МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ДИСБАКТЕРИОЗОВ

КИЕВ — 1986

Основное учреждение-разработчик - Киевский государственный институт усовершенствования врачей, РПИ 85№42

Учреждения-соисполнители - Киевский научно-исследовательский институт эпидемиологии и инфекционных болезней, Львовский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

Фамилия, имя, отчество авторов метода, телефоны - проф. Знаменский В.А. к.м.н. Дегтяр Н.В., к.м.н. Кузьминский С.Н., д.м.н. Кейсевич Л.Б., Саргсян В.П., тел. 441-40-18; проф. Бернасовская Е.П., к.м.н. Калюжная Л.Д., тел. 77-42-66; к.с.н. Даниленко И.И., тел. 69-43-54; д.м.н. Костюковская О.Н., Гладкая Е.А., тел. 72-90-69

Рецензенты - Дивинская М.А.

Председатель экспертной комиссии - проф. Борзунов Е.Е.

Обов'язковий примірник

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

"Согласовано"
Начальник главного
управления научно-
исследовательских работ
Минздрава УССР

П.М.ПЕРЕХРЕСТЕНКО

10. 10. 1986 г.

"Утверждаю"
Зам.министра
здравоохранения УССР

П.Г.ОТРОЩЕНКО

10.10. 1986 г.

497263

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ДИСБАКТЕРИОЗОВ

Киев - 1986

Дисбактериоз - диагноз - бактериологический
616.34-008.87-078
Б-58 415

В методических рекомендациях изложены современные данные о нормальной микрофлоре человека и значении диагностики дисбактериозов для эффективной профилактики и лечения различных патологических состояний и послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений. Описаны методы микробиологического исследования на кишечный, кожный дисбактериозы и диагностические критерии.

Методические рекомендации предназначены для бактериологов лечебных учреждений, санитарно-эпидемиологических станций, педиатров и врачей отделений хирургического профиля.

Республиканская научная медицинская библиотека имени Д. І. Улянова
МОЗ УРСР
252017 м. Київ, вул. Толстого № 7
№ 14

Введение

До последнего времени в клинической микробиологии исследование количественного и качественного состава нормальной микрофлоры проводили, главным образом, для диагностики кишечного дисбактериоза. При этом основными показаниями для исследования являлись длительно протекающие кишечные дисфункции, при которых не удается выделить патогенную микрофлору, затянувшийся период реконвалесценции после дизентерии и других острых кишечных заболеваний, а также возникновение дисфункции кишечника на фоне внеэнтеральной патологии /пневмония, гнойно-септические заболевания/ при длительном лечении антибиотиками.

Внимание уделялось, прежде всего, клинически выраженному, декомпенсированному дисбактериозу кишечника, при котором наблюдается стойкое качественное и количественное изменение нормальной микрофлоры кишечника в сторону снижения количества аспорогенных анаэробов /как правило, параллельно бифидо- и лактобактерий/, роста удельного веса атипичных эшерихий /с ослабленными биохимическими свойствами, гемолитической активностью и др./, увеличения количества факультативно-нормальной микрофлоры при обнаружении кишечной микрофлоры в нетипичных для нее местах.

Дисбактериоз, наряду с диспепсией, энтеритом, может приводить к развитию острого и хронического колита /наиболее тяжело протекает хронический язвенный колит/, осложнять течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, гепатохолецистита, панкреатита:

В последние годы показания для исследования на дисбактериоз значительно расширились. Прежде всего, дисбактериоз кишечника

стали рассматривать как важный интегральный показатель иммунологической реактивности организма. При этом важное значение приобретает дисбактериоз и в стадии компенсации, являющийся ранним показателем развития вторичного иммунодефицита. Особое значение исследования по диагностике дисбактериоза кишечника и кожи приобретают при проведении иммунодепрессивной терапии, аутоиммунных заболеваниях соединительной ткани, осложнениях, возникающих при введении тканевых и корпускулярных антигенов. Диагностика кожного дисбактериоза приобретает важную роль в плане профилактики внутрибольничных инфекций.

В проведении комплекса мероприятий по профилактике острых кишечных инфекций в детских учреждениях до настоящего времени не учитывается тот факт, что сезону эпидемической заболеваемости предшествует рост дисбактериозов, повышающих восприимчивость детей к заражению различными возбудителями. Применение эубиотических препаратов может в таких случаях повысить неспецифическую резистентность организма к кишечным инфекциям.

Значениесвоевременнойдиагностики кишечного и кожного дисбактериозов у различных больных, особенно хирургического профиля, возрастает еще и потому, что он сопровождается активизацией условно патогенной микрофлоры, повышением ее патогенных потенций. Это означает, что на фоне снижения резистентности больного организма, усугубляемого оперативным вмешательством и другими лечебными мероприятиями, оказывающими иммунодепрессивное действие, усиливается резервуар потенциально патогенной микрофлоры, что чревато развитием гнойно-септических осложнений.

В хирургических стационарах больных с выраженными явлениями кожного и кишечного дисбактериоза следует причислять к груп-

пе повышенного риска возникновения гнойно-септических осложнений. Такие больные требуют определенной степени разобщения с основным потоком больных, применения иммуностимулирующих средств и эубиотиков, проявления особой настороженности в отношении возникновения нагноений после операции.

