

✓ 1  
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР  
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА ИНСТИТУТ  
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ

КИЕВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ  
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ



В. А. ЗНАМЕНСКИЙ, Н. В. ДЕГТЯР

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ  
ДИАГНОСТИКА КИШЕЧНОГО  
И КОЖНОГО ДИСБАКТЕРИОЗОВ

Москва — 1989

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР  
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА ИНСТИТУТ УСОБЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ  
КЛЕТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ УСОБЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ

В.А. ЗНАМЕНСКИЙ, Н.В. ДЕГТЯР

522135  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КИШЕЧНОГО  
И КОЖНОГО ДИСБАКТЕРИОЗОВ

Учебное пособие \

Москва-1989

1. Дисбактериоз - диагностика

616.34-008.87-04

ЗНАМЕНСКИЙ В.А., ДЕГТЯР Н.В. Микробиологическая диагностика  
кишечного и кожного дисбактериозов: Учебное пособие. М.: ЦОЛИУВ,  
1989. 28 с.

Б-64543

Учебное пособие написано сотрудниками кафедры микробиологии  
Киевского ГИДУВа: зав. кафедрой д-ром мед. наук проф. В.А. Зна-  
менским и доц. канд. мед. наук Н.В. Дегтяр.

В работе представлены современные данные об аэробной и ана-  
эробной микрофлоре кишечника и кожи, положении условно-патоген-  
ных бактерий в нормальном микробиоценозе, модифицированные ме-  
тодики бактериологического исследования на дисбактериозы, диаг-  
ностические критерии, а также современные методы диагностики  
кишечного и кожного дисбактериозов, что позволяет повысить эф-  
фективность профилактики острых кишечных инфекций.

Утверждено РИСО ЦОЛИУВ

Рецензенты: Л.А. Тараненко - канд. биол. наук доц. кафедры микро-  
биологии ЦОЛИУВ, А.И. Якименко - канд. мед. наук доц.  
кафедра микробиологии Киевского ГИДУВа.

С Центральный ордена Ленина  
институт усовершенствования  
врачей, 1989 г.

Республиканская научная библиотека  
им. Д.Г. Ульянова  
МОН УРСР  
252017 м. Київ, вул. Толстого № 7  
№ 1

## 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 аэробных 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 иммунологи-

ческой реактивности организма. При этом важное значение приобретает дисбактериоз и в стадии компенсации, являющийся ранним показателем развития вторичного иммунодефицита. Исследования по диагностике дисбактериоза кишечника и кожи приобретает особое значение при проведении иммунодепрессивной терапии, аутоиммунных заболеваний соединительной ткани, осложнениях, возникающих при введении тканевых и корпускулярных антигенов. Диагностика кожного дисбактериоза приобретает важную роль в плане профилактики внутрибольничных инфекций.

При 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.

Значение своевременной диагностики 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.

Больных с выраженными явлениями кожного и кишечного дисбактериоза в хирургических стационарах следует причислить к группе повышенного риска возникновения гнойно-септических осложнений. Такие больные требуют определенной степени разобщения с основным

потоком больных, применения иммуностимулирующих средств и зубоотитков, проявления особой осторожности в отношении возникновения нагноений после операции.

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

Настоящее учебное пособие предлагает 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.

## Характеристика микрофлоры желудочно-кишечного тракта в норме и при дисбактериозе

На состав микрофлоры пищеварительного тракта оказывают влияние такие факторы, как характер питательных веществ, состояние пищеварительных органов и их слизистой и состав секретов, уровень секреторных  $\text{pH}$ , переваривание и абсорбция, перистальтика, водная реадсорбция, различные антимикробные факторы, взаимодействие отдельных видов (И.Н.Блохина, В.Т.Дорофейчук, 1979; В.Т.Петровская, С.П.Марко, 1976). У здоровых людей микрофлора желудочно-кишечного тракта характеризуется постоянством видов и количественным составом (В.Н.Красноголовец, 1979).

