

Тест-система «ИД-СТРЕП» для биохимической идентификации стрептококков

Научный руководитель – Окулич Виталий Константинович

Пинчук Алина Николаевна

Аспирант

Витебский государственный Орден дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь
E-mail: alin.nik@mail.ru

Актуальность. Несмотря на достижения современной медицины, заболевания стрептококковой этиологии занимают ведущее место среди инфекционных заболеваний бактериальной природы, а также остаются одной из актуальнейших проблем, что обусловлено их широким распространением во всех возрастных группах, многообразием клинических форм, опасностью серьезных осложнений и летальных исходов [1, 3].

Произошедшие в последнее десятилетие изменения в таксономии и номенклатуре микроорганизмов привели к резкому расширению идентифицируемых видов, определили необходимость автоматизации и совершенствования методов идентификации [4]. В связи с этим наиболее перспективно использование микрообъемных коммерческих тест-систем, которые позволят существенно упростить и ускорить идентификацию возбудителя, а также позволит получить высокоспецифичный стандартизованный результат.

Цель. Разработать комплексную тест-систему «ИД-СТРЕП» для биохимической идентификации стрептококков.

Материалы и методы. На первом этапе для исследования выделяли чистые культуры микроорганизмов или материал изолированных колоний с плотных питательных сред после первичного посева образца клинического материала. Для обнаружения различных видов стрептококков использовали 5% кровяной Колумбия-агар.

В состав разработанной нами тест-системы «ИД-СТРЕП» для определения видовой принадлежности микробов рода *Streptococcus* входят 22 субстрата с учетом коммерческих характеристик реагентов [2]:

а) тесты на способность утилизировать углеводы (D-рибоза, D-маннит, D-лактоза, D-трегалоза, D-раффиноза, D-сахароза, L-арабиноза, α -циклодекстрин, пуллулан, D-мальтоза, D-мелибиоза, D-мелицитоза, метил- β D-глюкопиранозид, D-тагатоза),

б) тест на определение активности щелочной фосфатазы (4-нитрофенил- β D-галактопиранозид),

в) тесты для определения α -, β -галактозидазной, β -глюкозидазной, пироглютаминат-ариламидазной активностей (4-нитрофенил- α D-галактопиранозид, 2-нафтил- β D-галактопиранозид, резорурфин- β D-галактопиранозид, резорурфин- β D-глюкопиранозид, пироглютаминат- β -нафтиламид),

д) тест на образование ацетоина (натрия пируват),

е) тест на определение способности гидролизовать натрия гиппурат.

Взвешенные субстраты растворяли в определенных буферных растворах с добавлением индикатора (или без него), после чего полученные растворы вносили в лунки планшета с последующим их дегидрированием в течение суток. Для постановки теста по идентификации стрептококков готовили суспензии исследуемых суточных культур на $(2 \pm 0,1)$ мл стерильной деионизированной воде с плотностью 3 оптические единицы *McFarland*, после чего полученную взвесь микроорганизмов вносили по 135 мкл в лунки планшета. Затем планшет накрывали крышкой и инкубировали при температуре $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 18-24

часов в аэробных условиях и производили визуальный/инструментальный учёт. Параллельно для клинических испытаний использовались коммерческие тест-системы фирмы «BioMerieux» (Франция) rapid ID32 STREP и программа bactoSTREP (№954 от 06.06.2017, зарегистрированная в Национальном центре интеллектуальной собственности).

Результаты и обсуждение. Визуальный учёт результатов оценивался на основании цветовых переходов проб, которые произошли в результате биохимических реакций под действием ферментов микроорганизмов. Инструментальный учёт производили с помощью комплексной автоматизированной системы, состоящей из фотометра универсального Ф300, адаптированного для учета результатов по изменению цвета пробы, и компьютера с программным обеспечением bactoSTREP, разработанным совместно с производственным объединением «Витязь».

Параллельная постановка тест-системы «ИД-СТРЕП» и rapid ID32 STREP показала, что полное совпадение результатов с точностью до вида составило 86%. При анализе результатов процент совпадений с точностью до рода и вида в двух программах - 96%. Полное несовпадение результатов идентификации в обеих программах пришлось на 4%.

С целью сокращения времени постановки опыта разработанная тест-система «ИД-СТРЕП» была выпущена в виде комплектов, в состав которых входят следующие компоненты: инструкция по применению, планшет с дегидрированными субстратами - 1 шт., стерильная деионизированная вода (5+0,1) мл в ампуле - 4 шт., наконечники полипропиленовые стерильные для автоматических дозаторов объемом 200 мкл - 4 шт., пакетик с силикагелем - 1 шт. Предложенный нами стандартизованный подход к комплектации тест-систем, наличие в них дегидрированных субстратов позволяет увеличить их срок годности до года с момента выпуска и создаёт возможности по организации промышленного производства.

Имеется регистрационное удостоверение Тест-система «ИД-СТРЕП» для идентификации стрептококков (регистрационный номер Мн-7.1198642-2004), выданное МЗ Республики Беларусь от 19.12.2019 г. Зарегистрированы технические условия «Тест-система «ИД-СТРЕП» для идентификации стрептококков ТУ ВУ 300002704.025 - 2020. Разработана и утверждена инструкция по применению на соответствующую тест-систему.

Выводы.

1. Тест-систему «ИД-СТРЕП» рекомендуется использовать в клинической практике медицинских учреждений, имеющих в своём составе бактериологические лаборатории.
2. Наиболее значимым достижением является практическая реализация автоматизированного рабочего места микробиолога на основе разработанного программного обеспечения, которое включает в себя модель фотометра Ф300, изготовленного на ОАО «Витязь», адаптированного для анализа результатов по цвету пробы в автоматическом режиме и персональный компьютер.

Источники и литература

- 1) Брико, Н. И. Микробиологические и молекулярно-биологические методы в изучении механизма развития эпидемического процесса стрептококковой инфекции (группы А) / Н. И. Брико [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2008. – № 5. – С. 30–33.
- 2) Окулич, В. К. Обоснование выбора тестов при разработке тест-системы для идентификации стрептококков / В. К. Окулич, Ф. В. Плотников, А. А. Кабанова, В. Е. Шилин, С. Д., Федянин, Н. К. Бабака // «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. – Витебск, 2018. – № 73 – С. 111-115.
- 3) Ряпис Л. А., Брико Н. И., Ещина А. С. Стрептококки: общая характеристика и методы лабораторной диагностики / Л. А. Ряпис. – М. : – 2009. – С. 119–133.

- 4) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. // Bennett J. E., Dolin R., Blaser M. J., Cambridge, UK: Elsevier 2014.