Опыт диагностической, профилактической и лечебной работы в практическом здравоохранении свидетельствует о необходимости более широкого внедрения методов диагностики кожного и кишечного дисбактериозов.

Настоящие методические рекомендации ставят своей целью предложить вниманию специалистов современные данные об аэробной и анаэробной микрофлоре кишечника здорового человека, положении условно патогенных бактерий в нормальном биоценозе кишечника и их роли в формировании дисбактериоза, модифицированную методику бактериологического исследования на дисбактериоз, усовершенствованную трактовку результатов с использованием критериев определения этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов при острых кишечных заболеваниях и критериев, характеризующих эти микроорганизмы как показатель дисбиотических нарушений.

I. Основные представители аутомикрофлоры кожи и кишечника в норме и при дисбактериозе

I.I. Аутомикрофлора кожи

К микроорганизмам, постоянно обитающим на здоровой коже человека, относят, главным образом, коагулазоотрицательные стафилококки /St. epidermidis, St. haemolyticus, St. hominis, St. capitis/, микрококки/M. luteus, M. varians, M. kristinae, M. sedentarius/ и дифтероиды/ преимущественно Propionobacterium acnes /. При повышенной секреции кожного жира/липида/ и других обменных нарушениях интенсивное образование ненасыщенных жирных кислот обильно размножающимися липофильными пропионобактериями и стафилококками может обусловить воспаление сальных желез, проявляющееся как вульгарные угри.

Изредка на коже могут быть обнаружены грамотрицательные палочки, в том числе клебсиеллы и синегнойная палочка, аэробные спорообразующие грамположительные палочки, золотистый стафилококк. Однако они не могут быть отнесены к нормальной кожной микрофлоре. В частности, у постоянных носителей золотистого стафилококка выявлено снижение синтеза или полное отсутствие секреторных иммуноглобулинов "А", что в комплексе с другими факторами обусловливает повышенную восприимчивость таких лиц к гнойно-воспалительным заболеваниям.

На коже здорового взрослого человека обычно не встречаются кишечные палочки, кандиды, грамотрицательные бесспоровые анаэробы.

Стафилококки и микрококки - грамположительные факультативно анаэробные и аэробные кокки, обладают каталазой. У здоровых людей стафилококки представлены, главным образом, St. epidermidis и другими коагулазоотрицательными видами из группы эпидермидис. Как и микрококки, эпидермиальные стафилококки у здоровых людей не вызы-

вают гемолиз и не окисляют маннит. Они хорошо растут на простых питательных средах, образуя колонии белого, жёлтого, кремового цветов.

Пропионобактерии - грамположительные неспорообразующие неподвижные палочки. Обычно плеоморфные - дифтероидные или булавовидные с одним округленным концом, другим - конусообразным, заостренным, окрашивающимся менее интенсивно. Клетки обычно располагаются короткими цепочками или группами в виде "китайских иероглифов". Оптимальная температура роста 30-37°С, pH 7,0, устойчивы к 20% желчи и 6,5% раствору хлористого натрия. Образуют кислоту из глюкозы и непостоянно - из маннита. Являются анаэробами, но обладают аэротолерантностью: могут расти и в присутствии небольших количеств кислорода/в эксикаторе со свечой/. Твин-80 стимулирует рост большинства штаммов. Колонии обычно мелкие, могут быть белыми, серыми, реже - жёлтыми и оранжевыми.

Бактерии на коже располагаются гнездно, образуя микроколонии преимущественно под слоем ороговевших клеток эпидермиса в устьях волосяных фолликулов, потовых и сальных желез, причем в глубине располагаются анаэробы, а ближе к поверхности - аэробы. При потении, длительном интенсивном мытье рук микроорганизмы выходят на поверхность, и обсеменённость кожи может значительно возрастать.

Количество и состав бактерий на различных участках кожи определяются наличием питательных веществ/главным образом, кожного липида/, влажностью, кислотностью и, отчасти, температурой. Обильная секреция, повышенная влажность, нейтральный pH, относительно повышенная температура обусловливают высокую микробную обсеменённость. На коже живота она составляет около 10^4 клеток/см^2 с преобладанием дифтероидов/70%/, а на коже предплечья находится в среднем 10^3 клеток/см^2, причем гораздо выше удельный вес кокков/25%/.

На среду с отпечатка кожи предплечья здоровых людей выделяются до 10 колоний на 1см^2, а с кожи живота - примерно 1,5 раза больше.

Микрофлора кожи изменяется в зависимости от возраста, времени года, климатических условий. Кожа новорождённых покрыта более плотным слоем липида по сравнению с кожей детей грудного возраста, поэтому общее количество бактерий на коже новорождённых больше, а процент липофильных дифтероидов выше, чем у детей более старшего возраста. В зрелом возрасте бактериальная флора бедна вследствии хорошо выраженного бактерицидного действия ненасыщенных жирных кислот на коже. В основном обнаруживаются кокковая флора и дифтероиды. В преклонном возрасте количество кожной микрофлоры вновь возрастает, однако в связи со снижением уровня секреции кожного липида удельный вес дифтероидов уменьшается, чаще высеваются грамотрицательные бактерии, кандиды.

