

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
здравоохранения –

Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь



В.И. Качан

2010

Регистрационный № 086-0310

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
ДИСБАКТЕРИОЗА КИШЕЧНИКА
Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: государственное учреждение “Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии” Министерства здравоохранения Республики Беларусь, учреждение здравоохранения “Городская детская инфекционная клиническая больница г.Минска”

Авторы: Л.Д. Газиумарова, Л.П. Титов, Н.Л. Ключко

Минск - 2010

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению (далее Инструкция) устанавливает методы исследования видового состава и количественных соотношений микроорганизмов в норме и при дисбиотических нарушениях в кишечнике.

2. Настоящая Инструкция предназначена для применения в микробиологических лабораториях органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, организаций здравоохранения и других республиканских органов государственного управления, проводящих бактериологическую диагностику дисбактериоза кишечника.

ГЛАВА 2 ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

3. Термин «дисбактериоз», впервые предложенный в 1916 году А.Nissle, обозначает качественные и количественные изменения состава микрофлоры и соотношений между отдельными видами микроорганизмов, обусловленные динамическим нарушением микроэкологии кишечника в результате срыва адаптационных, защитных и компенсаторных механизмов и сопровождающиеся рядом клинических проявлений.

4. Кишечник является мощным лимфоидным органом, по ходу его расположены лимфатические фолликулы, пейеровы бляшки, развита сеть лимфатических сосудов. Это обеспечивает высокую активность местной иммунной защиты, особенно в проксимальных отделах тонкой кишки, содержимое которых в норме почти стерильно (не более 10^3 КОЕ/мл), а показатели бактерицидности секрета составляют около 90%. Толстый кишечник является основным местом обитания кишечной микрофлоры, содержимое которой достигает 12 Ig клеток/грамм фекальных масс, т.е. 30% от сухой массы фекалий составляют микроорганизмы. С целью диагностики дисбактериоза кишечника чаще всего исследуют микрофлору толстого кишечника, которая представлена тремя группами микробов. Облигатная микрофлора, составляющая более 90 % от общего количества биоценоза (бифидобактерии, бактероиды, лактобактерии, кишечная палочка, энтерококки); она осуществляет основные физиологические функции организма (пищеварение, всасывание). Факультативная микрофлора, на долю которых приходится менее 10% от общего количества бактерий (клостридии, стафилококки, протеи, кампилобактерии, дрожжеподобные грибы и другие условно-патогенные микроорганизмы); она также участвует в защитной и пищеварительной функциях. Транзиторная (случайная) микрофлора кишечника. Содержится в значительно меньших количествах (не более 1%).

Она представлена сине-гнойной палочкой, грибами рода кандиды, патогенными энтеробактериями и другими микроорганизмами (Приложение 1. Состав и нормативные показатели микрофлоры толстого кишечника (КОЕ/г фекалий).

5. Видовой состав и количественные соотношения микроорганизмов, в норме относительно стабильны и характеризуют микробиологический статус организма, называемый также эубиозом. Однако снижение числа облигатной микрофлоры, обладающей высокой антагонистической активностью, создает условия для развития тех родов и видов энтеробактерий, размножение которых в нормальных условиях было подавлено конкуренцией активных симбионтов, либо тех микроорганизмов, которые оказались транзиторно в кишечнике. Качественное и количественное содержание микробов желудочно-кишечного тракта может варьировать в соответствии с характером питания, возрастом, полом, воздействием факторов внешней среды, наличием хронических заболеваний, этническими и религиозными особенностями.

ГЛАВА 3 КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА

6. Бифидобактерии являются одним из основных представителей облигатной микрофлоры кишечника. В группу бифидобактерий объединяются грамположительные, бесспорные, плеоморфные, анаэробные бактерии. Морфологическая особенность – раздвоение (бифуркация) концов клетки. В одном препарате могут встречаться несколько различных форм: ”оленьи рога” - палочки с многочисленными ответвлениями; характерны довольно крупные бактерии с раздвоением на одном или обоих полюсах; реже встречаются V-образные формы, а также ровные, слегка изогнутые палочки с шарообразными вздутиями на полюсах или с утонченными концами. Бифидобактерии не растут в аэробных условиях, но некоторые виды растут в капнофильных условиях (примерно 5-10% CO₂). Оптимальная температура роста (37,0-39,0)⁰С. Каталазонегативны, не образуют газа и спор, разлагают многочисленные углеводы, спирты, молоко свертывают в течение 24 ч.