Микрофлора ротовой полости представлена многочисленными видами, так как здесь имеются благоприятные условия для развития микроорганизмов (влажность, постоянная температура, остатки пищи, разжижение слюны, слущивающийся эпителий). Концентрация аэробных и факультативных бактерий в 1 мл слюны составляет  $10^7$ , а анаэробных —  $10^8$  (В.Г.Петровская, О.П.Марко, 1976). Видовой состав облигатной микрофлоры представлен разнообразными кокками, среди которых наиболее типичными является *Str. salivarius*. Выделяются дифтеромды, вибрионы, спирохеты, простейшие. У здоровых людей в ротовой полости с постоянством выделяются лактобациллы, анаэробы представлены в основном *Veillonella alcalescens*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Fusobacterium nucleatum*.

В отношении энтерококков как представителей постоянной микрофлоры полости рта единого мнения не существует. Е.А.Земская (1972) обнаруживала их только у 6-8% здоровых людей. Обнаружение в полости рта микроорганизмов семейства кишечных бактерий, а также *Ps. aeruginosa* особенно в количествах  $10^4$ /г и выше следует рассматривать как один из признаков дисбактериоза (Н.Н.Клемпарская, Г.А.Гальцова, 1966; В.Г.Петровская, О.П.Ма-

рко, 1976; Г.В.Толкачева, 1983).

Пищевод не имеет собственной микрофлоры, а обнаруживаемые здесь микроорганизмы попадают из полости рта. В отношении скудной микрофлоры желудка, обусловленной кислой реакцией желудочного сока, существует единомышленное мнение. Н. Naesel, J. Bauding установили прямую зависимость между рН желудочного сока и степенью обсемененности его микроорганизмами. При рН 3 в 1 мл желудочного содержимого обнаруживается  $10^2 - 10^3$  микроорганизмов, тогда как при рН > 3 количество их возрастает до  $10^5 - 10^7$ . Наиболее часто обнаруживаются лактобациллы, бифидобактерии, дрожжи.

Микрофлора тонкого кишечника труднодоступна изучению, а используемые методы не позволяют с достоверностью установить, являются ли обнаруженные микроорганизмы аутомикрофлорой или занесены при заборе пробы. По мнению большинства исследователей, в содержимом верхних отделов тонкого кишечника микроорганизмы или отсутствуют, или обнаруживаются в небольшом количестве ( $10^2 - 10^3$  /г). Чаще других выявляются энтерококки, лактобактерии, поэтому определение в химусе тонкого кишечника представителей семейства кишечных бактерий, бактериоидов, клостридий некоторые авторы склонны расценивать как показатель кишечного дисбактериоза (В.Т.Гаймберг и др., 1965; О.П.Нарко, 1970; Shiner, 1963).

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

Облигатная 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 микрофлоры являются бифидобактерии, лактобациллы, бактериоиды, кишечные палочки и энтерококки.

Удельный вес анаэробов составляет 90% и более от всей микрофлоры. Основным представителем облигатной анаэробной микрофлоры являются бифидобактерии, описанные Х.Тисис в 1899 г., которые обнаруживаются в 100% испражнений здоровых людей в количестве  $10^8$  -  $10^9$  /г и более. Заселение кишечника новорожденных бифидофлорой регистрируется на 2 - 3-й день, а к 6-му дню она обнаруживается у 96% обследуемых. Количественное содержание бифидобактерий, как и другой микрофлоры, зависит от характера вскармливания детей. При естественном грудном вскармливании основной микрофлорой фекалий являются бифидобактерии, бактероиды, а представители аэробной микрофлоры не превышают 10-15%. При смешанном вскармливании сохраняется преимущество бифидобактерий и бактероидов, но увеличивается частота обнаружения условно-патогенных видов. При переводе детей на искусственное вскармливание наблюдается снижение бифидобактерий, из анаэробов превалируют бактероиды, увеличивается содержание стафилококков и дрожжеподобных грибов. Высеваются лактозонегативные штаммы энтеробактерий из рода цитробактер, энтеробактер, эшерихий. Следует отметить, что указанные изменения микрофлоры не всегда сопровождаются дисфункцией кишечника и могут быть компонентом нормального биоценоза.