Липофильные дифтероиды и коагулазоотрицательные стафилококки за счёт ненасыщенных жирных кислот, образующихся при расщеплении ими кожного жира, а также за счёт своих антибиотиков и бактерицинов обезвреживают посторонную, в том числе условно-патогенную, микрофлору, постоянно попадающую на кожу. Так, нанесённая на здоровую кожу кишечная палочка обычно погибает в течение нескольких минут. Выявлена обратная связь между содержанием дифтероидов на коже и её микробной обсеменённостью. При высокой микробной обсеменённости кожных покровов удельный вес дифтероидов составляет 10-15% на коже предплечья, а при более низкой обсеменённости он достигает до 30-40%.

I.2. Аутомикрофлора кишечника

Диагностика дисбактериоза кишечника, в основном, осуществляется путем изучения микрофлоры толстого кишечника. В некоторых случаях имеет значение исследование содержимого двенадцатиперстной кишки и желчевыводящих путей /при дуоденальном зондировании или фиброгастродуоденобиопсии/. Микрофлора двенадцатиперстной кишки немногочисленна и состоит, главным образом, из лактобактерий, бифидобактерий, фекального стрептококка в количествах, не превышающих 10^4 - 10^5 /мл содержимого. Полагают, что у здоровых людей желчевыводящие пути микрофлору не содержат.

Микрофлора толстой кишки наиболее разнообразна по видовому составу и условно может быть подразделена на несколько групп.

Облигатная, или постоянная часть микрофлоры обладает выраженными антагонистическими свойствами в отношении многих бактериальных и вирусных возбудителей острых кишечных заболеваний /ОКЗ/, участвует в продукции витаминов и ферментов, стимулирует деятельность кроветворных органов и иммунологическую резистентность организма человека.

Основными представителями облигатной флоры являются бифидобактерии, лактобациллы, бактероиды, кишечные палочки и энтерококки.

Удельный вес анаэробов составляет 90 % и более всей микрофлоры. Основным представителем облигатной анаэробной микрофлоры являются бифидобактерии, которые обнаруживаются у здоровых взрослых и детей в 100 %. В норме количество бифидобактерий в испражнениях равно 10^8 - 10^{10}/г.

По морфологии бифидобактерии представляют собой крупные грамположительные бесспоровые палочки, имеющие раздвоение на

концах. Но могут встречаться ровные, слегка изогнутые палочки с шарообразными вздутиями или с утонченными концами. Располагаются в мазке изолированно или в виде буквы V. Строгие анаэробы. При посеве в высокий столбик среды Блаурока определяется 4 наиболее встречающихся вида колонии: чечевицеобразные, ромбовидные, треугольные и бесформенные шероховатые в виде "клочка ваты", как правило, белого цвета.

Общепризнанным является тот факт, что высокое содержание бифидобактерий в испражнениях препятствует размножению гнилостной газообразующей и патогенной микрофлоры, способствует всасыванию кальция, железа, витамина Д, синтезу витаминов группы "В" и "К". Наблюдается выраженная коррелятивная связь между снижением количества бифидобактерий и частотой обнаружения бактериемий у детей, тяжестью и длительностью течения пневмоний. Снижение уровня бифидобактерий ниже нормы приводит, как правило, к дисфункции кишечника даже при нормальном состоянии аэробной микрофлоры.

К представителям анаэробной микрофлоры относятся и бактероиды, - грамотрицательные, неспороносные палочки, строгие анаэробы, что значительно затрудняет их культивирование. Их количество равно 10^6 - 10^{11}/г испражнений. Спороносные анаэробные микроорганизмы, относящиеся к роду Clostridium, обнаруживаются в кале здоровых людей в 20-50 %.

К облигатной микрофлоре относят лактобактерии, которые обнаруживаются у здоровых людей в 90-100 % случаев в количестве 10^6 - 10^9/г испражнений. Это грамположительные палочки с выраженным полиморфизмом, располагающиеся цепочками или поодиночке, бесспоровые, могут иметь включения /волютин/, неподвижные, факультативные анаэробы или микроаэрофилы.

Для их культивирования применяют среды с низкими значениями pH 5,5-5,6. Наиболее распространённой средой для их культивирования является МРС-2.

Аэробная часть облигатной микрофлоры представлена кишечной палочкой, наличие которой характерно для 100% здоровых людей. Её количество у различных лиц колеблется в широких пределах, но у подавляющего большинства здоровых лиц от 1 до 200 млн/г. Это затрудняет определение границ нормы. На количественное содержание кишечной палочки в испражнениях сказывает влияние сезонность, характер пищи и другие факторы.

У 15-20% здоровых лиц могут встречаться кишечные палочки со слабоферментирующими свойствами, однако количественное содержание таких изменённых форм составляет не более 10% по отношению к общему числу кишечных палочек.

Гемолитические кишечные палочки не характерны для микрофлоры здорового человека.

Энтерококки обнаруживают в 80-100%, количество не превышает у здоровых 10^4/г испражнений.

