

# *Лекция 3*

**Тема:** МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ  
исследования при заболеваниях  
кишечника

Шевченко Н.И.

# Вопросы, разбираемые на лекции.

- 1. Микробиологические исследования при заболеваниях тонкого и толстого кишечника.
- 2. Этиологическая структура и принципы микробиологической диагностики при синдроме диареи.

# Этиология

- Воспалительные процессы в органах пищеварения могут быть вызваны представителями нормальной кишечной микрофлоры и внешними патогенами

# КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА

Группа микроорганизмов	Количество микроорганизмов в 1 г фекалий	
	у взрослых	у детей
Бифидобактерии	$10^8-10^{10}$	$10^9-10^{10}$
Бактероиды	$10^8-10^{10}$	$< 10^8$
Молочнокислые палочки	$10^6-10^7$	$10^6-10^8$
Молочнокислый стрептококк	$10^6-10^7$	$10^7-10^8$
Энтерококки	$10^5-10^6$	$10^6-10^7$
Эшерихии:		
с нормальной ферментативной активностью	$10^7-10^8$	$10^7-10^8$
со сниженной ферментативной активностью	$10^6-10^7$	$10^6-10^7$
лактозонегативные	$10^6-10^7$	$10^6-10^7$
Микробы рода <i>Proteus</i>	$< 10^4$	$< 10^3$
Другие условно патогенные энтеробактерии	$< 10^4$	$< 10^4$
Стафилококки (сапрофитический, эпидермальный)	$< 10^4$	$10^4-10^6$
Дрожжеподобные грибы	$< 10^4$	$< 10^4$
Спороносные анаэробные палочки (клостридии)	$< 10^5$	-

# ПОСЕВ ФЕКАЛИЙ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ НА ДИСБАКТЕРИОЗ

Среды	Разведения	Микроорганизмы
Мюллера, селенитовая, магниевая	Без разведения	Патогенные энтеробактерии
Среда Блаурока	$10^{-3}$ - $10^{-10}$	Бифидобактерии
Агар Хенеля (анаэробные условия)	$10^{-3}$ - $10^{-7}$	Бактероиды
Лактобакагар (анаэробные условия)	$10^{-3}$ - $10^{-7}$	Лактобациллы и стрептококки
Среда Калины	$10^{-3}$ - $10^{-5}$	Энтерококки
Желточно-солевой агар	$10^{-3}$ - $10^{-5}$	Стафилококки
Среда Сабуро	$10^{-3}$ - $10^{-5}$	Грибы рода Кандида
Среда Эндо	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	Энтеробактерии
Малахитовый агар	$10^{-1}$ , $10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	Синегнойная палочка
Кровяной агар	$10^{-5}$ , $10^{-7}$	Гемолизирующие культуры
Среда Вильсон-Блер	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	Клостридии

## На дисбактериоз толстого кишечника указывают:

1. снижение количества бифидобактерий до уровня менее  $10^8$  КОЕ/мл
2. увеличение доли атипичных эшерихий до более чем 10%
3. появление гемолитической микрофлоры
4. увеличение числа условно-патогенных грамотрицательных палочек или *S.aureus* (более  $10^4$  КОЕ/мл)
5. увеличение числа грибов рода Кандида (более  $10^3$  КОЕ/мл)
6. увеличение до более  $2 \cdot 10^8$  КОЕ/мл или снижение до  $10^6$  КОЕ/мл количества *E.coli*

# Классификации дисбактериоза по степени тяжести

<b>1 степень</b>	Латентная, компенсированная форма. Характеризуется незначительными изменениями в аэробной части микробиоценоза (увеличение или уменьшение количества кишечных палочек). Бифидо- и лактофлора неизменны. Кишечные дисфункции, как правило, не регистрируются.
<b>2 степень</b>	Субкомпенсированная форма. На фоне незначительного снижения количественного содержания бифидобактерий выявляются количественные и качественные изменения кишечной палочки или других условно-патогенных микроорганизмов.
<b>3 степень</b>	Значительное снижение уровня бифидофлоры ( $10^5$ - $10^7$ кл./г) в сочетании со снижением лактофлоры и низким содержанием кишечных палочек. Как правило, сопровождаются кишечными дисфункциями.
<b>4 степень</b>	Отсутствие бифидофлоры, значительное уменьшение лактофлоры и изменение количества кишечной палочки (снижение или увеличение), возрастание численности условно-патогенных бактерий. Выраженные клинические проявления.