По морфологии бифидобактерии представляют собой крупные грамположительные бесспорные палочки, имеющие раздвоение на концах. Но могут встречаться ровные, слегка изогнутые палочки с шарообразными вздутиями или утонченными концами. Располагаются в мазке изолированно или в виде буквы V. Типичные по морфологии бифидобактерии чаще обнаруживаются при выращивании их на модифицированной среде Блаурокка. По типу дыхания бифидобактерии - строгие анаэробы, и при посеве в высокий столбик среды Блаурокка можно выделить 4 наиболее часто встречающихся вида колоний: чечевичеобразные, 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 бактериемии у детей, тяжестью и длительностью течения пневмонии. Снижение уровня бифидобактерий ниже нормы приводит, как правило, к дисфункции кишечника даже при нормальном состоянии аэробной микрофлоры.

К представителям анаэробной микрофлоры относятся и бактероиды, грамтрицательные, 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 выявляются 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, бесспорные, могут иметь включения (вольгити), неподвижные, факультативные анаэробы или микроаэрофилы. Для их культивирования применяют среды с низкими значениями рН (5,5 - 5,6). Наиболее распространенной средой для их культивирования является МРС-4.

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 400 млн/г. Это затрудняет определение границ норм. На количественное содержание кишечной па-

почки в испражнениях оказывают 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% от общего числа кишечных палочек.

Гемолитические кишечные палочки не характерны для микрофлоры здорового человека.

Энтерококки обнаруживают в 80–100% случаев, и их количество не превышает у здоровых лиц  $10^4$ /г испражнений.

Факультативная микрофлора включает виды, которые довольно часто встречаются 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 относятся стафилококки, протей, клебсиеллы, цитробактер, энтеробактер, синегнойная и другие неферментирующие грамотрицательные палочки, грибы рода кандиды.

Высеваемость их у здоровых людей переменна. Стафилококки обнаруживаются у 18,7–23,3% 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 – 6,3 – 11,8%, бактерий рода клебсиелла – 3,3–14,3%, протейс – 1–10,7%. Массивность обсеменения фекалий условно-патогенными энтеробактериями у здоровых лиц, как правило, не превышает  $10^4$ /г. Грибы рода кандиды обнаруживаются в 14%, их количество в норме не превышает  $10^3$ /г испражнений.

Нарушение количественного и качественного равновесия микробио-

в макроорганизме, выходящее за пределы физиологической нормы, получило название дисбактериоза.

Развитию дисбактериоза способствуют ферментативная недостаточность, голодание, авитаминоз, стрессовые состояния, активная терапия гормонами и антибиотиками, а также снижение функции защитных механизмов организма. Острые и особенно хронические заболевания желудочно-кишечного тракта сопровождаются дисбактериозом кишечника.

Первоначально дисбактериоз рассматривали как патологическое состояние микрофлоры, которое характеризуется уменьшением общего количества микробов в кишечнике и прежде всего уменьшением количества антагонистически активных, типичных, активно ферментирующих лактозу кишечных палочек и относительным увеличением слабоферментирующих и гемолизирующих кишечных палочек.

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 именно между этими двумя группами бактерий подвержены наибольшему и, что особенно важно, ранним изменениям, проявляющимся, как правило, в снижении содержания бифидобактерий и последующем увеличении числа кишечных палочек.

Бифидобактерии обнаруживаются в разведениях  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  либо не всеядятся вовсе. Общее число кишечных палочек, учитываемое на среде Эндо, увеличивается и превышает 400-500 млн/г, что может быть использовано в качестве одного из критериев дисбактериоза кишечника. Нарастание количества кишечных палочек нередко сопровождается появлением её штаммов с измененными свойствами, а также других условно-патогенных энтеробактерий. Следует отметить, что примерно в 5% случаев дисбактериоз кишечника характеризуется резким длительно реги-

стрирующимся снижением содержания кишечных палочек (менее  $1$  млн/г).

Более поздние стадии развития дисбактериоза характеризуются снижением содержания лактобацилл, которые, так же как и бифидобактерии, при этом обнаруживаются в низких разведениях фекалий —  $10^{-5}$ – $10^{-7}$ , отражая более глубокие сдвиги в кишечной микрофлоре. Энтерококки имеют сходную с кишечными палочками тенденцию к количественному увеличению.