Факультативная микрофлора включает виды, которые довольно часто обнаруживают в испражнениях здоровых людей, но в незначительных количествах. Они относятся преимущественно к условно-патогенным микроорганизмам и в некоторых случаях могут играть роль этиологического фактора при острых кишечных заболеваниях. Видовой состав факультативной флоры лабилен. К этой группе относят стафилококки, протеи, клебсиеллы, цитробактер, энтеробактер, синегнойную и другие неферментирующие грамотрицательные палочки, грибы рода кандида.

Высеваемость их у здоровых людей вариабельна. Стафилококки обнаруживаются у 16,7-23,3% при их содержании до 10^3-10^4/г испражнений. Гемолитические стафилококки определяют редко.

Частота обнаружения бактерий рода цитробактер колеблется от 5,8 % до 20,9 %, бактерий рода энтеробактер 8,3 % - 11,8 %, бактерий рода клебсиелла - 3,3 % - 14,3 %, протеус 1 % - 10,7 %. Массивность обсеменения фекалий условно патогенными энтеробактериями у здоровых лиц, как правило, не превышает 10^4 м.к./г. Грибы рода Кандида обнаруживаются в 14 %, их количество в норме не превышает 10^3/г испражнений.

1.3. Характеристика микробиоценоза кожи и кишечника при дисбактериозах

Изменения бактериальной аутфлоры кишечника и кожи происходит под воздействием самых различных факторов, снижающих иммунологическую реактивность / ферментативная недостаточность, голодание, авитаминоз, стрессовые состояния, активная терапия гормонами, иммунодепресантами и антибиотиками, острые и, особенно, хронические заболевания/.

Экстремальные состояния и патологические процессы в макроорганизме, приводящие к возникновению вторичного иммунодефицита, существенно влияют на состояние аутомикрофлоры кожи. В результате изменения микробиоценоза кожи развивается дисбактериоз. Отмечается рост микробной обсемененности кожных покровов. Проводимые нами исследования показали, что если в норме количество микроколоний на 1 $см^2$ кожной поверхности не превышает 10 колоний, то при дисбактериозе оно обычно равно 20 кол/$см^2$ и более, в выраженных случаях обнаруживается сплошной рост. Наряду с увеличением микробной обсемненности кожи возрастает удельный вес условно-патогенных форм - гемолитических и маннитоположительных. Наши исследования показали, что наиболее ранним и достоверным пока-

зателем дисбактериоза является гемолитический признак. В норме гемолитические формы не встречаются или у отдельных лиц не превышают 10%, а при дисбактериозе составляют 20%, в выраженных случаях - 50% и более. Процент маннитположительных колоний является менее характерным, но в большинстве случаев и он нарастает при дисбактериозе. В норме он не превышает 6-8%, при дисбиотических состояниях достигает 20% и более.

Первоначально дисбактериоз рассматривали как состояние аэробной микрофлоры, которое характеризуется уменьшением общего количества антагонистически активных, ферментирующих лактозу кишечных палочек и относительным увеличением слабо ферментирующих и гемолизирующих штаммов.

К настоящему времени накоплены новые данные о характере изменений в облигатной и факультативной группах кишечной микрофлоры при дисбактериозе. Нарушение экологического баланса в кишечнике при дисбактериозе приводит к изменению соотношения между анаэробной и аэробной микрофлорой. Взаимоотношения между этими двумя группами бактерий подвержены наибольшим и ранним изменениям, проявляющимся в снижении содержания бифидобактерий до 10^{-5}-10^{-7} и возможном увеличении кишечных палочек.

При выраженной степени дисбактериоза бифидобактерии обнаруживаются в разведениях 10^{-5}-10^{-7} или не высеваются вовсе.

Общее количество кишечных палочек , учитываемое на среде Эндо, увеличивается и может превышать 200-300 млн/г, что может быть использовано в качестве одного из критериев дисбактериоза. Нарастание количества кишечных палочек нередко сопровождается появлением штаммов с изменёнными свойствами, а также других условно-патогенных энтеробактерий. Отсутствие кишечных палочек

при посеве разведения 10^{-5} /т.е. менее I млн. на I г/ также является одним из показателей дисбактериоза. Следует отметить, что примерно в 5% случаев дисбактериоз кишечника характеризуется снижением содержания полноценных кишечных палочек/менее Iмлн./.

Более поздние стадии дисбактериоза характеризуются снижением содержания лактобацилл, которые также, как и бифидобактерии, при этом обнаруживаются в низких разведениях фекалий - 10^{-5}-10^{-7}. Пониженное содержание лактобацилл отражает более глубокие сдвиги в кишечной микрофлоре.
Энтерококки обнаруживают сходную с кишечными палочками тенденцию к увеличению.

Снижение числа анаэробных представителей облигатной микрофлоры, обладающих высокой антагонистической активностью, создаёт условия для развития условно-патогенных микроорганизмов. Чаще всего развиваются условно-патогенные энтеробактерии, стафилококки, грибы рода Кандида.

При этом стафилококки достигают 10^5-10^6 микробных клеток/см^3 а грибы рода Кандида - 10^4-10^6 микробных клеток в I г фекалий.

Выявление условно-патогенных энтеробактерий/рода клебсиелла, цитробактер, протеус, энтеробактер/ в количестве свыше 10^4 является показателем дисбактериоза, а также может свидетельствовать об острых кишечных заболеваниях. Следует отметить, что при дисбактериозе условно-патогенные микроорганизмы часто встречаются в ассоциациях.