# Этиология

- Среди заболеваний бактериальной этиологии выделяют :
- - инфекции желудка ( гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки)
- - инфекции кишечника ( энтерит и энтероколит )

# Инфекции желудочно-кишечного тракта

- инфекции желудка - заболевания, вызываемые **HELICOBACTER Pylori**

# Эпидемиология

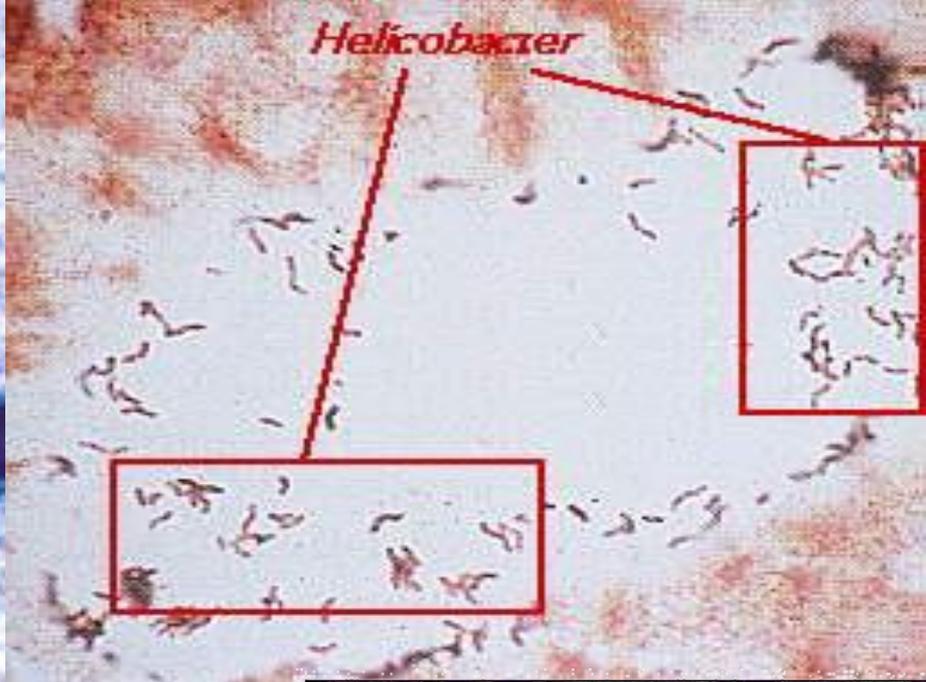
- Инфекция относится к антропонозам. Встречается повсеместно, инфицирование происходит в детском возрасте. В развивающихся странах ее распространенность среди лиц < 20 лет достигает 90%. В развитых странах этот показатель не превышает 30-50%.

# HELICOBACTER Pylori

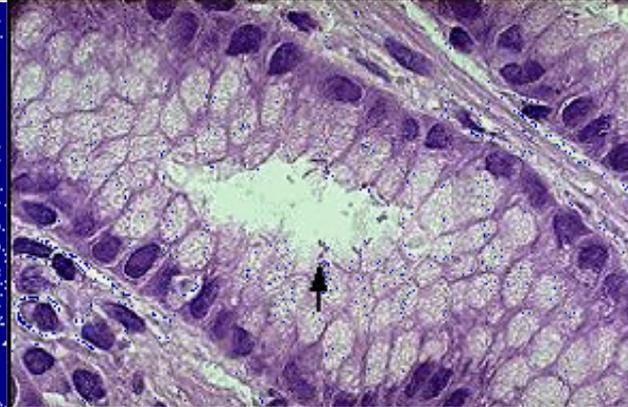
- Колонизирует слизистую оболочку желудка у значительной части взрослого населения. По окончательно неустановленным причинам (повышенная вирулентность отдельных штаммов, сниженная резистентность хозяина, внешние условия) у части инфицированных людей развиваются :

# HELICOBACTER Pylori

- - хронический гастрит
- - язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки
- - аденокарцинома желудка
- - лимфома желудка



- Спирально изогнутые палочки
- Размер: **0,2-0,3x0,5-5,0**мкм
- Спор и капсул не образуют
- Подвижны (**2 – 6** полярных жгутиков)
- Грамотрицательны