Снижение числа анаэробных представителей облигатной микрофлоры, обладающих высокой антагонистической активностью, создает условия для развития условно-патогенных микроорганизмов. Чаще всего развиваются стафилококки, условно-патогенные энтеробактерии, грибы рода кандиды. При этом количество стафилококков достигает  $10^5$ – $10^6$ /г, а грибы рода кандиды —  $10^4$ – $10^6$ /г. Выявление условно-патогенных энтеробактерий (рода клебсиелла, цитробактер, протеус, энтеробактер) в количестве  $10^5$ – $10^6$  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, выражением дисбактериоза могут быть и качественные изменения, выражающиеся в увеличении общего количества кишечных палочек с измененными биологическими свойствами (лактозонегативных, неподвижных, безиндолных форм) — до 25–30% и более, появление гемолизирующих эшерихий и стафилококков.

Состав микрофлоры при дисбактериозе более пестрый и содержит несколько видов, не характерных для нормобиоценоза кишечника на фоне снижения анаэробной и увеличения аэробной микрофлоры. При этом не выявляется нарастание антител к аутоштаммам условно-патогенных энтеробактерий.

Для оценки дисбактериоза предлагается следующая схема:

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

II степень: бифидобактерии определяются на нижней границе нормы ( $10^8$ ), и отмечается нарастание ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов. В некоторых случаях может наблюдаться дисфункция кишечника.

III степень: уменьшение количества (менее  $10^7$ ) бифидобактерий в сочетании с выраженными изменениями в аэробной микрофлоре. Декомпенсированный дисбактериоз.

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

Обследуемых, у которых обнаруживаются только качественные изменения аэробной микрофлоры (появление гемолитических форм, нарастание лактозоотрицательных штаммов кишечной палочки), можно отнести к контингенту повышенного риска.

При выделении условно-патогенных микроорганизмов в значительных концентрациях ( $10^6$ /г и более) возникает необходимость дифференциации 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: I) 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 определенные серовары условно-патогенных бактерий (протеус, цитробактер, клебсиелла); 3) диагноз подтверждается нарастанием титра витителей к аутоштаму (в 2-4 раза в первые 2 недели заболевания).

Повторное исследование рекомендуется проводить с интервалом 10-15 дней в течение нескольких месяцев.

#### Аутомикрофлора кожи

К микроорганизмам, постоянно обитающим на здоровой коже человека, относят главным образом коагулазоотрицательные стафилококки (*St. epidermidis*, *St. haemolyticus*, *St. heminis*, *St. capitis*), микрококки (*M. luteus*, *M. varians*, *M. kristinae*, *M. sedentarius*), и диктериды (преимущественно *Propionibacterium acnes*).

При повышенной секреции кожного жира (липида) и других обменных нарушениях интенсивное образование ненасыщенных жирных кислот обильно размножившимися липофильными пропионибактериями и стафилококками может обусловить воспаление сальных желез, проявляющееся как вульгарные угри.

Иногда на коже могут быть обнаружены грамотрицательные палочки, в том числе клебсиеллы и синегнойные палочки, 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 обуславливает повышенную восприимчивость таких лиц к гнойно-воспалительным заболеваниям.

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

Стафилококки и микрококки – грамположительные факультативно анаэробные и аэробные кокки, обладают каталазой. У здоровых людей стафилококки представлены главным образом *S. epidermidis* и другими коагулазоотрицательными видами из группы эпидермидис. Микрококки не вызывают гемолиз. Коагулазоотрицательные стафилококки от здоровых людей в подавляющем большинстве случаев также не вызывают гемолиз и не окисляют маннит. Они хорошо растут на простых питательных средах, образуя колонии белого, желтого, кремового цветов.

Пропионибактерии – грамположительные неспорообразующие малоподвижные палочки. Обычно плеоморфные – дифтероидные или булавообразные 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°C, 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 в присутствии небольших количеств кислорода (в эксикаторе со свечой). Твин-80 стимулирует рост большинства штаммов. Колонии обычно мелкие, могут быть белыми, серыми, реже желтыми 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 обсемененность кожи может значительно возрастать.