7. Бактероиды представлены гетерогенной группой микроорганизмов и включают палочковидные бактерии родов *Anaerorhabdus*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Bilophila* и многие другие. Некоторые виды потенциально способны вызывать патологические процессы, но подавляющее их число приходится на инфекции, вызванные видами *Bacteroides fragilis* (*B.thetaiotaomicron*, *B.ovatus*, *B.vulgaris*, *B.distasonis*). Грамотрицательные, подвижные или неподвижные палочки, спор не образуют, строгие анаэробы. Палочки могут быть как морфологически сходными, мелкими, так и с

заметным полиморфизмом. Ключевые признаки группы – способность расти в присутствии 20% содержания желчных кислот и резистентность к канамицину, ванкомицину и колистину. Культивирование бактериоидов представляет сложную задачу, требующую условий абсолютного анаэробноза, так как даже при кратковременном контакте с кислородом воздуха их рост прекращается.

8. Лактобактерии объединяют обширный род микроорганизмов, которые идентифицируют по некоторым фенотипическим признакам: способности образовывать газ при ферментации глюкозы. Лактобактерии чаще представляют собой грамположительные палочки длиной 4-5 мкм, располагаются поодиночке или короткими цепочками, неподвижны. Спор не образуют. Являются факультативными анаэробами или микроаэрофилами. Оптимальная температура инкубации 37⁰С в эксикаторе с использованием газогенераторного пакета.

9. Качественные изменения состава микробного пейзажа в кишечнике при дисбактериозе выражаются в изменении ряда свойств кишечной палочки – основного симбионта аэробной микрофлоры. Ферментативные свойства эшерихий: образуют индол, дают отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра и положительную с метилротом; не расщепляют мочевины и обычно не утилизируют цитрат аммония. Не разжижают желатин. Способность расщеплять лактозу - хорошо известное свойство *E.coli*, однако встречаются штаммы, не ферментирующие ее. Одним из характерных признаков является снижение ее антагонистических свойств. Кишечная палочка часто утрачивает и ферментативную активность, подвижность. Гемолизирующие эшерихии, выделенные от лиц с дисбактериозом кишечника, обладают, как правило, токсическими свойствами.

10. Энтерококки выделяют из испражнений у 25% клинически здоровых лиц. Большинство инфекций, вызванных энтерококками, носит эндогенный характер и обусловлено инвазией микроорганизмов при избыточной колонизации. Энтерококк представляет собой диплококки удлиненной формы, более полиморфные, чем стрептококк и пневмококк; располагается по одиночке, группами и длинными цепочками. Окрашивается положительно по Граму, неподвижен, желатин не разжижает, молоко не створаживает. Энтерококк в отличие от стрептококка дает в бульоне диффузный рост. Доминирующими видами в кишечной флоре здорового человека являются *E.faecalis* и *E.faecium*. Внутривидовую дифференциацию энтерококков проводят по ферментативным, гемолитическим свойствам. Гемолизирующие энтерококки также способны вызвать пищевые отравления и дисбактериозы кишечника.

11. Клостридии – один из многочисленных родов факультативной микрофлоры кишечника. Многие виды образуют сильные экзотоксины и являются патогенными для животных и человека. Имеют вид

грамположительных палочек размером от 0,9 до 9 мкм, расположены одиночно, попарно, в виде цепочек или скоплений параллельных клеток. Чаще всего подвижны за счет перитрихальных жгутиков. Метаболически весьма разнообразны. Обычно каталазоотрицательны и облигатные анаэробы. Среди известных патогенных видов следует отметить *Clostridium difficile* - возбудитель, вызывающий псевдомембранозный энтероколит на фоне нерациональной терапии антибиотиками. Бактерии продуцируют 2 вида экзотоксина – токсин А (энтеротоксин) и токсин В (цитотоксин). Важный фактор патогенности *C. difficile* – способность к адгезии к клеткам эпителия толстого кишечника у человека и животных. Установлено наличие *C. difficile* в испражнениях 3% взрослых здоровых людей. Однако у лиц, принимавших антибиотики, выделение этого микроорганизма возрастает до 20% и более. Частота выделения *C. difficile* максимальна в возрасте 2-8 месяцев, к двум годам она снижается до уровня взрослых. Но у ослабленных детей, а также при антибиотикотерапии этот возбудитель может послужить причиной диарейных заболеваний. Диагноз псевдомембранозного колита подтверждается при эндоскопическом исследовании, при выделении культуры *C. difficile*, а также при обнаружении токсинов А и В (в реакции со специфическими сыворотками; методами нейтрализации цитопатогенного действия на культуре ткани; встречного иммунофореза, иммуноферментного анализа, ПЦР и другими).