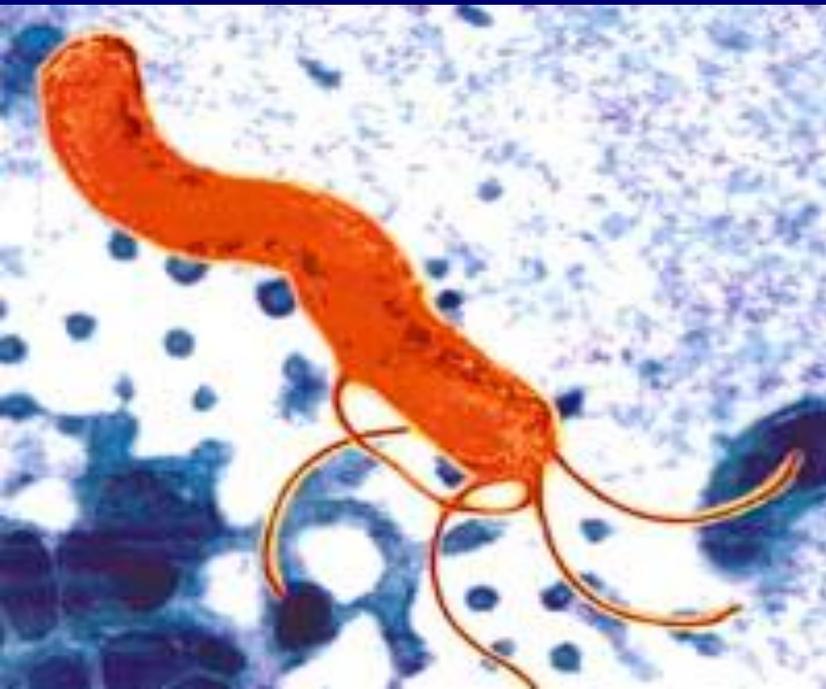
*H. pylori* в эндотелии желудка

# Диагностика инфицирования человека *H.pylori*

- Существуют три метода
- 1. биопсия ( взятие ткани и его микробиологическое исследование )
- Требуется эндоскопическое зондирование и может приводить к повторному инфицированию вылеченного или здорового пациента.



Колонии *H.pylori*  
через **3- 5** и более суток



## Культивирование

Хемоорганотрофы

Термофилы (**37 – 42°C**)

Микроаэрофилы и капнофилы

Питательные среды:

Мясные, печеночные

10% кровяной агар (слабый гемолиз)

Шоколадный агар (колонии 0,5-1,0 мм)

# Диагностика инфицирования человека *H.pylori*

- 2. определение специфических антител, вырабатываемых организмом. Этот метод характеризуется большой вероятностью ошибки.

# Диагностика инфицирования человека *H.pylori*

- 3. анализ выдыхаемого человеком воздуха ( уреазный дыхательный тест). Метод неинвазивный, однозначен, прост, безвреден, а также может показывать количественно уровень инфицирования.

# Уреазный дыхательный тест

- В основе метода лежит факт симбиоза бактерий **HELICOBACTER Pylori** и фермента уреазы. Если нет бактерий, то нет уреазы. Уреаза разлагает мочевину до двуокиси углерода и аммиака. Аммиак связывается с кислотой желудка, а углекислый газ попадает в кровь.

# Уреазный дыхательный тест

- С кровотоком  $\text{CO}_2$  попадает в легкие и при выдохе в атмосферу. Остается только отличить  $\text{CO}_2$ , образовавшийся в желудке или пищеводе, от остального углекислого газа в выдыхаемом воздухе.

# Уреазный дыхательный тест

- Пациенту дают выпить стакан воды или сока, в которой растворено небольшое количество мочевины ( 1 мг на 1 кг веса пациента), обогащенной природным стабильным изотопом углерода  $^{13}\text{C}$ .

# Уреазный дыхательный тест

- В качестве контроля перед приемом мочевины пациент выдыхает в пробирку объемом 10 мл. Т.к. в природе содержится около 1% изотопа углерода  $^{13}\text{C}$ , эта проба используется для сравнения.

# Уреазный дыхательный тест

- Вторую такую же пробирку набирают выдыхаемым воздухом через 30 мин после приема мочевины. Прибор, с помощью которого проводится анализ, представляют собой комбинацию простейшего хроматографа с масс-спектрометром для измерения изотопных соотношений углерода в углекислом газе.

# Уреазный дыхательный тест

- Алгоритм применения быстрого уреазного теста используется :
- - для диагностики **HELICOBACTER Pylori** при серийном эндоскопическом контроле
- - для скрининга на наличие инфекции у больных старше 45 лет с синдромом диспепсии

# Уреазный дыхательный тест

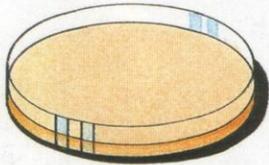
- - для динамического наблюдения и оценки лечения гастродуоденальной язвы хеликобактерной этиологии ( вместе с морфологическим тестом ).



Portagerm pylori,  
24-48 h at room temp.

## TRANSPORT

## CULTURE ON SELECTIVE MEDIUM



Pylori agar  
3 to 7 days at 35-37°C  
**microaerophilic atmosphere**  
(jar or Generbag microaer)

## DIRECT EXAMINATION



Gram stain

## RAPID UREASE TEST



Biopsy fragment  
in 0.2 ml urea-indole.  
15 min - 8 h at 37°C

## IDENTIFICATION



Urease ⊕ ⊕ ⊕  
purplish-pink  
in less than 5 min



Oxidase ⊕



Catalase ⊕

### HELIcobACTER PYLORI

Gram ⊖ Bacilli curved	Selective medium 37°C microaerophilic 3-7 days	Urease ⊕ ⊕ ⊕	Oxidase ⊕	Catalase ⊕
-----------------------------	--	-----------------	-----------	------------

# Первичная диагностика

- 1. Обнаружение специфических антител классов А и G в крови больного методом ИФА, экспресс-тесты на основе реакции преципитации или иммуноцитохимии с использованием капиллярной крови больного.

