 атм/моль).

Зразки ОША виготовлені на основі LBA, EA і ВНІА забезпечили ріст всіх 9-ти штамів *Bartonella* spp. взятих в експеримент, при цьому, в стандартних умовах культивування видимі неозброєним оком макроколонії формувались в термін від 7-ої до 9-ої доби, а питома частка макроколоній з типовою морфологією складала близько 85% (рис. 1).

Результати дослідження впливу стимуляторів росту мікроорганізмів при вирощуванні бартонел на LBA, EA, ВНІА і ОША наведені в таблицях 1, 2 і 3.

Додавання ГЕМ і СРЧМ до середовищ в якості стимуляторів росту забезпечило здатність бартонел рости, окрім ОША, і на LBA, EA та ВНІА. Щодо впливу ГЕМ як критично необхідного фактору для забезпечення росту *Bartonella* spp., підтвердились закономірності, описані іншими дослідниками [29, 30]. Ці закономірності полягають в тому, що при концентрації 50-250 мг/л ГЕМ забезпечує ріст бартонел, а в концентрації 500 мг/л і вище – проявляє інгібуючі властивості (табл. 1). Навпроти, збільшення концентрації СРЧМ в поживному середовищі від 10 мл/л до 100 мл/л супроводжувалось зростанням швидкості росту бартонел (скорочувався час формування макроколоній) і збільшенням показника КУО/мл (табл. 2). СРЧМ в концентрації 50 мл/л і 100 мл/л забезпечує ріст бартонел на різних поживних середовищах (LBA, EA, ВНІА, ОША) із показниками кількості та швидкості формування макроколоній, які, (за винятком LBA) перевищують ( $p < 0,05$ ) відповідні показники у порівнянні із ОША. При внесенні 50 мл/л і 100 мл/л СРЧМ максимальні показники зростання (приросту) кількості макроколоній відмічені при використанні ВНІА (в 5,3 і 5,2 рази, відповідно).

Дещо нижчим зростання цих показників було при застосуванні EA (в 2,9 і 4,2 рази, відповідно), а при використанні ОША стимулюючий ефект СРЧМ на ріст мікроорганізмів був найменш виразним (показник КУО/мл зростав лише в 1,7 і 2,2 рази, відповідно). Подібною виявилась і закономірність впливу на швидкість росту бартонел. Додавання до середовищ СРЧМ в концентрації 50 мл/л прискорювало утворення видимих неозброєним оком макроколоній до 4-х або 6-ти діб на середовищах LBA, EA та ВНІА і - до 3-х або 4-х діб на ОША. Підвищення концентрації СРЧМ до 100 мл/л дозволяє прискорити формування макроколоній впродовж такого ж терміну і на середовищах EA і ВНІА.

На відміну від ГЕМ і СРЧМ, ЕНКАД та ДПД виявляли ознаки стимулюючого впливу на ріст мікроорганізмів роду *Bartonella* лише на ОША, - тобто, на оптимально збалансованому нутритивними інгредієнтами середовищі, яке самостійно (без внесення додаткових стимуляторів росту) забезпечує ефективний ріст бартонел (табл. 3). Ймовірно, що цим пояснюються і характерні для ЕНКАД та ДПД ознаки їх стимулюючого впливу: відносно невелике зростання показника КУО/мл при суттєвому прискоренні росту з утворенням видимих неозброєним оком макроколоній в строки від на 5-ої до 7-ої доби вирощування. Додавання ЕНКАД і ДПД до інших типів середовищ (LBA, EA і ВНІА) не перетворювало останні в придатні для вирощування бартонел. Таким чином, ЕНКАД і ДПД не є критично необхідними стимулюючими ростовими факторами для бактерій роду *Bartonella*, тому можуть застосовуватись для прискорення росту цих мікроорганізмів лише на збалансованих для них поживних середовищах.