Помимо количественных нарушений в облигатной и факультативной микрофлоре, при дисбактериозе могут наблюдаться и её качественные изменения, выражающиеся в увеличении общего количества

кишечных палочек с измененными биологическими свойствами /лактозонегативных, неподвижных, безиндольных форм/ - до 25-30 %, появлении отсутствующих в норме гемолизирующих эшерихий и стафилококков /23-28 %/.

Состав микрофлоры при дисбактериозе более пестрый и содержит несколько видов, не характерных для нормобиоциноза кишечника, на фоне снижения анаэробной и увеличении аэробной микрофлоры.

При этом не выявляется нарастание антител к аутоштаммам условно патогенных энтеробактерий.

2. Методы бактериологического исследования

2.1. Показания к проведению бактериологического исследования на дисбактериозы

Показаниями к исследованию на дисбактериоз кишечника являются:

1. Длительно протекающие кишечные расстройства /дисфункции/, при которых не удается выделить патогенные микроорганизмы.

2. Затянувшийся период реконвалесценции после дизентерии и других острых кишечных заболеваниях.

3. Дисфункция кишечника у лиц, длительно подвергающихся воздействию некоторых производственных вредностей /антибиотики, радиация, химические вещества и др./, а также при интенсивной антибиотико-и/или/ иммунодепрессивной терапии.

4. Наличие так называемого "безочагового" сепсиса или бактериемии, гнойно-воспалительных очагов, трудно поддающихся лечению /пиэлиты, холециститы, язвенные колиты и энтероколиты, вялотекающие пневмонии и др./.

5. Перед операциями на органах пищеварения.

6. У недоношенных новорожденных.

Исследование на дисбактериоз кожи проводят, главным образом, для прогнозирования возникновения гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде, а также на фоне длительной антибиотикотерапии, лучевой и химиотерапии. Этот метод применяют и для оценки состояния иммунологической реактивности организма больного в процессе лечения и после него.

2.2. Диагностика дисбактериоза кожи

Для текущей диагностической работы применяют контактные методы /методы отпечатков/ по Н.Н. Клемпарской и Г.А. Шальновой /1966/, используя агаровые среды, нанесенные на поверхность предметных стекол, и метод Selwyn a. Ellis /1972/ с использованием лейкопластыря, модифицированный авторами.

Эти методы позволяют выявить, главным образом, постоянную /резидентную микрофлору, находящуюся на коже в виде микроколоний, и не дают представления об истинном /абсолютном/ количестве микроорганизмов. Для диагностики дисбактериоза достаточно проведение качественного анализа микрофлоры, вегетирующей на коже. Ее количественное определение выполняют в редких случаях.

Для исследования микрофлоры кожи в научных целях применяют метод смыва по Williamson a.Kligman /1965/ с использованием детергента Тритон Х-100. Благодаря достигаемого с его помощью полного разобщения микробных клеток, этот метод позволяет определить абсолютное число микроорганизмов на данном участке кожи. Первым этапом метода является приготовление стандартных цилиндров путем разрезания на две части пробирок диаметром 1,5 см. Цилиндры стерилизуют в автоклаве и хранят в упакованном виде до использова-

ния. При взятии смыва с исследуемой кожи, цилиндр прижимают к избранному участку торцовой частью и наливают в него I мл 0,1 % раствора детергента Тритон Х-100 в 0,075М фосфатном буфере pH 7,9,-8,0. В течение одной минуты путем пипетирования, этим раствором производят смыв с ограниченного цилиндром участка кожи, а затем отбирают эту жидкость в пробирку. Манипуляцию повторяют еще раз, используя новый цилиндр и свежую порцию раствора. Оба смыва объединяют в одной пробирке, делают 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} разведения. По 0,I мл из этих разведений высевают на чашки Петри с 1,2 % МПА. После инкубации при 37^{0}С в течение 48 часов учитывают результаты и делают пересчет на I $см^{2}$.

Ориентировочное определение соотношения кокков и дифтероидов на коже проводят путем микроскопии мазка из первого разведения смывной жидкости. Для этого надо посмотреть не менее 5-6 полей зрения.

Метод Selwyn a.Ellis /1972/в модификации авторов. От тулопа лейкопластыря отрезают кусок размером 3 х 5 см и прижимают липкой стороной к коже внутренней поверхности предплечья, предварительно обрабатанной 0,25 % раствором аммиака, используя стерильный ватный тампон, смоченный в 0,25 % раствора аммиака. При этом не касаются руками центральной части отрезка лейкопластыря, которой производят отпечаток. Снимают лейкопластырь с кожи, и его центральной частью с площадью, не менее 2/3 площади отрезка, делают отпечаток на поверхности среды Эндо, кровяного агара /желательно желточно-кровяного агара/ и среды Коростелева, разлитых в чашки. На одну чашку делается два отпечатка двумя разными отрезками лейкопластыря с одного и того же участка. После инкубации чашек при 37^{0}С в течение 24 часов учитывают результаты.