12. Стафилококки - повсеместно распространенные микроорганизмы, вызывающие поражения у человека и животных. Стафилококки неподвижны, факультативные анаэробы, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Восстанавливают нитриты, образуют H_2S , разлагают глюкозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, глицерин, маннит с выделением кислоты. По наличию коагулазы все стафилококки разделены на две группы: коагулазоположительные (*S. aureus*); и коагулазоотрицательные. Наиболее клинически значимый - *S. aureus*. Золотистый стафилококк часто входит в состав нормальной микрофлоры человека, его находят и у детей в возрасте нескольких дней, но в течение нескольких месяцев число носителей резко сокращается, и основную группу составляют лица старшего возраста. Стафилококки выделяют у 15-30% клинически здоровых взрослых лиц. В большинстве случаев носительство ограничено несколькими неделями или месяцами.

13. Кампилобактерии широко распространены в окружающей среде, среди животных и птиц. Их патогенность для человека была установлена сравнительно недавно. Кроме того, заметно расширился удельный вес вызываемых ими инфекций, равно как и спектр клинических проявлений. Наиболее распространенным патогеном, ответственным примерно за 90% случаев заболевания является *C. jejuni*. Другие виды такие как *C. coli*, *C. lari* и *C. fetus* встречаются реже. Представители рода *Campylobacter* – грамотрицательные бактерии, имеющие форму запятой, серпа, летящей

чайки, короткой или длиной спирали или S-образные, спор и капсул не образуют, подвижные, оптимальная температура роста +37-42⁰С в капнофильных условиях. При культивировании более 48-72 ч. образуют кокковидные формы.

14. Условно-патогенные микроорганизмы семейства кишечных не являются элементами облигатной микрофлоры, вместе с тем они обнаруживаются и у здоровых людей. Условно-патогенные микроорганизмы становятся возбудителями воспалительных заболеваний лишь при определенных условиях, снижающих резистентность микроорганизма. К таким относятся *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* и другие. Все перечисленные представители семейства *Enterobacteriaceae* являются грамотрицательными, аэробными, подвижными или неподвижными палочками. Растут на обычных питательных средах, расщепляют глюкозу с образованием или без образования газа и редуцируют нитриты из нитратов. В здоровом кишечнике вышеперечисленные представители семейства *Enterobacteriaceae* встречаются непостоянно и в небольших количествах. Кроме них могут встречаться бактерии рода *Pseudomonas*, дрожжеподобные грибы и некоторые другие транзиторные микроорганизмы. При одинаковой клинике могут быть разные микробные ассоциации и наоборот. Дисбактериоз характеризуется ассоциацией разных представителей энтеробактерий, но по составу отличной от нормобиоценоза. Более того, состав микрофлоры при дисбактериозе более пестрый и содержит до 5 и более родов, не характерных для нормальной микрофлоры.

ГЛАВА 4 ПОКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЯ

15. Прямыми показаниями к исследованию на дисбактериоз кишечника являются:

- затянувшийся период реконвалесценции после дизентерии или других острых кишечных заболеваний;
- длительно протекающие кишечные расстройства (дисфункции) при которых не удается выделить патогенные микроорганизмы;
- дисфункция кишечника у лиц, длительно подвергающихся воздействию некоторых производственных вредностей (ионизирующие излучения, токсичные химические соединения и др.), а также при интенсивной антибиотико- или иммуносупрессивной терапии;
- обострения хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта (колиты, холециститы, язвенная болезнь и др.);
- наличие системной воспалительной реакции и бактериемии без выраженного очага воспаления;

