# Применение среды CHROMagar Orientation при идентификации и дифференциации Proteeae от прочих энтеробактерий (Enterobacteriaceae)

J. Merlino

Отделение Микробиологии и Инфекционных Заболеваний

Concord Repatriation General Hospital, Concord

## Содержание:

Данное исследование описывает новую хромогенную среду CHROMagar Orientation, которая может использоваться для идентификации и дифференциации наиболее распространенных представителей Proteeae от прочих Энтеробактерий. Из 617 различных протестированных штаммов Proteeae, у 507 отмечалось коричневое диффузное меланиноподобное окрашивание колоний. В данную группу входят Proteus mirabilis (n = 449), Proteus vulgaris биогруппы 3 (n = 18), Proteus penneri (n = 6), Providncia stuartii (n = 29), Providencia rettgeri (n = 4), Providencia alcafaciens (n = 1). По контрасту, протестированные изоляты Morganella morganii (n = 87) давали рост прозрачных колоний со слегка коричневатой основой. Колонии, образованные указанными видами, было сложно отличить друг от друга исключительно по цвету. 23 штамма Proteus vulgaris биогруппы 2 образовывали колонии сине-зеленого цвета с диффузной коричневой основой. Изоляты Proteus vulgaris биогруппы 2 легко отличить визуально от колоний других Proteea и энтеробактерий без проведения дополнительных биохимических анализов. Комбинируя характеристики окраски колоний с ограниченной программой идентификации непосредственно на хромогенной среде, всех представителей Proteea можно идентифицировать вплоть до уровня вида; с сохранением значительного уровня корреляции с результатами мульти-тестовых систем.

Ключевые слова: CHROMagar Orientation, хромогенная среда, Proteeae, Enterobacteriaceae, идентификация, дифференциация.

## Введение

Представители трибы Proteeae – важные представители нозокомиальной патогенной флоры (1-5). Они обнаруживаются в почве, воде и материалах, загрязненных фекалиями; кроме того, выделяются из крови, мочи, кала, бронхиального экссудата, содержимого язв, ран брюшной полости и прочих участков (6-10). Эти микроорганизмы часто выступают в качестве колонизирующей флоры у госпитализированных пациентов. Они – одни из наиболее распространенных микроорганизмов, которые обнаруживаются при нозокомиальных инфекциях мочеполового тракта, обычно – при длительной катетеризации (6-8, 10-11). Proteus mirabilis – один из основных этиологических факторов неспецифических инфекций мочеполовых путей. Некоторые представители трибы Proteea резистентны к ряду антибиотиков, которые обычно применяются в госпитальной

практике. Таким образом, идентификация этих микроорганизмов при их выделении из клинически значимых участков, чрезвычайно важна (2-4, 7, 12, 13).

В настоящем исследовании описано рутинное использование среды CHROMagar Orientation, новой хромогенной среды, в комбинации с некоторыми простыми биохимическими анализами, для идентификации и дифференциации наиболее распространенных видов Proteeae в условиях рутинной лабораторной практики. Подобным стандартом идентификации можно пользоваться наряду с молекулярными техниками в условиях лабораторий при больницах при исследовании случаев перекрестных инфекций и распространения указанных возбудителей во внутрибольничных условиях. В условиях небольших клинических лабораторий предложенной схемой можно пользоваться для идентификации изолятов, как альтернативой дорогостоящих мульти-тестовых систем.

## Материалы и методы

### Штаммы бактерий

Изоляция бактериальных штаммов проводилась рутинными методами, со всех участков тела. Кроме того, в исследовании использованы штаммы, полученные из катетеров. Большинство штаммов получено случайным способом из образцов мочи, тем не менее, в исследование также были включены изоляты, полученные из крови и ран. Один штамм P.alcalifaciens изолирован из фекалий. Идентификация изолятов проводилась на базе отделения Микробиологии и инфекционных заболеваний при Concord Repatriation General Hospital, Сидней.