Количество и состав бактерий на различных участках кожи определяется наличием питательных веществ (главным образом кожного липида), влажностью, кислотностью и отчасти температурой. Обильная секреция, повышенная влажность, нейтральный pH, относительно повышенная темпер-

тура обуславливает высокую микробную обсемененность. На коже живота она составляет около  $10^4$  клеток/см<sup>2</sup> с преобладанием дифтериеидов (70%), а на коже предплечья находится в среднем  $10^3$  клеток/см<sup>2</sup>, причем гораздо выше удельный вес кокков (85%). На среду с отпечатка кожи предплечья здоровых людей выделяются до 10 колоний на 1 см<sup>2</sup>, а с кожи живота — примерно в 1,5 раза больше.

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

Липофильные дифтериеиды и коагулазоотрицательные стафилококки за счет ненасыщенных жирных кислот, образующихся при расщеплении ими кожного жира, а также за счет своих антибиотиков и бактериоцинов обезвреживают постороннюю, в том числе условно-патогенную, микрофлору, постоянно попадающую на кожу. Так, нанесенная на здоровую кожу кишечная палочка обычно погибает в течение нескольких минут. Выявлена обратная связь между содержанием дифтериеидов на коже и ее микробной обсемененностью. При высокой микробной обсемененности кожных покровов удельный вес дифтериеидов составляет 10–15% на коже предплечья, а при более низкой обсемененности он достигает 30–40%.

Показания к проведению бактериологического  
исследования на дисбактериозы

Исследования на дисбактериоз кишечника показаны:

1. При длительно протекающих кишечных расстройствах (дисфункциях), при которых не удается выделить патогенные микроорганизмы.
2. При затянувшемся периоде рекомвалесценции после дизентерии и других острых кишечных заболеваний.
3. При дисфункции кишечника у лиц, длительно подвергавшихся воздействию некоторых производственных вредностей (антибиотики, радиация, химические вещества и др.), а также при интенсивной антибиотико- и (или) иммунодепрессивной терапии.
4. При наличии так называемого "безочагового" сепсиса или бактериемии, гнойно-воспалительных очагов, трудно поддающихся лечению (пиелиты, холециститы, язвенные колиты и энтероколиты, вяло протекающие 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.

Диагностика дисбактериоза кожи

Для диагностической работы применяют контактные методы (методы отпечатков) по Н.Н.Клемпарской и Г.А.Шальной (1966), используя агаровые среды, нанесенные на поверхность предметных стекол, и метод

*Selwyn a. Ellis*

(1972) с использованием переносимости

Республиканська наукова медична  
бібліотека ім. Д. І. Ульянова  
М О З У Р С.  
252017 м. Київ, вул. Тараса Шевченка 7  
№ 1

522135

идентифицированы 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 *Williams & Keegan* (1965) с использованием детергента Тритон X-100. Благодаря достигаемому с его помощью полному разобщению микробных клеток, этот метод позволяет определить абсолютное число микроорганизмов на данном участке кожи. Первым этапом метода является приготовление стандартных цилиндров путем разрезания пробирок диаметром 1,5 см на две части. Цилиндры стерилизуют в автоклаве и хранят в упакованном виде до использования. При взятии смыва с исследуемой кожи прижимают цилиндр к избранному участку торцевой частью и заливают в него 1 мл 0,1% раствора детергента Тритон X-100 в 0,075M фосфатном буфере рН 7,9-8,0. В течение 1 мин путем пипетирования этик раствором производят смыв с ограниченного цилиндром участка кожи, а затем отбирают эту жидкость в пробирку. Маневры 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 0,1 мл из этих разведений высевает на чашки Петри с 1,2% МПА. После инкубации при 37°C в течение 48 ч учитывают результаты и делают подсчет на 1 см<sup>2</sup>.

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

Метод *Selwyn & Ellis* (1972) в модификации авторов.

От рулона лейкопластыря отрезают кусок размером 3x5 см и прижимают липкой стороной к коже внутренней поверхности предплечья.