Морфологія макроколоній *Bartonella* spp., як і для багатьох інших мікроорганізмів, є важливим ідентифікаційним критерієм [7, 21-24]. Типовою для бартонел є R-форма макроколоній: неправильної округлої форми (0,5-1,2 мм в діаметрі), з виразно випуклим профілем, чітким нерівним краєм, горбкуватою поверхнею, напівпрозорого сіро-білого кольору (в науковій літературі таку форму макроколоній порівнюють з голівкою кольорової капусти) (рис. 1). Атипові RS- та S-форми макроколоній бартонел характеризуються широким спектром відмінностей від типових: можуть мати правильну округлу форму, чіткий рівний край, трохи шоретку або, навіть, гладку блискучу поверхню, плоский, високий, випуклий, пупкоподібний чи інший профіль, менший, або значно більший розмір (рис. 1).

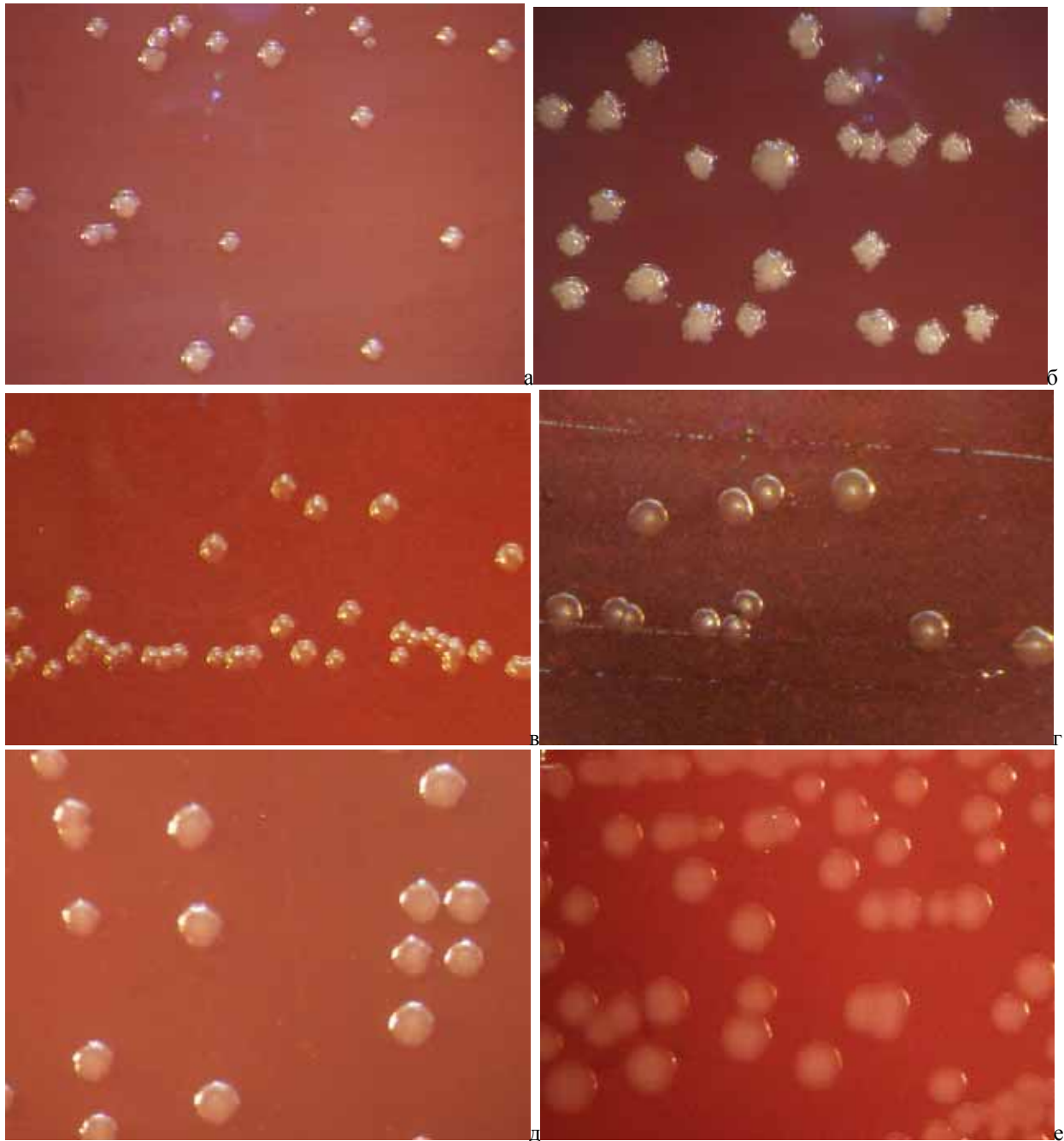


Рис. 1 - Макроколонії бартонел на ОША (збільшення  $\times 2$  рази):

А – типова морфологія макроколоній, референтний штам *B. henselae* ЛНМІЗ 06U061;

Б, В, Г, Д – різні варіанти атипової морфології макроколоній, штами *Bartonella* spp. ЛНМІЗ 06U062, 06U053, 06U055, 06U056;

Е – різко виражена атипова морфологія макроколоній, типовий штам *B. henselae* CCUG 30454 BT.

Таблиця 1. Вплив стимулятора - геміну (ГЕМ) на ріст мікроорганізмів роду *Bartonella* при їх вирощуванні на поживних середовищах