- наличие трудно поддающихся лечению гнойно-воспалительных очагов и вялотекущих инфекционных процессов;
- подготовка к оперативному вмешательству на органах пищеварения;
- дисфункция кишечника у новорожденных;

ГЛАВА 5

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

16. Все обследуемые за 1-3 дня до взятия пробы должны соблюдать диету, исключая продукты, усиливающие брожение в кишечнике, а также алкоголь и антимикробные лекарственные препараты. От момента последнего принятия пищи до взятия материала должно пройти не менее 8-10 часов. Материалом служат испражнения после естественной дефекации, которые собирают в стерильный герметичный контейнер с широким горлышком и плотно завинчивающейся крышкой без консерванта. Если используют судно, его предварительно дезинфицируют, а после дезинфекции ополаскивают стерильной (или просто кипяченой) водой. Материал берут из средней порции кала стеклянной или деревянной палочкой в количестве не менее 1 г. При наличии в испражнениях патологических примесей (слизь, хлопья, гной) их следует включать в исследуемую пробу. Материал со слизистой оболочки толстого кишечника и секрет из тонкой кишки отбирают при эндоскопических обследованиях в количестве 1 мл. Материал необходимо доставить в лабораторию не позднее, чем через два часа после взятия пробы (интервал между взятием пробы и началом посева не должен превышать четырех часов). При необходимости материал транспортируют в холодильной сумке.

17. Взвешивают 1 г нативного кала (без консерванта), гомогенизируют в 9 мл физиологического раствора (0,85% раствор хлорида натрия) или фосфатного буфера, получая исходное разведение материала (10^{-1}). Содержимое контейнера тщательно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре на 10-15 минут. Из исходного разведения делают высев на среды, обычно используемые для выделения патогенных энтеробактерий и жидкие среды обогащения для выделения патогенных кишечных палочек (Приложение 2. Среда, используемая для выделения бактерий кишечника). Из исходных готовят ряд последующих разведений материала в физиологическом растворе до 10^{-9} , 10^{-10} . Каждое разведение кала готовят новой стерильной пипеткой. Из приготовленных разведений делают дозированные посевы на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов. На плотные среды в чашках Петри наносят 0,1 мл взвеси из соответствующих разведений с последующим втиранием материала шпателем. В жидкие, полужидкие и плотные среды, разлитые в пробирки высоким столбиком вносят 1 мл

взвеси на 9 мл среды. (Приложение 3. Предлагаемая схема посева на различные среды). Все посевы инкубируют при 37⁰С 24-48 ч; чашки со средой Сабуро оставляют после этого еще на двое суток при комнатной температуре (18-24)⁰С. Для культивирования анаэробов используют анаэроостаты, анаэробные камеры; эксикаторы. Можно использовать разовые коммерческие пакеты и генераторы. Посевы инкубируют не менее двух суток.

ГЛАВА 6 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

18. При оценке результатов бактериологического исследования в первую очередь необходимо обращать внимание на наличие в посевах фекалий патогенных энтеробактерий: шигелл, сальмонелл, энтеропатогенных кишечных палочек.

19. Для учета отбирают чашки с плотными питательными средами, на которых выросло от 5 до 150 колоний. Идентификация и определение количества микроорганизмов в 1 г испражнений проводят согласно пунктам 23-36 настоящей Инструкции. Подсчет количества каждого вида микроорганизмов в 1 г образца испражнений (1 мл смыва, секрета) проводят по формуле:

$$M = N \times 10^{n+1},$$

где: M – число микробов в 1 г,

N – количество выросших колоний на чашках,

n – степень разведения материала.

20. Идентификацию патогенных и условно-патогенных энтеробактерий проводят в соответствии с Инструкцией по применению «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями», утвержденной МЗ РБ 8.05.2009 г., регистрационный № 026-0309.

21. На среде Плоскирева (или аналоге) отбирают колонии, подозрительные на патогенные или условно-патогенные энтеробактерии: нежные, прозрачные, бесцветные с ровными или неровными краями. Отобранные однотипные колонии засевают на среду Клигlera (скошенный столбик) для получения чистой культуры и идентификации.