Республіканська наукова медична бібліотека імені Д. І. Ульянова
МОЗ УРСР
252017 м. Київ, вул. Толстого № 7
№ 14

497263

Для контроля стерильности внутренней поверхности лейкопластыря, следует делать контрольный отпечаток на кровяной агар отрезком из каждого рулона лейкопластыря.

Метод Н.Н. Клемпарской и Г.А. Шальновой /1966/. На поверхность стерильных предметных стекол пипеткой наносят расплавленные на водяной бане агаровые среды - Эндо, кровяной агар, среду Коростелева. После застывания агара, предметными стеклами берут отпечатки с кожи внутренней поверхности предплечья, предварительно обработанной 0,25 % раствором аммиака для удаления поверхностной микрофлоры, не имеющей диагностического значения. После получения отпечатка, стекла помещают в термостат /в условиях влажной камеры/ при 37°С на 24 часа. Затем подсчитывают количество колоний, процент желтых /маннитположительных/ колоний на среде Коростелева, отмечают наличие колоний энтеробактерий на среде Эндо. Подсчет колоний производится со всей площади предметного стекла.

2.3. Диагностика дисбактериоза кишечника

Кал для исследования доставляется без консерванта не позже 2 часов с момента отбора. Материал доставляемый в более поздние сроки должен сохраняться не более 4 часов при +4 - +6°С. Кал отбирается в предварительно взвешенные флакончики в количестве 0,5-1,0 г, после повторного взвешивания устанавливается вес пробы и добавляется такое количество изотонического раствора хлорида натрия, чтобы получить разведение 10^{-1}. Путем последовательных разведений из основного готовят разведение 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} отдельными стерильными пипетками.

I. Для выявления патогенных энтеробактерий нативный материал жидкой консистенции или разведение плотных испражнений 10^{-1} петлей засевают на среду Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит-агар и производят посев I-2 мл на среды обогащения /магниевую, селенитовую, разлитые в пробирки по 5-7 мл/.

2. Из разведения 10^{-3} по 0,I мл засевают на среду Сабуро с добавлением антибиотиков /пенициллина и стрептомицина по 500 МЕ/мл каждого или левомицетина по 0,05 мг/мл /, для обнаружения грибов рода кандида. 0,I мл засевают на ЖСА для выявления стафилококков.

Из разведения 10^{-5} по 0,I мл засевают на среду Эндо и 0,0I мл на 5 % кровяной агар для выделения и количественного учета энтеробактерий, неферментирующих ГОБ, кокковой группы микроорганизмов, гемолитических форм.

Из разведения 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} по I мл засевают в регенерированную среду Блаурокка или среду "для контроля стерильности" или гидролизатно-молочную среду для выявления бифидобактерий.

3. Для количественного определения лактобактерий /при длительно протекающих дисбактериозах/ по I мл из этих же разведений производят посев на среду МРС-2.

Посевы инкубируют при 37° 24-48 часов. Посевы на среде Сабуро 48 часов инкубируют при 37°С и еще 3 суток при комнатной температуре. Выделение патогенных энтеробактерий в дальнейшем осуществляется по общепринятой схеме.

Для выявления дисбактериоза производят количественный учет выросших микроорганизмов на ЖСА, Сабуро, Эндо и 5 % кровяном агаре с пересчетом на I г фекалий, учитывая при этом дозу засеянного материала и степень его разведения. Кроме того, на чашке с

5 % кровяным агаром отмечается наличие гемолитических форм как кишечной, так и кокковой микрофлоры, процент их от общего количества выросших колоний, соотношение кишечной и кокковой микрофлоры.

Наличие бифидобактерий определяется по характеру роста на среде Блаурюкка или других аналогичных средах и микроскопии мазков, окрашенных по Граму. Количество бифидобактерий и лактобацилл в I г фекалий определяют по предельному разведению. При наличии роста стафилококков на среде ЖСА, кандида - на среде Сабуро, идентификация их осуществляется согласно принятым методикам. Со среды Эндо отсевают лактозоотрицательные и доминирующие лактозопозитивные колонии для дифференциации кишечных палочек, цитробактера, энтеробактера. С 5 % кровяного агара снимают гемолитические колонии, а также колонии тех микроорганизмов, которые дали рост только на этой среде.

С целью упрощения исследования на дисбактериоз можно пользоваться методом секторного посева по Гоулду. Для этого петлей с внутренним диаметром 3 мм из разведения кала 10^{-1} производится посев на среду Эндо, Плоскирева, 5 % кровяной агар, ЖСА, Сабуро.

После инкубации производится учет выросшей микрофлоры и определение ее количества в I мл материала по расчетной таблице.

Для количественного определения в I г кала, полученный результат умножается на 10, если посев осуществлялся из разведения 10^{-1}.

Посев на среду Плоскирева используется для количественного учета протеев, обладающих ползучим ростом.

Секторные посевы на средах Эндо, Плоскирева могут быть использованы и для выделения патогенных энтеробактерий.