Референтные микроорганизмы: Enterobacter cloacae ATCC13047; Escherichia coli ATCC35218; Proteus vulgaris ATCC6380. Штаммы использовались для контроля качества среды, а также для оценки стабильности окрашивания.

### Среда культивирования

Среда CHROMagar Orientation в виде сухого порошка была получена от компании CHROMagar, Париж, Франция посредством организации DUTEC Diagnostics, Сидней. В состав среды входят пептон, мясо, дрожжевой экстракт (16 г/л), агар (15 г/л) и хромогенная смесь; pH 7. Среда распределялась по чашкам Петри (по 17-20 мл на чашку диаметром 85 мм). Хромогенный агар был приготовлен, инкубирован и проанализирован в соответствии с инструкциями производителя, с минимальными модификациями при чтении результатов как это показано в предыдущем исследовании (14). Для субкультивирования и тестирования жизнеспособности микроорганизмов использовались агар MacConkey (CM7, Oxoid, Basingstroke, England) и 5% агар на лошадиной крови. Репликационная среда Mast ID (Mast International Ltd, Merseyside UK) готовилась, инкубировалась и анализировалась в соответствии с инструкциями производителя.

**Идентификация бактерий и сравнительное тестирование**

Для идентификации всех изолятов в первую очередь использовалась система Mast ID, с многоточечной инокуляцией либо с системой репликации (14-15). Биохимические анализы, которые практикуются в госпитале Concord, соответствуют панели API 20E – в комплект входят тесты на о-нитрофенил, B-d-галактопиранозид (ONPG), аргинин-дигидролазу (ADH), лизин-декарбоксилазу (LDC), орнитин-декарбоксилазу (ODC), цитрат (CIT), образование сульфида водорода (H2S), мочевины (UREA), образование фенил-пируватной кислоты (PPA), индола (IND), тест Voges-Proskauer (VP), тест на желатиназу (GEL), тест на ферментацию глюкозы (GLU), тест на маннитол (MAN), инозитол (INOS), сорбитол (SORB), рамнозу (RHAM), сахарозу (SUC), мелибиозу (MEL), амигдалин (AMYG) и арабинозу (ARAB). Система Mast ID была дополнена реакцией на ДНК-азу. Для идентификации микроорганизмов по полученному биохимическому профилю использовалась база данных AI 20E. При культивировании на среде CHROMagar Orientation все микроорганизмы дали описанное выше окрашивание колоний; нормализованная вероятность идентификации составляла 95-99%. Микроорганизмы с более низкой вероятностью идентификации определялись с помощью API 20E (bioMerieux, France). Полученные результаты анализировались при помощи компьютерной программы API 20E версии 3.1. Использовалось дополнительное тестирование (адонитол, салицин) (16, 17). Проведена категоризация Proteus vulgaris по биогруппам, основанная на эскулиновой и салициновой реакциях, описанных Farmer et al (16). Для Proteus vulgaris биогруппы 2 характерна положительная реакция на эскулин и салицин; для микроорганизмов биогруппы 3 характерна отрицательная реакция на эскулин и положительная реакция на салицин.

*Тест на образование индоловых пятен* проводился в соответствии с методикой Vracko и Scherris (18). Подтверждающее тестирование проводилось путем промывки чистых культур стерильным физиологическим раствором, после чего небольшой объем суспензии помещался в пробирку, с добавлением реагента Kovac (DMABA, p-диметиламинобензальдегид – положительный результат – красновато-пурпурное или красное окрашивание) либо DMACA (p-диметиламиноциннамальдегид – положительный результат – синее либо зеленое окрашивание).