При этом руками не касается центральной части отрезка лейкопластыря, которым производят отпечаток. Лейкопластырь снимает с кожи и его центральную часть с площади, составляющей не менее 2/3 площади отрезка, делают отпечаток на поверхности среды Эндо, кровяного агара (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°C в течение 24 ч учитываются результаты.

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

Метод Н.Н.Клемпарской и Г.А.Пальиновой (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°C на 24 ч. 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.

#### Оценка результатов исследования

О наличии и степени дисбактериоза кожи судят по комплексу признаков. Так, о выраженном дисбактериозе свидетельствуют наличие граммотрицательных бактерий на среде Эндо (энтеробактерии и нефермен-

тирующие палочки — псевдомонады и ацинетобактеры), наличие густого роста на кровяном агаре (более 20 колоний на  $1 \text{ см}^2$ ), значительное количество гемолитических колоний (более 10% всех колоний на кровяном агаре), колоний, обладающих одновременно гемолитической и лецитовителазной активностью (более 45% всех колоний на желточно-кровоном агаре), менингитоположительных колоний (более 10% всех колоний на среде Коростелова). 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 ее 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 высокая степень корреляции между показателями кишечного и кожного дисбактериоза.

#### Диагностика дисбактериоза кишечника

Кал для исследования доставляется без консерванта не позже 2 ч с момента отбора. Материал, доставляемый в более поздние сроки, должен сохраняться не более 4 ч при  $+4 - +6^{\circ}\text{C}$ . Кал отбирается в предварительно взвешенные флакончики в количестве 0,5–1,0 г, после повторного взвешивания устанавливается вес пробы и добавляется такое количество 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.

Для выявления патогенных энтеробактерий нативный материал жид-

кой консистенции или разведение плотных испражнений  $10^{-1}$  петлей засевают на среду Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар и производят посев 1-2 мл на среды обогащения (магниевую, селенитовую, разлитые в пробирки по 5-7 мл).

Из разведения  $10^{-3}$  по 0,1 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 кандиды, 0,1 мл засевают на ЖСА для выявления стафилококков.

Из разведения  $10^{-5}$  по 0,1 мл засевают на среду Эндо и 0,05 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 1 мл засевают в регенерированную среду Блаурокка или среду "для контроля стерильности" или гидrolизатно-молочную среду для выявления бифидобактерий.

Для количественного определения лактобактерий (при длительно протекающих дисбактериозах) по 1 мл из этих же разведений производят посев на среду МРС-4.

Посевы инкубируют при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  24-48 ч. Посевы на среде Сабуро 48 ч инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  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 1 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 бицидобактерий определяется по характеру роста на среде Блаурокка или других аналогичных средах и микроскопии мазков, окрашенных по Грану. Количество бицидобактерии и лактобацилл в 1 г фекалий определяют по предельному разведению. При наличии роста стафилококков на среде АСА, кандиды - на среде Сабуро, идентификация их осуществляется согласно принятым методам. Со среды Эндо отсеивают лактозоотрицательные и доминирующие лактозоположительные колонии для дифференциации кишечных палочек, цитробактера, энтеробактера. С 5% кровяного агара снимают гемолитические колонии, в такте 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 секторный посев на среду Эндо, Плоскирева, 5% кровяной агар, АСА, Сабуро.

После инкубации производится учет выросшей микрофлоры и определение ее количества в 1 мл материала по расчетной таблице. Для определения количества микробов в 1 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 посева на средах Эндо, Плоскирева могут быть использованы и для выделения патогенных энтеробактерий.