Тип ПС, в яке додавали гемін	Кількість штамів бартонел, взятих в експеримент/ вихідна концентрація бактерій в робочих суспензіях визначена на ОША, КУО/мл, $(\bar{m} \pm \bar{d})$	Концентрація геміну в ПС (мг/л)	Показники впливу ГЕМ на ріст бартонел		
			швидкість росту (час – доба утворення макроколоній, видимих неозброєним оком)	утворених макроколоній при дозованому висіві робочих суспензій КУО/мл, $(\bar{m} \pm \bar{d})$	Характеристика макроколоній (% типових колоній основного морфологічного типу), $(\bar{m} \pm \bar{d})$
ЛВА	4/ (2,2±1,4)·10 <sup>7</sup>	100,0	8-9	(1,3±4,0)·10 <sup>6</sup>	(85,4±8,7)
		250,0	8-9	(1,5±3,1)·10 <sup>6</sup>	(86,6±9,1)
		500,0	-	-	-
		1000,0	-	-	-
ЕА	4/ (7,8±2,6)·10 <sup>6</sup>	100,0	7-8	(6,5±5,3)·10 <sup>6</sup>	(89,3±7,1)
		250,0	7	(5,9±4,0)·10 <sup>6</sup>	(84,2±5,0)
		500,0	-	-	-
		1000,0	-	-	-
ВНІА	4/ (9,4±4,8)·10 <sup>6</sup>	100,0	5-7	(8,2±1,5)·10 <sup>6</sup>	(85,5±10,5)
		250,0	5-6	(8,4±1,0)·10 <sup>6</sup>	(88,1±11,0)
		500,0	-	-	-
		1000,0	-	-	-
ОША	7/ (6,3±1,2)·10 <sup>6</sup>	100,0	5	(6,9±4,2)·10 <sup>6</sup>	(80,7±9,1)
		250,0	5	(6,5±3,0)·10 <sup>6</sup>	(82,4±6,6)
		500,0	-	-	-
		1000,0	-	-	-

Таблиця 2. Вплив стимулятора росту чумного мікроба (СРЧМ) на ріст мікроорганізмів роду *Bartonella* при їх вирощуванні на поживних середовищах