*Тесты с энзимными таблетками:*

использовались двойной тест (Rosco Diagnostica, Taastrup, Дания) на орнитин-декарбоксилазу и индоловая реакция. Для теста использовалась сухая суспензия штамма (McFarland # 2), которая помещалась в пробирку с 0.25 мл физиологического раствора. В пробирку добавляли 1 диагностическую таблетку и 3 капли парафинового масла, после чего ее закрывали и инкубировали при температуре 35-37 С в течение 3-4 часов. Положительная реакция оценивалась по синему либо фиолетовому окрашиванию. Об отрицательной реакции свидетельствовало желтое, зеленое либо серое окрашивание. После интерпретации результатов теста на орнитин-декарбоксилазу, в пробирку добавляли 3 капли реагента Kovac; встряхивали в течение 3 мин. и учитывали результаты теста. Учитывалось окрашивание поверхностного слоя. Положительная реакция оценивалась по розовому либо красному окрашиванию, отрицательная – по желтому окрашиванию. Для теста на специфичность ферментации сахаров (маннитол, иннозитол) к подготовленной как описано выше суспензии (McFarland # 2) добавляли одну диагностическую таблетку (Rosco Diagnostica, Taastrup, Дания). Пробирка инкубировалась при 35-37˚С в течение 4 часов. Положительная реакция оценивалась по желтой либо желто-оранжевой окраске; отрицательная – по красной либо оранжево-красной.

*Техника многоточечной инокуляции*

Техника описывалась ранее (14). Все изоляты эмульсифицировались в физиологическом растворе с фосфатным буфером (pH 7.4) (BR 14a, таблетки Dulbecco A, Oxoid); проводилась стандартизация суспензии для достижения содержания микроорганизмов $10^8$ КОЕ/мл. Для инокуляции бактериальной суспензии в агар использовался мультиточечный инокулятор Mast. В данном случае на 1 точку приходилось максимум 36 организмов, общее количество микроорганизмов составляло $10^4$ КОЕ на 1 среде CHROMagar Orientation либо на среде MacConkey (Oxoid, CM7) для определения выживаемости микроорганизмов. Инкубация проводилась с доступом воздуха, при температуре 35-37 С в течение 16-24 часов, в темноте. Оценка результатов производилась в соответствии с инструкторами производителя.

**Интерпретация результатов**

Интерпретация цвета колоний, культивированных на среде CHROMagar Orientation была описана в предыдущем исследовании. Полученные цвета сравнивались с профильными идентификационными системами; позже была составлена база данных с указанием соответствий между отдельными реакциями и результирующим цветом. Эти действия были направлены на проведение точной идентификации микроорганизмов с использованием среды CHROMagar Orientation и ограниченного набора тестов. Для сравнения использовались стандартные мультитестовые наборы, доступные в продаже. Для упрощения использования данной среды в рутинной лабораторной практике нами был разработан ряд схем (Рисунок 1), аналогичных тем, что были представлены Edberg и Trepeta (19).