# Первичная диагностика

- 2. Дыхательные тесты с регистрацией продуктов жизнедеятельности **HELICOBACTER Pylori** ( CO<sub>2</sub> и аммиак )
- 3. ПЦР в анализах кала, слюны, зубном налете

# Инфекции кишечника

## Острая диарея

- Физиологические механизмы развития диареи:
- - увеличение секреции электролитов эпителием кишечника, вызывающее массивную потерю жидкости

# Инфекции кишечника

## Острая диарея

- - понижение абсорбции из просвета кишечника электролитов и питательных веществ, развивающееся вследствие повреждения щеточной каемки эпителия толстого и тонкого кишечника

# «Водянистая диарея»

- Обильный жидкий стул умеренной частоты
- Признаки воспаления в фекалиях (лейкоциты) отсутствуют

# «Водянистая диарея»

- Причиной диареи, вызываемой *V. cholerae*, энтеротоксигенными и энтеропатогенными *Escherichia coli*, а также некоторыми сальмонеллами, является продукция микроорганизмами энтеротоксинов, вызывающих выход электролитов и жидкости в просвет кишечника.

# «Водянистая диарея»

- Эти микроорганизмы способны к адгезии к кишечному эпителию, пролиферации и токсинообразованию в кишечнике, но для них не характерны инвазия и цитотоксические эффекты в отношении кишечного эпителия.

# «Водянистая диарея»

- *St. aureus*, *B.cereus*, *C. Perfringens* вызывают диарею в результате продукции различных по свойствам токсинов. Токсинообразование происходит в ходе пролиферации микроорганизмов в контаминированных пищевых продуктах, в то время как пролиферация микроорганизмов в кишечнике не имеет существенного значения.

# *B. cereus*

- Вызывает токсикоинфекции у человека, включая рвотный и диарейный синдром, продуцирует энтеротоксины. Диарейный синдром, подобный токсикоинфекции, вызываемой *C. perfringens*, обусловлен высокомолекулярным пептидным токсином.

# *B.cereus*

- Рвотный синдром, подобный *St. aureus*, вызывается низкомолекулярным термостабильным токсином. Отмечены случаи развития менингоэнцефалита у недоношенных младенцев.

# **ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПИЩЕВЫХ ОТРАВЛЕНИЙ**

- 1. Выделение чистой культуры возбудителя и ее идентификация**
- 2. Обнаружение и определение микробных экзотоксинов**
- 3. Определение антител в сыворотке крови больных**

# « Кровянистая» диарея ( дизентериеподобный синдром)

- Частый скудный стул, болезненная дефекация, тенезмы. В фекалиях примеси крови, слизи, лейкоцитов

# « Кровянистая» диарея ( дизентериеподобный синдром)

- Поражается слизистая оболочка толстого и дистального отдела тонкого кишечника  
Энтероинвазивные *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *V. parahaemolyticus* продуцируют цитотоксический токсин Шига и сходные токсины, а также способны к инвазии в клетки эпителия.

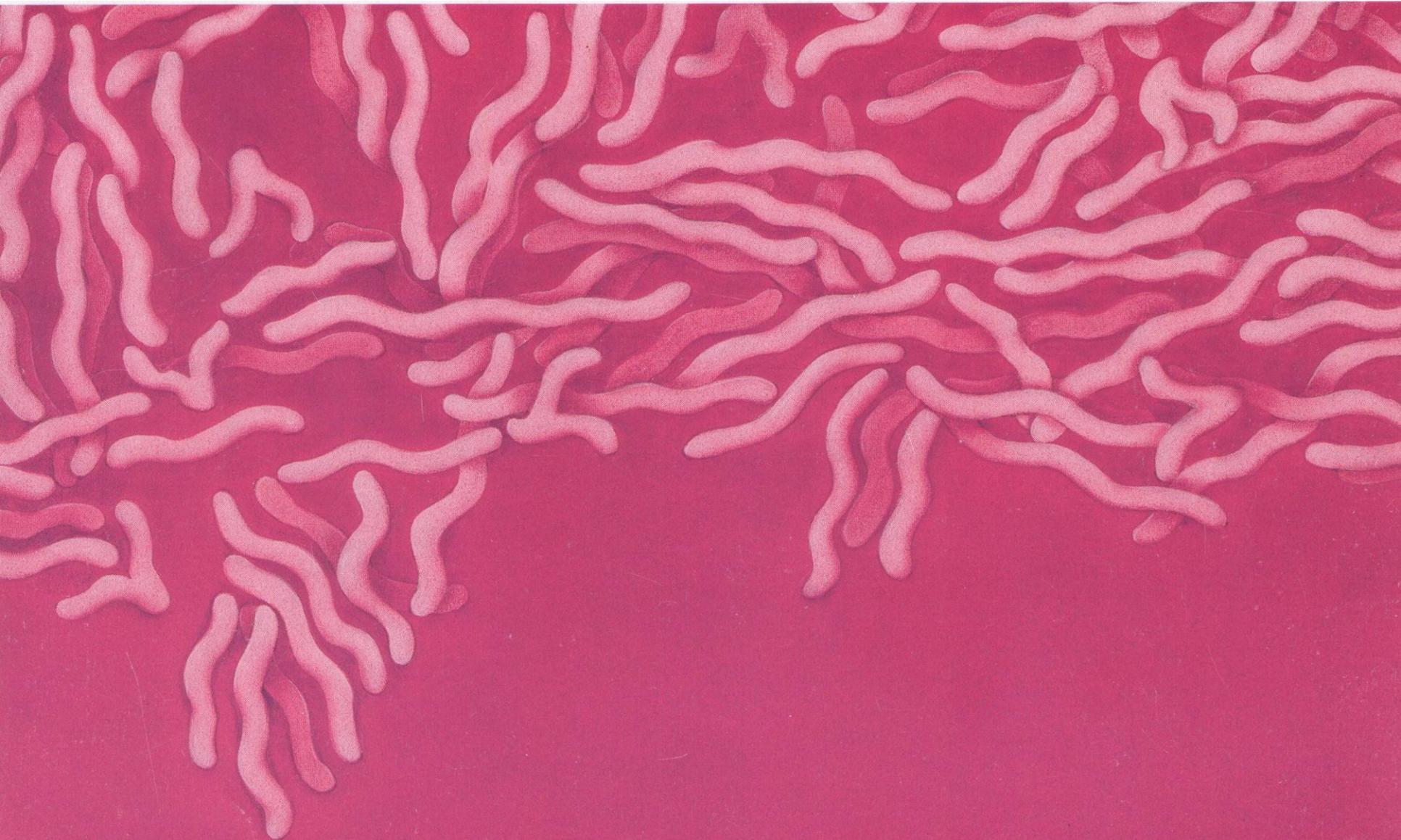
# « Крованистая» диарея ( дизентериеподобный синдром)