Тип ПС, в яке додавали СРЧМ	Кількість штамів бартонел, взятих в експеримент/ вихідна концентрація бактерій в робочих суспензіях визначена на ОША, КУО/мл, $(\bar{m} \pm \bar{d})$	Концентрація СРЧМ в ПС (мл/л)	Показники впливу СРЧМ на ріст бартонел		
			швидкість росту (час - доба утворення макроколоній видимих неозброєним оком)	утворених макроколоній при дозованому висіві робочих суспензій КУО/мл, $(\bar{m} \pm \bar{d})$	характеристика макроколоній (% типових колоній основного морфологічного типу), $(\bar{m} \pm \bar{d})$
ЛВА	4/ (2,2±1,4)·10 <sup>7</sup>	10,0	-	-	-
		50,0	5-6	(1,5±0,9)·10 <sup>7</sup>	(82,8±11,0)
		100,0	5-6	(1,8±0,4)·10 <sup>7</sup>	(75,6±13,4)
ЕА	4/ (7,8±2,6)·10 <sup>6</sup>	10,0	10-12	(5,5±2,9)·10 <sup>6</sup>	(84,0±4,2)
		50,0	5-6	(2,3±4,1)·10 <sup>7</sup>	(83,3±7,1)
		100,0	3-5	(3,3±1,8)·10 <sup>7</sup>	(75,8±9,2)
ВНІА	4/ (9,4±4,8)·10 <sup>6</sup>	10,0	10-12	(4,9±6,0)·10 <sup>6</sup>	(86,4±3,9)
		50,0	4-5	(5,0±2,9)·10 <sup>7</sup>	(82,0±11,2)
		100,0	3-4	(5,8±5,1)·10 <sup>7</sup>	(77,4±8,0)
ОША	7/ (6,3±1,2)·10 <sup>6</sup>	10,0	4-5	(8,9±3,5)·10 <sup>6</sup>	(82,8±9,2)
		50,0	3-4	(1,1±0,3)·10 <sup>7</sup>	(72,4±8,2)
		100,0	3-4	(1,4±0,7)·10 <sup>7</sup>	(68,8±10,4)

Таблиця 3. Вплив стимуляторів – ЕНКАД та ДПД на ріст мікроорганізмів роду *Bartonella* при їх ви-  
рощуванні на поживних середовищах

Тип ПС, в яке додавали ЕНКАД та ДПД	Кількість штамів бартонел, взятих в експеримент/ вихідна концентрація бактерій в робочих суспензіях визначена на ОША, КУО/мл, $(\bar{m} \pm \bar{d})$	Концентрація в ПС (мл/л)		Показники впливу ЕНКАД та ДПД на ріст бартонел		
		ЕНКАД	ДПД	швидкість росту (час – доба утворення макроколоній видимих неозброєним оком)	утворених макроколоній при дозованому висіві робочих суспензій КУО/мл, $(\bar{m} \pm \bar{d})$	характеристика макроколоній (% типових колоній основного морфологічного типу), $(\bar{m} \pm \bar{d})$
ЛВА	$4 / (2,2 \pm 1,4) \cdot 10^7$	30,0		-	-	-
		60,0		-	-	-
			60,0	-	-	-
ЕА	$4 / (7,8 \pm 2,6) \cdot 10^6$	30,0		-	-	-
		60,0		-	-	-
			60,0	-	-	-
ВНА	$4 / (9,4 \pm 4,8) \cdot 10^6$	30,0		-	-	-
		60,0		-	-	-
			60,0	-	-	-
ОША	$7 / (6,3 \pm 1,2) \cdot 10^6$	30,0		5-6	$(9,8 \pm 2,5) \cdot 10^6$	$(84,4 \pm 6,0)$
		60,0		5-6	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(82,8 \pm 10,0)$
			60,0	6-7	$(6,9 \pm 1,5) \cdot 10^6$	$(78,8 \pm 7,4)$