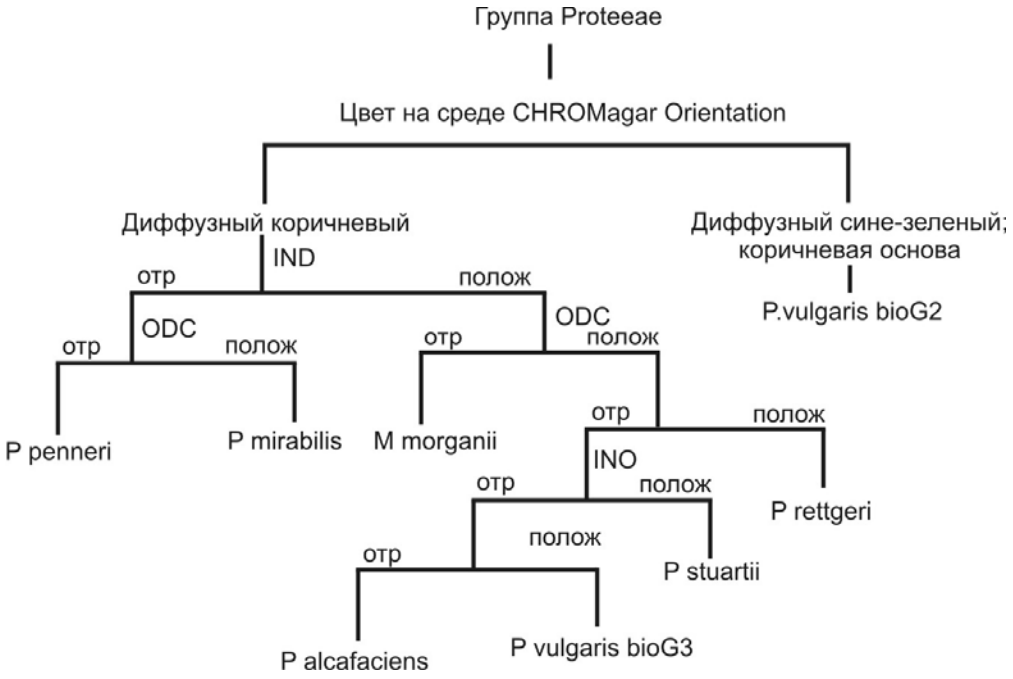


Рисунок 1: алгоритм идентификации типичных представителей Proteea с использованием среды CHROMagar Orientation и нескольких простых тестов

Разъяснения сокращений – см таблицу 1. +-обычно имеется резистентность к хлорамфениколу.

**Результаты**

Все 617 представителей триба Proteeae, которые использовались в рамках данного исследования, давали рост колоний на среде CHROMagar Orientation после 24 часов инкубации; у них имелись отличия от обычных Энтеробактерий по цвету и морфологии колоний.

Proteus mirabilis (n = 449), Proteus penneri (n = 6), Proteus vulgaris биогруппы 3 (n = 18), Providencia stuartii (n = 29), Providencia rettgeri (n = 4), Providencia alcalifaciens (n = 1) при культивировании на среде CHROMagar Orientation давали диффузные колонии коричневого цвета; Proteus vulgaris биогруппы 2 (n = 23) образовывал колонии сине-зеленого цвета с диффузной основой коричневого цвета. Все изоляты Morganella morganii (n = 87) образовывали прозрачные колонии с коричневатой основой.

Используя цветовые характеристики колоний, культивированных на среде CHROMagar Orientation и алгоритм, представленный на Рисунке 1, нами были идентифицированы все представители триба Proteeae вплоть до видового уровня. Алгоритм включал 4 простые биохимические реакции – IND (образование индоловых пятен), ODC (тест на орнитин-декарбоксилазу), MAN (тест на ферментацию маннитола) и INO (тест на ферментацию иннозитола). Схема идентификации сравнивалась с мультитестовой системой Mast ID; корреляция по всем идентифицированным организмам составляла 100%.

В смешанных культурах представители триба Proteeae были легко отличимы от других Энтеробактерий по цвету и морфологии колоний, в соответствии с результатами нашего предыдущего исследования (14). При прямом посеве образцов мочи (n = 10) с образованием чистых и смешанных культур на среде CHROMagar Orientation подтвердилось отсутствие интерференции между цветом колоний/бактериальным пигментом и слизью, а также клеточным материалом.

Таблица 1

Штаммы Proteeae культивированные на среде CHROMagar Orientation и ключевые реакции

| Вид | Количество протестированных штаммов<br>N = 617 | Цвет колоний на среде CHROMagar Orientation* | Основные биохимические тесты+ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | IND | ODC | MAN | INO |
| Proteus spp.<br>P.mirabilis | 449 | C-B диффузный | 0+++ | 449 | 0 | 0 |
| P.vulgaris bioG2 | 23 | B-G диффузный | 23 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| P.vulgaris bioG3++ | 18 | C-B диффузный | 18 | 0 | 0 | 0 |
| P.penneri | 6 | C-B диффузный | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Morganella spp. | | | | | | |
| M.morganii | 87 | CT-B | 87 | 87 | 0 | 0 |
| Providencia spp. | | | | | | |
| P.stuartii | 29 | C-B диффузный | 29 | 0 | 0 | 29 |
| P.alcafaciens | 1 | C-B диффузный | 1 | 0 | 0 | 0 |
| P.rettgeri | 4 | C-B диффузный | 4 | 0 | 4 | 4 |

Маркировка: C-B – диффузный коричневый цвет без примесей; CT-B – прозрачный коричневый цвет без примесей; B-G – сине-зеленый цвет.