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

## Результат бактериологического исследования фекалий.

От \_\_\_\_\_ 198 г. анализ № \_\_\_\_\_

Фамилия, имя, отчество \_\_\_\_\_

Анализ первичный, повторный (подчеркнуть)

Учреждение \_\_\_\_\_

Микрофлора	Норма
1. Патогенные микробы семейства кишечных	0
2. Бифидобактерии	$10^{-8}$ и выше
3. Лактобациллы	$10^{-6}$ и выше
4. Общее количество кишечной палочки	$10^6 - 4 \cdot 10^8$
5. Кишечная палочка со слабо выраженными ферментативными свойствами	до $10^{-15}\%$
6. Гемолизирующая кишечная палочка	0
7. УЛЭ (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

## Приложение

## 1. Среда Коростелева.

К 100 мл расплавленного и охлажденного до 45° стерильного питательного агара добавляют 1 г мазнита и 0,3 мл 1% водного раствора бромтиолового 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 физиологического раствора) и 5 мл дефибрированной крови, перемешивают и разливают в чашки или наносят на предметные стекла.

3. Для выявления пропионибактерий 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 1 л дистиллированной воды в течение 2 ч. После фильтрации количество отвара доводят до 1 л дистиллированной водой;

б) к 1 л печеночного отвара добавляют при нагревании 10 г пептона, 5 г  $\text{NaCl}$ , 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 112° (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  $120^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин. После стерилизации на 1 л основы добавляется 0,1 г налидиксовой кислоты, предварительно растворенной в небольшом количестве стерильной дистиллированной воды. Разливается в пробирки по 10-12 мл.

4. Среда МРС-4 для культивирования лактобацилл.

$\text{MnO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 0,05 г,  $\text{MgO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 2 г, цитрата аммония  $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  - 2 г, ацетата натрия - 5 г, пептона - 10 г, цистеина - 0,2 г, сорбиновой кислоты - 40 мг, агар-агара - 20 г, глюкозы - 20 г, твина - 80 или линагела - 1 мл, печеночного экстракта 100 мл, дрожжевого аутолизата - 50 мл (или 5 г сухого), гидролизата молока - 500 мл, дистиллированной воды - до 1000 мл. Стерилизация -  $112^{\circ}\text{C}$  20 мин. Сорбиновую кислоту в количестве 40 мг растворяют в спирте, добавляют к среде после стерилизации. pH - 5,0-5,1 устанавливает 10% раствором лимонной кислоты перед разливом в чашки.

## Библиографический список.

1. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника: Методические рекомендации. Минздрав РСФСР, 1977.
2. Блохина И.Н., Дорофеев В.Г. Дисбактериозы. Л.: Медицина, 1979.
3. Костюковская О.Н., Гладкая Е.А. и др. Информационное письмо: Модифицированная методика диагностики кишечного дисбактериоза. Львов, 1984.
4. Красноголовец В.Н. Дисбактериоз кишечника и его клиническое значение. М., 1979.
5. Клемпарская Н.Н., Шальнова Г.А. Аутофлора как индикатор радиационного поражения организма. М.: Медицина, 1966. 207 с.
6. Костюковская О.Н. Микрофлора фекалий у здоровых молодых людей. ВМЗ, 1983. №2. С. 36.
7. Куваева И.Б. Обмен веществ организма и кишечная микрофлора. М.: Медицина, 1976.
8. Дюбл У.К. Микробиология кожи человека. Перевод с англ. М.: Медицина, 1986. 493 с.
9. Смолянская А.З., Гончарова Г.И. Современные аспекты дисбактериоза кишечника и его бак. лаборатория // Лаб. дело, 1984. №3. С. 167-170.
10. Панчишина М.В., Слейник С.Ф. Дисбактериоз кишечника. Киев: Здоров'я, 1977. 115 с.
11. Петровская В.Г., Марко О.П. Микрофлора человека в норме и патологии. М.: Медицина, 1976, 230 с.
12. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями, диагностика и лечение дисбактериоза: Методические рекомендации. Минздрав СССР. М., 1986.

Знаменский Владимир Алексеевич,  
Дегтяр Неонила Васильевна

Микробиологическая диагностика кишечного и кожного  
дисбактериозов

Редактор Л.А.Григорьева

Подписано в печать 22.06.89 Л-19413 Изд.№ 56  
I,18 уч.-изд.л., I,75 п.л. Тираж 1000 экз. Заказ 69107  
Там.лл. МЗ СССР л. 46.III Печать офсетная Цена 5 коп.  
Москва. РИО ЦОЛИУВ, Баррикадная, 2

Тип. Мин-ва культуры СССР