При первинному висіві зразків клінічного матеріалу, як правило, переважна більшість (близько 90%) утворених макроколоній бартонел мають типову морфологію. При пересівах чистих культур цих мікроорганізмів питома вага типових макроколоній зменшується, а атипівих – збільшується, пропорційно збільшенню кількості послідовних пасажів. Так, типовий штам *B. henselae* CCUG 30454 BT, який виділений науковцями США в 1992 р. із крові ВІЛ-інфікованого хворого [29], в результаті багатьох попередніх лабораторних пасажів, при культивуванні на ОША утворює атипіві S-форми (рис. 1). Експерименти із застосуванням стимуляторів росту (ГЕМ, СРЧМ, ЕНКАД, ДПД) для підвищення ефективності вирощування штамів *Bartonella* spp. на поживних середовищах дозволили встановити загальну закономірність, яка полягає в тому, що внаслідок впливу стимуляторів росту, при зростанні показника КУО/мл та швидкості утворення макроколоній, пропорційно зростає відсоток їх атипівих форм (табл. 1, 2, 3). Максимальний приріст (майже на 16%) атипівих форм макроколоній був відзначений при вирощуванні штамів *Bartonella* spp. на ОША із доданим СРЧМ в концентрації 100 мл/л. Однак, в усіх випадках при застосуванні стимуляторів росту, близько 70% і більше утворених макроколоній бартонел зберігали типову морфологію, що при проведенні мікробіологічної діагностики БІ забезпечує можливість для виділення та ідентифікації її збудника. Крім того, вибіркоче дослідження властивостей 50-ти субклонів із атипівих макроколоній показало, що вони мають характерну для бартонел морфологію клітин, тинкторіальні та біохімічні властивості, володіють специфічною антигенною активністю при відтворенні РНІФ із використанням антибартофельозних позитивних імуноглобулінів кролика.

### Висновки

1. Бактерії роду *Bartonella* характеризуються високою вибагливістю до поживних середовищ і потребують особливих умов для культивування.

2. Результати експериментальних досліджень показали, що внесення до поживних середовищ в якості стимуляторів росту ГЕМ, СРЧМ, ЕНКАД і ДПД дозволяє збільшити кількість та прискорити ріст (утворення) макроколоній бартонел, при цьому, зростає відсоток макроколоній з атиповою морфологією. У субклонів із атипівих макроколоній зберігаються характерні для бартонел морфологія клітин, тинкторіальні, біохімічні та серотипічні властивості.

3. Характер і ступінь прояву стимулюючого впливу на мікроорганізми роду *Bartonella* випробуваних інгредієнтів визначається типом стимулятора та його концентрацією в поживному середовищі. ГЕМ і СРЧМ є критично необхідними стимулюючими факторами, додавання яких в оптимальних концентраціях забезпечує прискорений ріст бартонел на різних поживних середовищах. ЕНКАД і ДПД не є критично необхідними ростовими факторами для бартонел, тому здатні стимулювати ріст цих бактерій при додаванні їх до збалансованих поживних середовищ.

### Література

1. Фролов В.М. Фелиноз: клиника, диагностика, лечение// Журн. практич. лікаря. –2001. – №6. –С. 46-48.
2. Birtles R.J., Canales J., Ventosilla P. et al. Survey of Bartonella species infecting intradomestic animals in the Huayllacallan valley, Ancash, Peru, a region endemic for human bartonellosis// Am. J. Trop. Med. Hyg. –1999. –№60. –Р. 799-805.