22. На среде Эндо с 2,5% крови (или аналоге) подсчитывают общее количество колоний и количество лактозонегативных (бесцветных) и гемолизирующих колоний. Затем рассчитывают количество кишечных палочек в 1 г фекалий, для чего количество колоний умножают на 10 (так как для посева взято 0,1 мл материала), на 100, на 1000 в соответствии со взятым на исследование разведением культуры. Например: при посеве 0,1 мл из 6-го разведения фекалий на чашке выросло 40 колоний, из них 20 лактозонегативных и 10 гемолизирующих, следовательно, в 1 г

испражнений содержится 4×10^8 КОЕ кишечной палочки, из них лактозонегативных – 2×10^8 , гемолизирующих – 1×10^8 . Окончательный результат количественного содержания бактерий в 1г испражнений выражается как среднее арифметическое из всего количества колоний, подлежащих учету. Для этого сумму колоний, выросших на всех чашках, делят на количество исследуемых чашек, учитывая степень разведения.

23. На Конго рот агаре дифференцируют (по лактозному признаку) патогенные энтеробактерии от непатогенных или условно-патогенных. Лактозоположительная кишечная палочка формирует на среде колонии серого цвета; лактозоотрицательная кишечная палочка – бледно-розовые мутноватые с ровными краями. Клебсиелла растет в виде крупных выпуклых колоний желтого цвета. Лактозоотрицательные микроорганизмы (шигеллы, сальмонеллы, протей) формируют красные прозрачные колонии в тон среды. Их дальнейшая идентификация осуществляется с помощью общепринятых подтверждающих тестов. Кроме того, среда обеспечивает рост и дифференциацию грамположительной кокковой флоры. Стафилококки образуют круглые непрозрачные колонии оранжевого цвета с черным центром или без него. Стрептококки, энтерококки – мелкие от точечных до 1,0 мм в диаметре. При этом в процессе культивирования происходит изменение цвета среды вокруг колоний из красного в черный.

Селективный рост бактерий родов *Proteus-Providencia* учитывают также на амфолан-агаре. Преимущество этой среды – выделение в чистой культуре всех родов бактерий протей, провиденция, морганелла и отсутствие роста у «роящихся» его видов. Количество микроорганизмов характеризуют разведением материала, который дал рост.

24. На среде Сабуро (или аналоге) с добавлением антибиотика полимиксина, хлорамфеникола или гентамицина (40 ЕД на 1 мл среды) исследуют колонии, характерные для грибов рода *Candida*, которые подвергают микроскопии и дальнейшей идентификации. Количество микроорганизмов характеризуется разведением материала, который дал рост грибов.

25. Количество бифидобактерий, бактериоидов, лактобактерий, клостридий, энтерококков и стафилококков определяют по характерным культуральным свойствам на агаровых средах, а также по наличию характерных клеток в мазках, окрашенных по Граму.

26. На средах для бифидобактерий рост и морфология колоний разнообразны: на кровяном агаре вырастают как резко выпуклые, гладкие, так и уплощенные колонии от беспигментного до светло- и темно-коричневого цвета. На высоком столбике среды Блаурокка встречаются колонии чечевицеобразные, ромбовидные и бесформенные шероховатые («кочочок ваты»), чаще белого цвета. Количество бифидобактерий подсчитывают по наличию характерных клеток в мазках, окрашенных по Граму, из пробирок с видимым ростом.

27. Лактобактерии на агаре (лактобакагар, среда Рогоза) образуют мелкие нежные колонии с гладкими или изрезанными краями («паучкообразные»). На среде МРС-4 – гладкие белые, выпуклые, средние по величине колонии; могут быть и более крупные, шероховатые, молочно-белые. О количестве лактобактерий судят по числу характерных колоний, которые подвергают микроскопии и дальнейшей идентификации.

28. Бактероиды культивируют на кровяном агаре или сухой селективной среде с желчью и эскулином (М805). Колонии на кровяном агаре круглые, гладкие, мелкие. Рост сопровождается характерным специфическим запахом. На агаре с желчью и эскулином бактериоиды в результате гидролиза эскулина образуют черные колонии. Подсчет колоний ведется с учетом морфологии и каталазного теста (как правило, бактериоиды каталазоположительны).