- Энтерогеморрагические Escherichia продуцируют токсин, сходный с токсином Шига, вызывают кроме геморрагического колита, гемолитико- уремический синдром

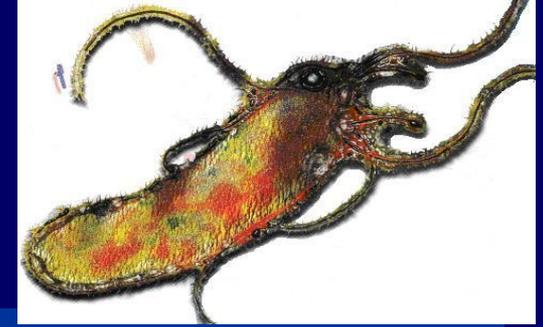
# « Кровянистая» диарея ( дизентериеподобный синдром)

- Поражения кишечника, вызываемые *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, связаны в основном с инвазивными свойствами этих микроорганизмов.

# КАМПИЛОБАКТЕРИИ



# ТАКСОНОМИЯ



Царство: **PROCARYOTA**

Отдел: **GRACILICUTES**

Семейство: **SPIRILLACEAE**

Роды:

**CAMPILOBACTER**

**HELICOBACTER**

Виды:

**C.jejuni**

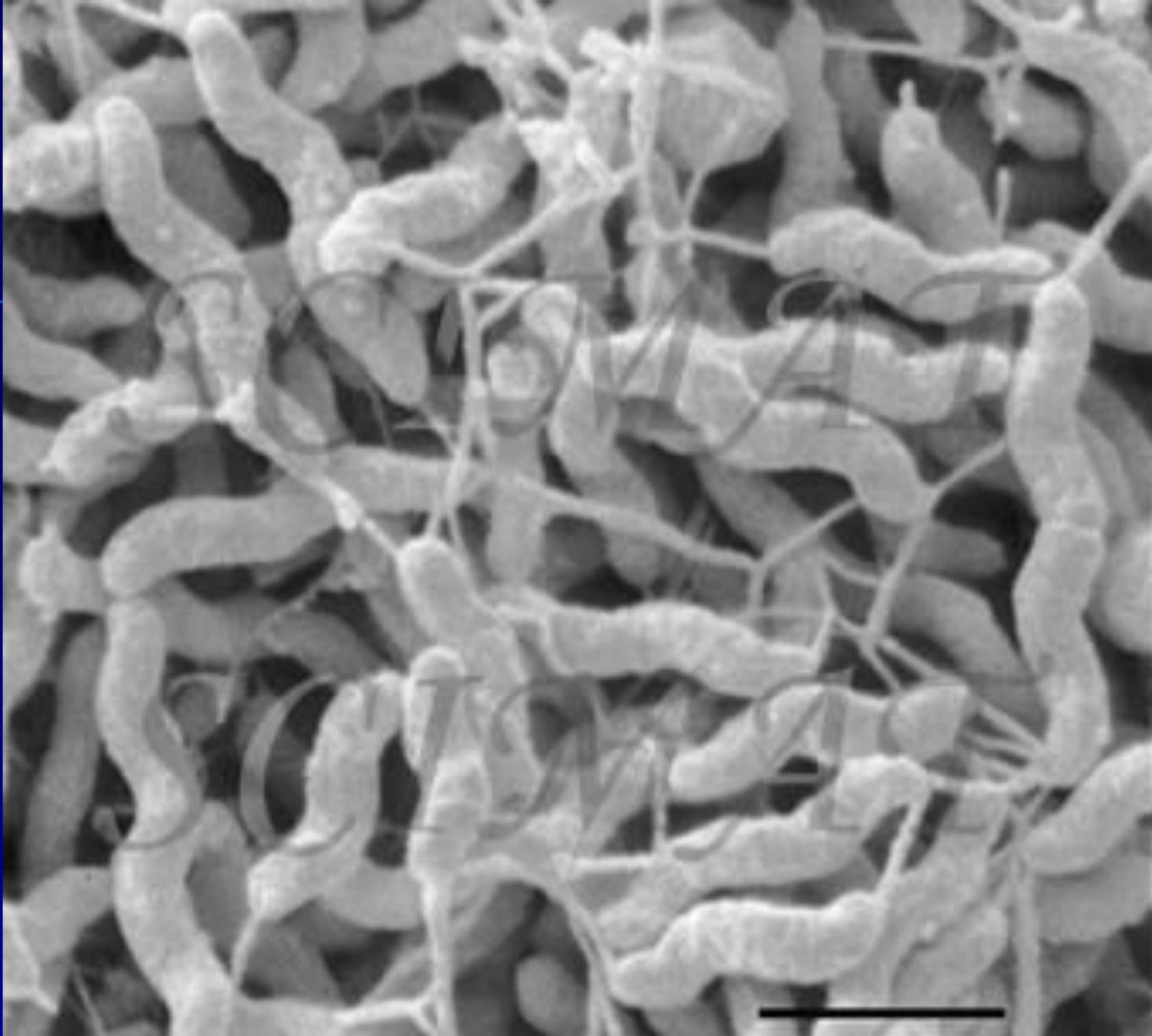
**H.pylori**

**C.lari**

**H.mustelae**

**C.coli**

**C. fetus**



***Campylobacter jejuni***, сканирующая электронная микрофотограмма

# CAMPILOBACTER jejuni и CAMPILOBACTER coli

- Ведущая роль в этиологии кампилобактериозов. Кампилобактериозы характеризуются поражением гастроинтестинального тракта человека с развитием диарейного синдрома, который является либо ведущим в клинике заболевания, либо начальным