3. Brouqui P., La Scola B., Roux V., Raoult D. Chronic Bartonella quintana bacteremia in homeless patients// N. Engl. J. Med. –1999. –№340. –P. 184-189.
4. Chomel B.B. Cat scratch disease and bacillary angiomatosis: A review// Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. –1996. –Vol.15,№3. –P. 1061-1073.
5. Margileth A.M., Baehren D.F. Chest-wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to Bartonella clarridgeiae: case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD// Clin. Infect. Dis. –1998. –№27. –P. 353-357.
6. Reed J.A., Brigati D.J., Flynn S.D. et al. Immunocytochemical identification of Rochalimaea henselae in bacillary (epithelioid) angiomatosis, parenchymal bacillary peliosis, and persistent fever with bacteremia// Am. J. Surg. Pathol. –1992. –№16. –P. 650-657.
7. Welch D.F., Pickett D.A., Slater L. et al. Rochalimaea sp. nov: A case of septicemia, bacillary angiomatosis an parenchymal bacillary peliosis// J. Clin. Microbiol. –1992. – Vol.30,№2. –P. 275-280.
8. Anderson B.E., Neumann M.A. Bartonella spp. as emerging human pathogens// Clin. Microb. Rev. –1997. –№10. –P. 203-219.
9. Daly J.S., Worthington M.G., Brenner D.G. et al. Rochalimaea elizabethae sp. nov. isolated from a patient with endocarditis// J. Clin. Microbiol. –1993. – Vol.31,№3. –P. 872-881.
10. Kerkhoff F.T., Bergmans A.M., Van der Zee A., Rothova A. Demonstration of Bartonella grahamii DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis// J. Clin. Microbiol. –1999. – Vol.37,№9. –P. 4034-4038.
11. Kordick D.L., Hilyard E.J., Hadfield T.L. et al. Bartonella clarridgeiae, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease)// J. Clin. Microbiol. –1997. – Vol.35,№5. –P. 1813-1818.
12. Margileth A.M., Baehren D.F. Chest-wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to Bartonella clarridgeiae: case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD// Clin. Infect. Dis. –1998. –№27. –P. 353-357.
13. Tsuneoka H., Umeda A., Tsukahara M., Sasaki K. Evaluation of indirect fluorescence antibody assay for detection of Bartonella clarridgeiae and seroprevalence of B. clarridgeiae among patients with suspected cat scratch disease// J. Clin. Microbiol. –2004. - Vol.42,№7. –P.-3346-3349.
14. World Health Organization. Department of Communicable Disease Surveillance and Respons. WHO Recommended Surveillance Standards. Second edition// WHO/CDS/CSR/ISR/99.2 –126 p. /http://www.who.int/emc.
15. Bereswill S., Hinkelmann S., Kist M., Sander A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in Bartonella henselae and use of the ribC gene for differentiation of Bartonella species by PCR// J. Clin. Microbiol. –1999. – Vol.37,№7. –P. 3159-3166.
16. Birtles R.J. Differentiation of Bartonella species using restriction endonuclease analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes// FEMS Microbiol. Lett. 1995. –№129. –P. 261-266.
17. Houpiikian P., Raoult D. 16S/23S rRNA Intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of Bartonella species// J. Clin. Microbiol. –2001. - Vol.39,№8. –P. 2768-2778.
18. Renesto P., Gouvernet G., Drancourt M. et al. Use of rpoB Gene analysis for detection and identification of Bartonella species// J. Clin. Microbiol. –2001. - Vol.39,№2. -P. 430-437.
19. Roux V., Raoult D. Inter- and intraspecies identification of Bartonella (Rochalimaea) species// J. Clin. Microbiol. –1995. – Vol.33,№4. –P. 1573-1579.
20. Sander A., Zagrosek A., Bredt W. et al. Characterization of Bartonella clarridgeiae flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy// J. Clin. Microbiol. –2000. – Vol.38,№8. –P.2943-2948.
21. Brenner S.A., Rooney J.A., Manzewitsch P., Regnery R.L. Isolation of Bartonella (Rochalimaea) henselae: effects of methods of blood collection and handling// J. Clin. Microbiol. –1997. – Vol.35,№2. – P. 544-547.
22. Clarridge J.E.III, Raich T.C., Pirwani D. et al. Strategy to detect and identify Bartonella species in routine clinical laboratory yields Bartonella henselae from human immunodeficiency virus-positive patient and unique Bartonella strain from his cat// J. Clin. Microbiol. –1995. – Vol.33,№8. –P. 2107-2113.
23. English C.K., Wear D.J., Margileth A.M. et al. Cat scratch disease. Isolation and culture of the bacterial agent// J. Am. Med. Assoc. –1997. –№259. –P. 1347-1352.
24. La Scola B., Raoult D. Culture of Bartonella quintana and Bartonella henselae from human samples: a 5-Year Experience (1993 to 1998)// J. Clin. Microbiol.- 1999.- Vol.37,№6. –P. 1899-1905.
25. Наказ МОЗ СРСР № 535, 22.04.1985 г. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях. –М., 1985. –126 с.
26. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/ Под ред. О.М. Биргера. –3-е изд., перераб. и доп. –М.: Медгиз, 1982. –464 с.
27. Український центр державного санітарно-епідеміологічного нагляду. Інформаційний лист № 05.4.1/1670 від 15.11.2000 р. “Бактеріологічний контроль поживних середовищ”. –Київ, 2000. –13 с.
28. Лакин Г.Ф. Биометрия. –М.: Высш.шк. 1990. –352 с.
29. Drancourt M., Raoult D. Proposed tests for the routine identification of Rochalimaea species// Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis. –1993. –№12. –P. 710-713.
30. Schwartzman W.A., Nesbit C.A., Baron E.J. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of Rochalimaea henselae// J. Clin. Microbiol. –1993. – Vol.31,№6. –P. 1882-1885.