Основные реакции: IND – обр-е индоловых пятен; ODC – тест на орнитин-декарбоксилазу; MAN – тест на ферментацию маннитола; INO – тест на ферментацию инозитола

++Providencia alcafaciens – негативный тест на мочевину в сочетании с аналогичными реакциями. Подтверждается положительной адонитоловой реакцией

+++отрицательная реакция

Таблица 2

Цвет колоний типичных представителей Enterobacteriaceae после 24 часов инкубации на среде CHROMagar Orientation

| Вид | Цвет колонии – культивация на среде CHROMagar Orientation (14) |
|---|---|
| Escherichia coli | Розово-красный* |
| Klebsiella spp. | Металлический синий с розовым венчиком или без него |
| Enterobacter spp. | Металлический синий с розовым венчиком или без него |
| Citrobacter diversus | Бледный зеленовато-синий с ярким пурпурным венчиком |
| Citrobacter freundii | Металлический синий с ярким пурпурно-розовым венчиком, либо с фиолетово-пурпурной серединой и розоватым краем |
| Serratia marcescens | Бледно-голубой – по мере выработки пигмента возможно потемнение до синего |
| Serratia liquifaciens | Бледно-голубой |

*орнитофенил-β-D-галактопиранозид (ONPG) позитивные штаммы. ONPG-негативные штаммы бесцветны

+после экспозиции при комнатной температуре с освещением в течение 60 минут

**Обсуждение**

Результаты исследования свидетельствуют о том, что среда CHROMagar Orientation может с успехом использоваться в качестве хромогенного агара для идентификации и дифференциации наиболее распространенных представителей триба Proteeae от прочих Энтеробактерий. При культивировании на данной среде другие виды энтеробактерий давали иначе окрашенные колонии (см предыдущее опубликованное исследование и Таблицу 2). Коричневая пигментация была характерна исключительно для Proteus mirabilis, Proteus penneri, Proteus vulgaris биогруппы 3, Providencia stuartii, Providencia rettgeri, Providencia alcafaciens (14, 20, 21). Proteus vulgaris биогруппы 2 давал характерную только для него сине-зеленую окраску колоний с диффузной коричневой основой. Все 23 протестированных штамма давали четкое окрашивание колоний, позволяющее провести их визуальную идентификацию без дополнительных биохимических тестов. По нашим данным, особенности роста данного вида микроорганизмов на подобной среде описываются впервые. Нами выявлены характерные особенности цвета колоний. В прошлом эти микроорганизмы часто путали с Proteus mirabilis и Proteus penneri (10. 16, 22).

Все штаммы Morganella morganii давали четко окрашенные прозрачные колонии с коричневой основой; в сочетании с индоловым тестом и положительной реакцией ODC этого достаточно для идентификации микроорганизма.

Providencia alcafaciensis, более редкий представитель этого триба, отличается от Proteus vulgaris биогруппы 3 INO-негативной реакцией и отрицательным тестом на мочевину (16, 17).

В рамках предыдущих исследований ряд авторов (16, 17) выступали за использование дополнительных биохимических реакций (D-арабитол, адонитол, салицин, эскулин, трехалоза) для дифференциации отдельных представителей триба. В данном исследовании на фоне использования среды CHROMagar Orientation необходимости в дополнительных тестах не было.