29. Для определения клостридий используют специальный селективный агар (М497) или среду Вильсона-Блера. По 1 мл взвеси фекалий из разведений 10^{-2} - 10^{-6} засевают в расплавленную и охлажденную до 50°C среду Вильсон-Блера (по две пробирки каждого разведения). По одной пробирке каждого разведения помещают в водяную баню при 80°C на 20 мин. О количестве клостридий судят по числу черных колоний в глубине агарового столбика Вильсон Блер.

30. Стафилококки определяют при посеве 0,1 мл на желточно-солевой агар, среду Бэрд-Паркера и другие аналоги из разведений 10^{-1} - 10^{-4} . Инкубируют в течение двух суток. Учитывают количество стафилококков и определяют лецитиназную активность. Колонии, различные по морфологии, пересевают на скошенный мясо-пептонный агар. Плазмокоагулирующую способность определяют путем внесения агаровой культуры петлей в агглютинационную пробирку с 0,5 мл стерильной кроличьей или человеческой плазмы, разведенной 1:5. Пробирки помещают в термостат и проверяют образование сгустка через 30 мин и через 4 ч. В качестве контроля ставят пробирку с плазмой без добавления культуры. Рост в анаэробных условиях определяют на среде с маннитом под вазелиновым маслом.

31. Энтерококки выделяют на разнообразных средах: на сахарном и кровяном агарах энтерококки чаще вырастают в виде мелких, выпуклых, гладких, полупрозрачных серовато-белых колоний. На желчно-эскулиновом агаре с азидом натрия энтерококки формируют черные колонии (за счет гидролиза эскулина). Если выросли другие по морфологии колонии, то их принадлежность к роду *Enterococcus* можно подтвердить по отсутствию каталазной активности и характерной морфологии клеток при микроскопии мазков, окрашенных по Граму.

32. Кампилобактерии выделяют на Columbia agar, кампилобакагаре и других средах с добавлением и без добавления разнообразных комплексов антибиотиков. Чаще всего используется смесь антибиотиков, состоящая из ванкомицина, полимиксина и триметоприма. Через 48-72 ч инкубации при

42⁰С в микроаэрофильных условиях кампилобактерии образуют на среде с добавлением крови круглые серые колонии вязкой консистенции, не обладающие гемолитической активностью. Их дальнейшая идентификация - с помощью общепринятых биохимических тестов: способность к продукции оксидазы, каталазы и быстрому гидролизу гиппурата натрия, индоксилацетата и другим согласно Инструкции 4.2.10-17-7-2006 «Клиническая и лабораторная диагностика кампилобактериоза», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь № 36 от 27 марта 2006 г. Обязательно изучение культуры на подвижность и окраска мазков по Граму.

ГЛАВА 7 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

33. Степень изменения микрофлоры кишечника определяется на основании данных бактериологических исследований (двух- и трехкратных), при наличии стойких отклонений от нормы, по качественным и количественным показателям, например:

- при отсутствии роста бифидобактерий в 10⁻⁶-10⁻⁸ разведении, лактобактерий в 10⁻⁶ разведении;
- при снижении количества типичной кишечной палочки до 10⁴ и менее в 1 г фекалий;
- при увеличении количества лактозонегативных штаммов кишечных палочек более 10⁵, при выделении из фекалий гемолизирующей кишечной палочки в любом количестве, а также выделения *S.aureus* более 10⁵;
- при выделении из фекалий условно-патогенных микроорганизмов (протей, кандида) более 10⁵;
- при увеличении количества штаммов *S.faecalis/S.faecium* более 10⁵-10⁷;
- при увеличении количества *Campylobacterium* (*C.jejuni*, *C.coli*) более 10³-10⁴.

34. При выдаче результатов исследований необходимо указать наличие или отсутствие в посевах кала патогенных энтеробактерий (шигелл, сальмонелл, энтеропатогенных кишечных палочек), а также дать описание состава кишечной микрофлоры. С этой целью в бланке направления заполняют графу «Результат исследования» и записывают в нем краткое заключение (Приложение 4. Исследование фекалий на дисбактериоз кишечника).

35. Конечной целью исследования является установление дисбиотических изменений микрофлоры кишечника, но при этом вопрос о постановке диагноза и, соответственно, определении степени дисбактериоза не может быть прерогативой бактериолога.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЕ

36. Предпочтительно использование коммерческих стандартизованных питательных сред из сухого препарата: способ приготовления, способ применения и срок хранения приводится на этикетке.