УДК 616.98:578.828.6

**УДОСКОНАЛЕННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ БАРТОНЕЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ**

**Похил С.І., Бондаренко О.В., Тимченко О.М.,  
Бондаренко А.В.\***  
**Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечни-  
кова АМН України**  
**(м. Харків),**  
**\*Харківський державний медичний університет**  
**МОЗ України**

З метою удосконалення поживних середовищ для прискорення виділення і вирощування штамів *Bartonella* spp. був досліджений стимулюючий вплив на них ряду інгредієнтів: геміну (ГЕМ); стимулятора росту чумного мікробу (СРЧМ); суміші продуктів ферментативного гідролізу дріжджів (ЕНКАД); суміші росту в складі дипіримидил піримидин (тетраметокси)-етиканіну, тетраетил-тетраметокси-феніл-ізохіноліну, фенілметилбензімідазолу (ДПД). Встановлено, що характер і ступінь прояву стимулюючого впливу випробуваних інгредієнтів на ріст штамів *Bartonella* spp. визначається типом стимулятора та його концентрацією в середовищах.

**Ключові слова:** *Bartonella*, поживні середовища, стимулятори росту, макроколонії.

**УДК 616.98:578.828.6**

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ  
СРЕД ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГ-  
НОСТИКИ БАРТОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ**

**Похил С.И., Бондаренко Е.В., Тимченко Е.Н., Бон-  
даренко А.В.\***

**Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.  
Мечникова АМН України (г. Харків),**  
**\*Харківський державний медичний університет**  
**МОЗ України**

С целью усовершенствования питательных сред для более быстрого выделения и выращивания штаммов *Bartonella* spp. было исследовано стимулирующее влияние на них ряда ингредиентов: гемина (ГЕМ); стимулятора роста чумного микроба (СРЧМ); смеси продуктов ферментативного гидролиза дрожжей (ЕНКАД); смеси для стимуляции роста в составе дипиримидил пиридин (тетраметокси)-этиканина, тетраэтил-тетраметокси-фенил-изохинолина, фенил-метилбензидазола (ДПД). Установлено, что характер и степень проявления стимулирующего влияния изученных ингредиентов на рост штаммов *Bartonella* spp. определяется типом стимулятора и его концентрацией в среде.

**Ключевые слова:** *Bartonella*, питательные среды, стимуляторы роста, макроколонии.

**UDC 616.98:578.828.6**

**IMPROVEMENT OF NUTRIENT MEDIA FOR  
MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF BAR-  
TONELLA INFECTION**

**Pokhil S.I., Bondarenko E.V., Timchenko E.N. and  
Bondarenko A.V.\***

**I.Mechnikov Institute of Microbiology and Immunol-  
ogy, Academy of Medical Sciences (Kharkov),**  
**\*Kharkov State Medical University**

To improve nutrient media for the more rapid isolation and growth of *Bartonella* spp. strains there was studied the stimulating effect on them of number of ingredients: hemine (HEM); stimulator of plague microbe growth

(SPMG); mixture of the products of enzyme hydrolysis of yeast (МРЕНУ); growth stimulating mixture consisting of dipyrimidyl pyrimidine (tertamethoxy)-ethicanine, tetraethyl-tetramethoxy-phenyl-isoquinoline, phenylmethylbenz-imidazole (DPD). It was found that the character and degree of stimulating effect of studied ingredients on growth of *Bartonella* spp. strains is determined by type of the stimulator and its concentration in medium.

**Key words:** *Bartonella*, nutrient media, growth stimulators, macrocolonies