симптомокомплексом с последующим вовлечением в инфекционный процесс других органов и систем (сердечно-сосудистой, нервной, выделительной, репродуктивной).

# Преаналитический этап

- Обследованию подлежат :
- - больные и здоровые люди
- - животные и птицы
- - вода из различных источников
- - пищевые продукты и корма, почва, отходы
- - трупный материал

# Преаналитический этап

- Объекты исследования :
- Испражнения ( нативные фекалии, ректальный мазок), рвотные массы, моча, желчь, ликвор, сперма, влагалищное отделяемое, слюна, зубной налет, синовиальная жидкость, биоптаты, секционный материал, гной

# Преаналитический этап

- Среди клинических симптомов «сигнальным» является симптом гемоколита – наличие крови в кале, что является абсолютным показанием для бактериологического исследования.

# Преаналитический этап

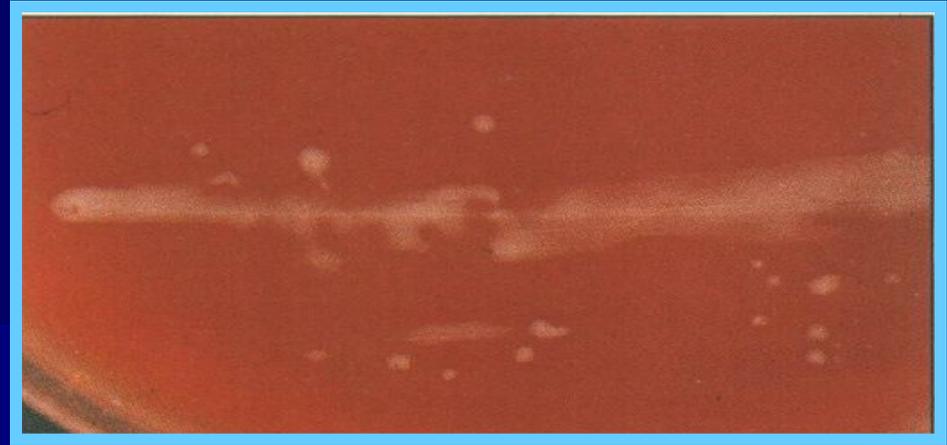
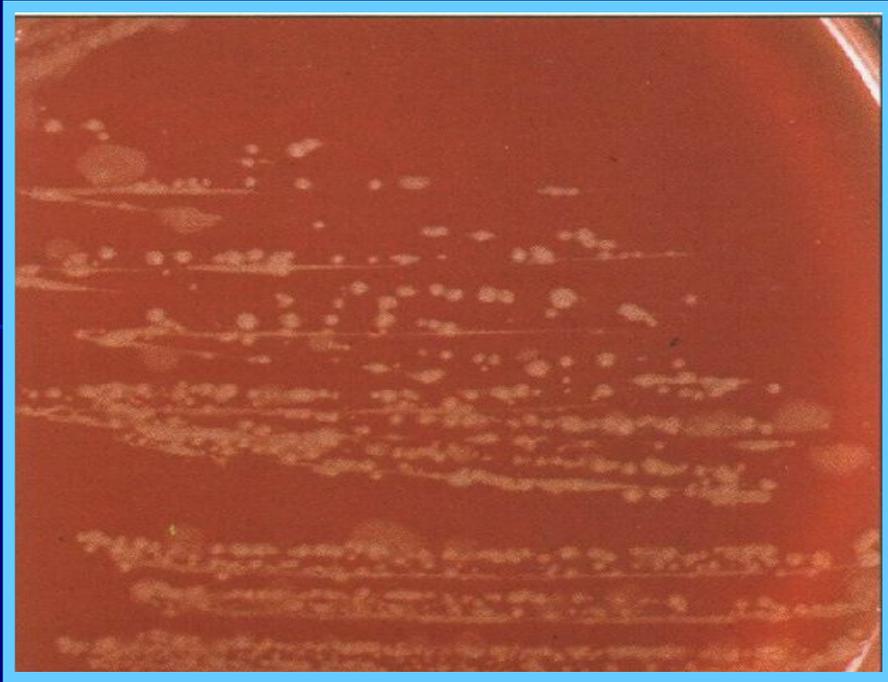
- Обследование проводится в течение всего периода болезни по показаниям – появление крови в стуле, усиление или рецидив диареи.