37. Среда Блаурокка в модификации Г.И. Гончаровой

пептон	10,0 г
натрия хлорид (NaCl)	5,0 г
лактоза	10,0 г
агар	0,75 г
L-цистеин или цистеин солянокислый	100 мг
печеночный отвар	до 100 мл.

Установить рН 7,2-7,4. Стерилизация 0,5 атм 30 мин.

38. Среда МРС-4

марганца сульфат моногидрат ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0,05 г
магния сульфат семиводный ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 г
калия фосфат двузамещенный (K_2HPO_4)	2,0 г
цитрат аммония	2,0 г
натрия ацетат	5,0 г
пептон	10,0 г
цистеин	0,2 г
сорбиновая кислота	40,0 мг
агар-агар	16,0 г
глюкоза	20,0 г
тви-80 или линетол	1 мл
печеночный экстракт	100 мл
дрожжевой аутолизат	50 мл
(или сухой дрожжевой экстракт	5,0 г)
гидролизат молока	500 мл
дистиллированная вода	до 1000 мл

Стерилизация при 0,5 атм 20 мин. Сорбиновую кислоту в количестве 40 мг растворяют в спирте, добавляют к среде после стерилизации, рН 5,0-5,1 устанавливают 10% раствором лимонной кислоты перед розливом в чашки.

39. Среда для выделения бактерий рода протей, провиденции и морганеллы

панкреатический гидролизат казеина	10,0 г
калия сульфат	10,0 г
натрия цитрат	10,0
Д-глюкоза	10,0

амфолан (хлоридалкилдиаминоэтил глицин)	0,5 г
агар микробиологический	11,0
сода кальцинированная	0,5
дистиллированная вода	до 1000 мл
pH 7,2 \pm 0,2	

Растворить все ингредиенты при нагревании в 1 л дистиллированной воды и разлить в стерильные чашки Петри. Среда не автоклавируется.

40. Допускается использование других коммерческих питательных сред, реактивов и диагностических препаратов аналогичного назначения, разрешенных к применению в Республике Беларусь для проведения исследований в соответствии с настоящей Инструкцией по применению, руководствуясь рекомендациями изготовителя.

Приложение 1
к инструкции по применению
«Бактериологическая диагностика
дисбактериоза кишечника»

Состав и нормативные показатели микрофлоры
толстого кишечника (КОЕ/г фекалий)

Микроорганизмы	Дети до 1 года на естественном вскармливании	Дети до трех лет	Взрослые
Бифидобактерии	10^{10} - 10^{11}	10^8 и выше	10^8 и выше
Лактобактерии	10^7 и выше	10^7 и выше	10^7 и выше
Бактероиды	Не менее 10^8	10^7 - 10^8	10^9 - 10^{10}
Энтерококки	10^7 и выше	10^5 - 10^6	10^5 - 10^6
Клостридии	0	0	$<10^5$
E.coli типичные	10^7 - 10^8	10^7 - 10^8	10^7 - 10^8
E.coli лактозонегативные	Не более 10% от общего числа	Не более 10% от общего числа	Не более 10% от общего числа
E.coli гемолитические	0	0	Не более 10% от общего числа
Другие условно- патогенные бактерии	$<10^4$	$<10^4$	$<10^5$
Протей	0 (искусственное вскармливание до 10^3)	$<10^3$	10^3 - 10^4
Стафилококк золотистый	0	$<10^3$	$<10^4$
Дрожжеподобные грибы рода Candida	0	0	$<10^4$
Неферментирующие бактерии	0 (искусственное вскармливание до 10^3)	Не более 10^3	Не более 10^4
Кампилобактерии	0	Не более 10^3	Не более 10^3

Приложение 2
к инструкции по применению
«Бактериологическая диагностика
дисбактериоза кишечника»