Комбинируя цветовые характеристики, полученные при использовании среды CHROMagar Orientation с 4 дополнительными биохимическими тестами (Таблица 1) и следуя предложенному алгоритму (Рисунок 1) все 612 штаммов удалось точно идентифицировать, результаты совпадали с данными мультитестовой системы Mast ID. Ряд биохимических тестов на хромогенной среде были энзимными и их результаты были готовы через 4 и менее часов (индоловый тест); окончательные результаты были получены спустя 24 часа (18, 23).

Одно из очевидных преимуществ данной среды в том, что она тормозит накопление изолятов на поверхности – что характерно для роста ряда представителей группы Proteeae – таким образом, обеспечивается визуализация роста других микроорганизмов.

Кроме точности, существует еще ряд соображений, в соответствии с которыми необходима полноценная идентификация клинических изолятов в условиях лаборатории (11, 20, 21). Точная идентификация изолятов и своевременное информирование позволяет улучшить эпидемиологическое состояние и уровень его контроля. Представители триба Proteeae – известные нозокомиальные патогенны, некоторые из них обладают резистентностью к антибиотикам, которые используются в клинической практике (1-4).

Morganella morganii, Providencia stuartii, Providencia rettgeri и Providencia alcalifaciens обладают AmpC геном β-лактамазы с индуцируемой экспрессией энзимов (12, 13, 14). Изоляты Proteus vulgaris и Proteus penneri обладают хромосомальными β-лактамазами Класса I (Bush et al, группа 2e), иногда их относят к типу цефуроксимаз. Ампициллин, амоксициллин и цефалоспорины первого поколения являются мощными индукторами энзимов Proteus vulgaris и Proteus penneri, поэтому для них характерны высокие показатели MIC для активированных и подавленных штаммов. Уреидо- и карбокси-пенициллины, а также цефалоспорины третьего поколения являются слабыми индукторами, таким образом, они достаточно активны в отношении штаммов со способностью к индукции. У наиболее распространенного представителя триба – Proteus mirabilis – хромосомная экспрессия β-лактамаз незначительна. Таким образом, идентификация патогенного микроорганизма необходима для эмпирического подбора антибиотикотерапии (2, 12, 13, 24).

## Выводы

Среда CHROMagar Orientation обладает рядом преимуществ перед агаром MacConkey и прочими ранее описанными селективными дифференциальными средами. Она позволяет точно дифференцировать представителей триба Proteeae наряду с параллельной дифференциацией и идентификацией представителей Enterobacteriaceae, которые могут присутствовать в культуре. Практически все представители этой группы образовывали колонии коричневого цвета с диффузной меланино-подобной пигментацией – исключение составляет Proteus vulgaris биогруппы 2, который легко отличить по характерному цвету. Комбинируя характеристики среды с алгоритмом (Рисунок 1) всех представителей группы, описанных в исследовании, можно просто и точно идентифицировать вплоть до видового уровня.

## Благодарности

Я бы хотел поблагодарить сотрудников Отделения Микробиологии и Инфекционных заболеваний при Concord Repatriation general Hospital за техническую помощь. Благодарю Mohammad Siddique за умелое приготовление сред. Благодарю Dr Ross Bradbury, Dr Thomas Gottlieb, Dr Gabrielle O'Kane, Mr Glenn Funnell за ревизию текста.

## Ссылки

1. Burke JP, Ingall D, Klein JO, Gezon HM, Finland M. Proteus mirabilis infections in a hospital nursery traced to a human earner. N Eng J Med 1971; 284: 115-121.
2. Chow AW, Taylor PR, Yoshikawa TT, Guze LB. A nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant Proteus mirabilis: role of intestinal colonization as a major reservoir. J Infect Dis 1979; 139: 621-627.
3. Kocka FE, Srinivasan S, Mowjood M, Kantor HS. Nosocomial multiply resistant Providencia stuartii: a long-term outbreak with multiple biotypes and serotypes