3.1. Оценка результатов исследования

О наличии и степени дисбактериоза кожи судят по комплексу признаков. Так, о выраженном дисбактериозе свидетельствует - наличие грамотрицательных бактерий на среде Эндо(энтеробактерии и неферментирующие палочки - псевдомонады и ацинетобактеры), наличие густого роста на кровяном агаре(более 20 колоний на I $см^2$), значительное количество гемолитических колоний(более 10% всех колоний на кровяном агаре), колоний, обладающих одновременно гемолитической и лецитовителазной активностью(более 4% всех колоний на желточно-кровяном агаре), маннитположительных колоний(более 10% всех колоний на среде Коростелева). Следует однако отметить, что последний показатель является весьма вариабельным и имеет наименьшее диагностическое значение.

При обнаружении на коже хирургических(в том числе ожоговых) больных посторонней микрофлоры(в первую очередь условно-патогенной) рекомендуется идентифицировать её до уровня рода, а также определить чувствительность к антибактериальным препаратам и при необходимости к антисептикам.

Изолированное выявление какого-либо одного из перечисленных признаков говорит о компенсированном дисбактериозе.

Экспериментально установлено, что существует прямая связь между состоянием кожной и кишечной микрофлоры. Имеются данные, указывающие на то, что кожная микрофлора является более чувствительным индикатором уровня резистентности макроорганизма, чем микрофлора кишечника.

3.2. Дисбактериоз кишечника диагностируется по следующим признакам:

1. Обнаружение бифидобактерий в разведении, ниже 10^{-8}.
2. Увеличение количества лактозоотрицательных или медленно

сбраживающих эшерихий более 10% от общего количества эшерихий.

3. Появление гемолитической микрофлоры, которая должна отсутствовать у здоровых людей.

4. Обнаружение условно-патогенных грамотрицательных палочек свыше 10^4 в I г испражнений(протеи, клебсиеллы, цитробактер, псевдомонады, ацинетобактеры и др.).

5. Обнаружение грибов рода кандида более, чем 10^3 в I г.

6. Обнаружение золотистых стафилококков более, чем 10^4 в I г.

7. Увеличение(свыше 200 млн./г или снижение менее I млн./г) кишечной палочки. Данный критерий имеет значение только в сочетании с другими признаками дисбактериоза.

Для дисбактериоза характерно сочетание нескольких показателей изменения микрофлоры кишечника и возникновения новых ассоциаций в динамике развития заболевания.

Для оценки степени дисбактериоза предлагается следующая схема:

I степень: нарастание количества условно-патогенных микроорганизмов при высоком уровне бифидобактерий(10^{-9}). Дисбактериоз, как правило, компенсирован и может выявляться у практически здоровых лиц.

2 степень: бифидобактерии определяются на нижней границе нормы(10^{-8}) и наблюдается нарастание ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов. Наблюдается дисфункция кишечника.

3 степень: уменьшение количества(менее 10^{-7}) бифидобактерий, сочетанный изменениями в аэробной микрофлоре. Декомпенсированный дисбактериоз.

Редко, может определяться дисбактериоз с изменениями бифидобактерий при нормальном состоянии аэробной микрофлоры.

Обследуемые, у которых обнаруживаются только качественные изменения аэробной микрофлоры(появление гемолитических форм, нарастание лактозоотрицательных штаммов кишечной палочки) могут расцениваться как контингенты повышенного риска.

При выделении условно-патогенных микроорганизмов в значительных концентрациях(10^6/г и более) возникает необходимость дифференцации состояния дисбактериоза и ОКЗ, вызванного соответствующим микроорганизмом.

Достоверный диагноз может быть поставлен только на основании тщательного анализа результатов клинического, бактериологического и серологического исследований.

Если дисбактериоз развивается сравнительно постепенно на фоне действия таких факторов, как антибиотикотерапия, радиация, химические и другие профессиональные вредности, хронические заболевания и др., то ОКЗ, как правило, начинается остро, с характерным комплексом клинико-лабораторных показателей.

Кроме того, при ОКЗ:

1) возбудитель (доминирующий условно-патогенный микроб или монокультура) выделяется в наибольшей концентрации в первые дни заболевания, с последующим снижением и исчезновением в процессе этиотропной терапии (при дисбактериозе характерно стойкое выделение условно-патогенных микроорганизмов, как правило, в ассоциациях);

2) преимущественно выделяются определённые серовары условно-патогенных бактерий (протеус, цитробактер, клебсиелла);

3) диагноз подтверждается нарастанием титра антител к аутоштамму (в 2-4 раза в первые 2 недели заболевания).

Повторное исследование рекомендуется проводить с интервалом 10-15 дней. В некоторых случаях наблюдается медленное восстановление микрофлоры в течение нескольких месяцев.

Результат бактерилогического исследования фекалий

От_____198 г. анализ №_____

Фамилия, имя, отчество_____

Анализ первичный, повторный(подчеркнуть)

Учреждение_____

Микрофлора	Норма у больного
I. Патогенные микробы семейства кишечных	0
2. Бифидобактерии	10^{-8} и выше
3. Лактобациллы	10^{-8} и выше
4. Общее количество кишечной палочки	10^{6} - 4.10^{8}
5. Кишечная палочка со слабо выраженными ферментативными свойствами	до 10%
6. Гемолизирующая кишечная палочка	0
7. УПЭ(протей, клебсиелла, энтеробактер, цитробактер), ацинетобактер и др.	до 10^{4}-10^{5}
8. Стафилококк	до 10^{4}
9. Гемолизирующий стафилококк	0
10. Грибы рода кандида	до 10^{3}

Дата выдачи ответа

Врач

Приложения

I. Среда Коростелева.

К 100 мл расплавленного и охлажденного до 45° стерильного питательного агара добавляют I г маннита и 0,3 мл I % водного раствора бромтимолового синего, перемешивают и автоклавируют при 0,5 атм., 20 мин. Цвет готовой среды - зеленый. Среду наносят на предметные стекла или разливают в чашки.