# Преаналитический этап

- Транспортировка материала :
- - в течение 2 часов от момента забора материала – в стерильном физ. р-ре
- - свыше 2 часов – в транспортной среде.
- Ректальные мазки транспортируются только в транспортной среде.

# Лабораторная диагностика.

- Культуральная диагностика :
- - прямой посев на кровяной селективный агар
- - посев с помощью метода мембранной селекции
- - способ обогащения материала
- - использование коммерческих тест-систем для выделения возбудителя из крови



Два типа колоний кампилобактерий  
на кровяном кампилобакагаре

# Некультуральные методы исследования

- - способ прямой микроскопии не нашел широкого применения
- - серологические методы недостаточно специфичны и большой диагностической ценности не имеют. Используют в основном в эпидемиологических целях, в ретроспективной диагностике.

# « Кровянистая» диарея ( дизентериеподобный синдром)

- Clostridium difficile вызывает заболевания различной степени тяжести : от сравнительно легких антибиотик-ассоциированных диарей до угрожающего жизни псевдомембранозного колита.

# Clostridium difficile

- Развивается как осложнение при нерациональной антибиотикотерапии в виде дисбактериоза, сопровождающегося размножением в кишечнике антибиотикоустойчивых Clostridium difficile

# Clostridium difficile

- Возможны случаи внутрибольничного заражения. Обитают в кишечнике некоторых людей ( в небольшом количестве ). Продуцируют экзотоксины А ( энтеротоксин) и В ( цитотоксин).

# Микробиологическая диагностика

- Культуральный метод с выделением *Clostridium difficile* из фекалий с последующим определением цитотоксина выделенных бактерий в ИФА, культуре клеток и энтеротоксина в серологической реакции. Применяется иммуноферментный метод с люминесцентной детекцией продуктов реакции для обнаружение токсина в фекалиях.

# « Кровянистая» диарея ( дизентериеподобный синдром)

- **Системные** проявления кишечных инфекций связаны с кишечными патогенами, основным фактором вирулентности которых является инвазивность. Они способны проникать в лимфоидную ткань кишечника и пролиферировать в этих локусах.

# « Кровянистая» диарея ( дизентериеподобный синдром)

- При выходе м/о за пределы лимфоидной ткани развивается бактериемия с соответствующей клинической картиной. В качестве осложнений возможно формирование внекишечных очагов инфекции различной локализации ( менингит, пневмония и эмпиема плевры, эндокардит, перикардит, артрит, абсцесс печени, селезенки, мягких тканей, пиелонефрит).

# « Кровянистая» диарея ( дизентериеподобный синдром)

- Способность к генерализации свойственна сальмонеллам тифо-паратифозной группы.