Среды, используемые для выделения бактерий кишечника

Микроорганизмы	Питательные среды
Бифидобактерии	Блаурокка и среды для выделения бифидобактерий
Эшерихии	Среды для выделения эшерихий: Эндо, Эндо с 2,5% кровью, желчно-кровяной агар, Мак Конки и другие
Лактобактерии	Среды для выделения лактобактерий: МРС-4, лактобакагар, среда Рогоза-Маана и другие
Бактероиды	Кровяной агар с ростовыми добавками, М805
Другие ассоциации энтеробактерий	Среды для энтеробактерий: Плоскирева, Эндо, Левина, Мак Конки, селенитовый бульон, Конго-рот-агар и другие
Протей	Скошенный агар по Шукевичу, амфолан-агар
Клостридии	Вильсона-Блера, агар для выделения клостридий
Энтерококки	Среды для выделения энтерококков: желчно-эскулиновый агар с азидом натрия, Конго рот агар, энтерококк агар и другие
Стафилококки	Среды для выделения стафилококков: ЖСА, МЖСА, Бэрд-Паркер агар и другие
Кандиды	Среды для выделения грибов с антибиотиками: Сабуро, Никкерсона и другие
Сальмонеллы, шигеллы	Среды для энтеробактерий: Плоскирева, Эндо, Левина, Мак Конки, селенитовый бульон и другие
Кампилобактерии	Среды для выделения кампилобактерий: Колумбия агар, кампилобакагар и другие

Приложение 3
к инструкции по применению
«Бактериологическая диагностика
дисбактериоза кишечника»

Предлагаемая схема посева на различные среды

№	Название питательной среды	Высеваемые разведения	Количество чашек, пробирок
1	Пробирка с буферным раствором для титрования	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	11
2.	Пробирка для посева по Шукевичу	1	1
3.	Пробирка со средой обогащения (селенит, магниевая)	1	1
4.	Чашка со средой для энтеробактерий	3,6,8	3
5.	Чашка со средой для стафилококков	1,3	2
6.	Чашка со средой для грибов	1,3	2
7.	Чашка со средой для энтерококков	6	1
8.	Чашка со средой для гемолитических эшерихий	6	1
9.	Пробирка со средой для клостридий	2, 5, 6	6
10.	Чашка со средой для лактобактерий	5,6	2
11.	Пробирка со средой для бифидобактерий	6, 7, 8, 9, 10	5
12.	Чашка со средой для кампилобактерий	3, 5	2
13.	Чашки со средой для бактероидов	7, 8	4

Примечание: разведения материала и набор питательных сред можно варьировать, сохраняя общий принцип исследования

Приложение 4
к инструкции по применению
«Бактериологическая диагностика
дисбактериоза кишечника»

Исследование фекалий на дисбактериоз кишечника № _____

«__» _____ 20__ г.

Наименование медицинского учреждения _____
отделение _____

1. Фамилия, имя, отчество пациента (больного) _____
2. Число, месяц, год рождения _____
3. Пол: мужской, женский (нужное подчеркнуть)
4. Адрес места жительства: область _____, город (пгт) _____
село (деревня) _____
проспект/улица/переулок/проезд _____ дом _____ корпус _____,
(нужное подчеркнуть)
квартира _____
5. Диагноз _____
6. Время (часы, минуты) взятия материала _____

Наименование микроорганизмов	Количество микроорганизмов в 1 г фекалий		Результат исследования
	взрослые	дети до 3 лет	
Патогенные микроорганизмы	нет	нет	
E.coli с нормальной ферментативной активностью	10^7-10^8	10^7-10^8	
E.coli со сниженной ферментативной активностью	Не более 10% от общего числа	Не более 10% от общего числа	
E.coli гемолитические	Не более 10% от общего числа	0	
Другие условно-патогенные энтеробактерии	Не более 10^5	Не более 10^4	
Микробы рода Протей	10^3-10^4	естественное вскармливание до 1 года 0, искусственное не более 10^3	

Золотистый стафилококк	до 10^3	0	
Энтерококки	до 10^5-10^6	до 10^5-10^6	
Дрожжеподобные грибы	до 10^4	0	
Бифидобактерии	10^6 и выше	10^8 и выше	
Лактобактерии	10^6 и выше	10^6 и выше	
Клостридии	до 10^5	0	
Кампилобактерии	до 10^3	до 10^3	

Клинико-лабораторное заключение _____

Врач лабораторной диагностики _____
(подпись) (инициалы, фамилия)

Фельдшер-лаборант _____
(подпись) (инициалы, фамилия)

Дата выдачи результатов исследования « ___ » _____ 20__ г