2. Желточно-кровяной агар.

К 100 мл 2 % стерильного питательного агара, расплавленного и охлажденного до 45°, добавляют 20 мл желточной взвеси /1 желток куриного яйца на 150 мл стерильного физ.раствора/ и 5 мл дефибринированной крови, перемешивают и разливают в чашки или наносят на предметные стекла.

3. Для выявления пропионобактерий к кровяному агару добавляют 0,1-0,5 % Твина-80 либо иного подобного препарата.

4. Модифицированная среда Блаурокка.

а/ для приготовления печеночного отвара 500 г свежей говяжьей печени кипятят в I л дистиллированной воды в течение 2 часов. После фильтрации количество отвара доводят до I литра дистиллированной водой.

б/ к I литру печеночного отвара добавляют при нагревании 10 г пептона, 5 г NaCl 750 мг агар-агара. Устанавливают pH -7,8-7,9, кипятят в течение 15 минут, фильтруют через бумажный фильтр. Затем добавляют 10 г лактозы, 100 мг цистеина солянокислого. Среду доводят до первоначального объема горячей дистиллированной водой и разливают во флаконы по 50-100 мл. Стерилизуют при 110° /0,5 атм/ 30 мин. pH среды после стерилизации равен 7,4. Перед употреблением среду разливают в пробирки по

10-12 мл и регенерируют кипячением в течение 40-45 мин, с последующим быстрым охлаждением.

Модифицированная "среда для контроля стерильности" для культивирования бифидобактерий.

1. Среда для контроля стерильности - 33 г.
2. Агар-агар - 1,6 г.
3. Вода дистиллированная - 1000 мл

Среда стерилизуется при 120° - 20 мин: После стерилизации на 1 л основы добавляется 0,1 г налидиковой кислоты, предварительно растворенной в небольшом количестве стерильной дистиллированной воды. Разливается в пробирки по 10-12 мл.

3. Среда МРС-2 для культивирования лактобацилл.

В 300 мл дистиллированной воды растворяют при нагревании 10,0 г пептона, 1,0 мл твина, 0,05 г $MO_4 \cdot 4H_2O$, 0,2 г $MO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 г цистеина, 2,0 г K_2HPO_4, 2,0 г цитрата аммония, 5,0 г ацетата натрия, 20 г глюкозы, 15,0 г агар-агара.

Приготовление гидролизата: обрат доводят до кипения, остужают до 45°С, устанавливают pH 8,0 и на 1 л обрата добавляют 1 г панкреатина и помещают на 4 часа в термостат при температуре 45°. В течение этого времени с интервалом в 1 час перемешивают и подщелачивают раствор до pH 7,8-8,0: Через 4 часа добавляют 2 % хлороформа закрывают резиновой пробкой и помещают в термостат на сутки. Прекращают гидролиз кипечением, отставивают, сливают, прибавляют 50 мл дрожжевого автолизата и 100 мл печеночного экстракта; доводят объем жидкости дистиллированной водой до 500 мл, затем гидролизованным молоком до 1000 мл и устанавливают pH 6,2-6,6. Среду фильтруют через фильтровальную бумагу, разливают в пробирки по 4-5 мл и стерилизуют в течение 20 минут при 0,5 атм.

Приложение № 3
к приказу Минздрава УССР
от 12.03.86г. №143

УТВЕРЖДАЮ

руководитель учреждения, в котором проведено внедрение
"___"_____198 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. Микробиологическая диагностика дисбактериозов
наименование предложения для внедрения

2. Киевский государственный институт усовершенствования врачей,
учреждение-разработчик, его почтовый адрес, ф.и.о. авторов

252112, г. Киев, ул. Дорогожицкая 9, Знаменский В.А., Дегтяр Н.Н.

Кузьминский С.Н. и др.

3. Источник информации: Микробиологическая диагностика дисбактериозов, 1986
название, год издания методических рекомендации

4. Внедрено по РПВ 198 г.
наименование лечебно-профилактического учреждения

5. Сроки внедрения с_____по_____

6. Общее количество наблюдений_____

7. Эффективность внедрения в соответствии с критериями, изложенными в источнике информации_____

Показатели	по данным разработчиков	внедрения	орга-

сокращение:
-сроков лечения
-временной нетрудоспособности

уменьшение:
-заболеваемости
-частоты расхождения диагнозов
-экономические показатели

8. Замечания, предложения

"___"_____198 г.

Ответственный за внедрени

Подп. к печ. 21.9.87 БФ 47620 Формат 60×84/16 Бумага
Печ. офс Усл. печ л. 1,62 Уч.-изд. л. 1,16 Тираж 1000
Зак. 7-217 . Бесплатно.

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Репина, 4.

10ш
161б
Б-58415