## Особенности лабораторного исследования в случае подозрения на ОКИ условно-патогенной этиологии

- исследование испражнений на условно-патогенные микроорганизмы должно проводиться параллельно с исследованием на максимально широкий перечень облигатно патогенных бактерий

## Особенности лабораторного исследования в случае подозрения на ОКИ условно-патогенной этиологии

- для индикации возможно большего числа видов бактерий и грибов одновременно проводится посев на среду Эндо, 5% кровяной агар, желточно-солевой агар и агар Сабуро (стандартный набор)

## Особенности лабораторного исследования в случае подозрения на ОКИ условно-патогенной этиологии

- с целью определения количества отдельных видов условно-патогенных бактерий посев испражнений на все виды питательных сред проводится методом секторных посевов

# ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ПОСЕВА ИСПРАЖНЕНИЙ И УСЛОВИЯ ИХ ИНКУБИРОВАНИЯ

Питательная среда	Выделяемые микроорганизмы	Условия инкубации
Эндо	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Escherichia</i> spp. и другие <i>Enterobacteriaceae</i>	Сутки при 37 °С и сутки при комнатной температуре (для обнаружения <i>Yersinia</i> spp.)
Плоскирева	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>V.parahaemolyticus</i>	2 суток при 37 °С с просмотром через 24 часа
Селенитовый бульон или Мюллера-Кауфмана или магниевая	<i>Salmonella</i> spp.	18-20 часов при 37 °С
Фосфатно-буферный раствор (ФБР) или забуференная пептонная вода или среда Серова или буферно-казеиново-дрожжевая среда	<i>Y.pseudotuberculosis</i> , <i>Y.enterocolitica</i>	До 15 суток и более в холодильнике при 6-10 °С
Элективные питательные среды с антибиотиками (Skirrow или Karmali или Blaser или др.)	<i>Campylobacter</i> spp.	2 суток при 42,5 °С в атмосфере: 5% O <sub>2</sub> ; 10% CO <sub>2</sub> ; 85% N
Щелочная пептонная вода и щелочной МПА или TCBS	<i>V.cholerae</i>	12-18 при 37 °С
Щелочной агар и среда Плоскирева и TCBS	<i>V.parahaemolyticus</i>	12-18 при 37 °С

## Критерии для постановки диагноза «острая кишечная инфекция, обусловленная условно- патогенными микроорганизмами»

1. отсутствие специфических признаков заболевания, обусловленного патогенными микроорганизмами
2. обнаружение условно-патогенных микроорганизмов в испражнениях в количестве более  $10^5$  КОЕ/мл
3. повторное обнаружение того же микроорганизма в возрастающей концентрации

# Критерии для постановки

диагноза

«острая кишечная инфекция, обусловленная условно-патогенными микроорганизмами»

- 4. исчезновение условно-патогенного микроорганизма из фекалий или снижение его численности в результате проводимой терапии
- 5. нарастание титра антител к данному условно-патогенному микроорганизму более чем в 4 раза при одновременном присутствии его в фекалиях в количестве более  $10^5$  КОЕ/мл

# ВЫБОР МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ СИНДРОМЕ ДИАРЕИ (1)

Диагноз	Материал	Сроки взятия	Метод исследования	Лаборатория
Балантидиаз	Кал	С 1 дня болезни	Микроскопия	Лаборатории ЛПУ
Дизентерия	Кал	С 1 дня болезни	Стандартный бактериологический	Лаборатории ЛПУ
	Сыворотка крови	С конца 1 недели	Серодиагностика в РНГА	
Иерсиниоз	Кал, моча	1-6 дни болезни	Специальный бактериологический	Лаборатории ЛПУ
	Смывы из зева	1-3 дни болезни		
	Парные сыворотки крови	Конец 1 и 2-3 недели болезни	Серодиагностика в РНГА	
Кампило-бактериоз	Кал	С 1 дня до конца болезни	Специальный бактериологический	Лаборатории ЛПУ
Кишечный амебиаз	Кал	С 1 дня до конца болезни	Микроскопия	Лаборатории ЛПУ
Криптоспоридиоз	Кал	С 1 дня до конца болезни	Микроскопия	Лаборатории ЛПУ при наличии обученного персонала
ОКИ, обусловленные условно-патогенными бактериями	Кал	С 1 дня до конца болезни	Специальный бактериологический	Лаборатории ЛПУ
	Парные сыворотки крови	Конец 1 и 2-3 недели болезни	Определение АТ к аутоштамму для доказательства этиологической роли	

# ВЫБОР МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ СИНДРОМЕ ДИАРЕИ (2)

Диагноз	Материал	Сроки взятия	Метод исследования	Лаборатория
Пищевые токсико-инфекции	Рвотные массы, промывные воды, кал, пищевые продукты	С 1 дня до конца болезни	Специальный бактериологический	Лаборатории ЛПУ
Псевдо-мембранозный колит	Кал	С 1 дня до конца болезни	Выявление экзотоксина <i>C.difficile</i> по цитопатическому действию на культуре клеток, в ИФА, с помощью иммунохроматографии	Лаборатории НИИ
Ротавирусная инфекция	Кал	С 1 дня до конца болезни	Индикация вирусных Аг в РНГА, ИФА	Лаборатории ЛПУ при наличии препаратов
Сальмонеллез	Кровь	С 1 дня до конца лихорадки	Стандартный или специальный бактериологический	Лаборатории ЛПУ
	Кал, рвотные массы	С 1 дня болезни		
	Сыворотка крови	С конца 1 недели	Серодиагностика в РНГА	