

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«РОСТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МИКРОБИОЛОГИИ И ПАРАЗИТОЛОГИИ»

**СОСТАВ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЛЮДЕЙ
КАК МЕТОД ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЭНДОЭКОЛОГИЧЕСКОГО НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ
ПРИ ДИСФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЯХ
БИЛИАРНОГО ТРАКТА**

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПИСЬМО

Ростов-на-Дону 2016

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«РОСТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МИКРОБИОЛОГИИ И ПАРАЗИТОЛОГИИ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН «РостовНИИ микробиологии
и паразитологии» Роспотребнадзора,
д.м.н.

Т.И. Твердохлебова

25.10.2016 г.



**СОСТАВ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЛЮДЕЙ
КАК МЕТОД ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЭНДОЭКОЛОГИЧЕСКОГО НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ
ПРИ ДИСФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЯХ
БИЛИАРНОГО ТРАКТА**

Информационно-методическое письмо

Одобрено Ученым советом
ФБУН «РостовНИИ микробиологии
и паразитологии» Роспотребнадзора
Протокол №5 от 28 сентября 2016 г.

Ростов-на-Дону 2016

Состав микробиоценоза толстой кишки людей как метод вспомогательной диагностики эндозоологического неблагополучия при дисфункциональных нарушениях билиарного тракта.

Информационно-методическое письмо предназначено для врачей лечебно-профилактических организаций, осуществляющих медицинские осмотры детского (старше 2 лет) и взрослого населения, центров, кафедр и клиник, проводящих диспансерное наблюдение и профилактические осмотры населения.

Разработаны:

1. ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
д.м.н. Терновская Л.Н., к.б.н. Гапон М.Н.
2. Лечебно-диагностический центр ООО «Альянс-2000»
гл. врач Кузнецова В.П.

Авторский коллектив:

Терновская Л.Н.

Гапон М.Н.

Кузнецова В.М.

344000, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, 119

Тел./факс (863)234-91-83

E-mail:

СОСТАВ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЛЮДЕЙ КАК МЕТОД ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭНДОЭКОЛОГИЧЕСКОГО НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ ПРИ ДИСФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЯХ БИЛИАРНОГО ТРАКТА

Информационно-методическое письмо

Составители:

Л.Н. Терновская — главный научный сотрудник ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, доктор медицинских наук.

М.Н. Гапон — ведущий научный сотрудник ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, кандидат биологических наук.

В.П. Кузнецова — главный врач лечебно-диагностического центра ООО «Альянс-2000».

Аналитическая часть

Приоритетной задачей современного здравоохранения является сохранение здоровья и продолжительности жизни населения. В этом аспекте актуальным становится выявление отклонений в состоянии здоровья людей на стадии, предшествующей развитию выраженных патологических процессов в системах макроорганизма.

Подготовка данного информационного письма продиктована устойчивым ростом заболеваемости желчевыводящей системы, обусловленной метаболическими, стрессовыми, дискинетическими факторами и, в связи с этим, необходимостью раннего выявления дисфункциональных нарушений гепатобилиарной системы (ДЖВП), приводящих к развитию сопутствующих патологий в системе пищеварения. При появлении таких симптомов как диспепсия, диарея, боли в животе, люди устремляются в лаборатории для выявления бактериальной причины своего дискомфорта, не подозревая, что их состояние может являться следствием развития ДЖВП. Обращаясь к практическому врачу со своей жалобой, пациент чаще всего получает направление на бактериологическое обследование кишечника и в лучшем случае на УЗИ желчного пузыря, но без функциональной пробы (т. к. она не входит в нормативы обязательного обследования). При выявлении в бактериологическом анализе гемолитических эшерихий, которые относятся к условно патогенной микрофлоре, врач обязан (по ОСТ 91500.11.0004-2003) назначить антибактериальную терапию. Однако использование антибиотиков ведет к нарушению микробного равновесия — дисбактериозу. В результате гемолитическая кишечная палочка исчезает на время, а затем появляется вновь уже в комплексе с условно патогенными микроорганизмами — естественным последствием

устранения нормальной микрофлоры. Причина появления гемолитических эшерихий кроется в измененной среде их обитания, которое возникает из-за нарушения поступления желчи в кишечник. При дефиците желчи кишечным палочкам недостает хелатной формы железа, которое они пытаются добыть из эритроцитов путем их разрушения, продуцируя гемолизин. С устранением дисфункциональных нарушений желчевыводящих путей восстанавливается отток желчи и эшерихии утрачивают свою гемолитическую активность.

В связи с этим, выявление в составе микробиоценоза толстой кишки гемолитических эшерихий может служить методом вспомогательной диагностики дисфункциональных нарушений билиарного тракта и определять стратегическую линию дальнейшего специфического обследования. Бактериологический метод исследования использует доступный материал, получение которого не требует вмешательства во внутреннюю среду организма, что в условиях современной эпидемиологической обстановки имеет важное значение.

Формула метода

Оценка изменений состава нормальной микрофлоры толстой кишки людей как метод вспомогательной диагностики дисфункциональных нарушений билиарного тракта.

Выявление гемолитических эшерихий из 5 разведения содержимого толстой кишки может отражать наличие дисфункциональных нарушений билиарного тракта.

Описание метода

Метод информативен при проведении клинико-лабораторного обследования людей с целью оценки состояния здоровья при проведении профосмотров, диспансерного наблюдения разных групп населения.

Метод не требует вмешательства во внутреннюю среду организма.

Метод включает:

3. Забор фекалий, которые забирают после естественной дефекации из горшка, судна, памперса стерильной палочкой или впаянной в крышку специального контейнера ложкой из средней или последней порции каловой массы в стерильную посуду (специальный контейнер) в объеме примерно равном 1/3 чайной ложки. Время от момента забора материала до его обработки в лаборатории не должно превышать 2-х часов.

4. Бактериологическое исследование на дисбактериоз кишечника, которое проводят в соответствии с методическими рекомендациями «Комплексная диагностика, лечение и профилактика дисбактериоза (дисбиоза) в клинике внутренних болезней».

5. Оценку результатов и степени дисбиотических изменений проводят в соответствии с классификацией, изложенной в отраслевом стандарте

«Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003).

Наличие гемолитических эшерихий учитывают на кровяном агаре из разведения 10^{-5} . Выделенные культуры идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам. Видовую принадлежность определяют в соответствии с определителем видов Берджи. Содержание гемолитических эшерихий выражают в процентах (%) от общего количества эшерихий.

6. Результаты проведенного бактериологического исследования оформляют в соответствии с прилагаемой формой:

Качественный и количественный состав основной микрофлоры толстого кишечника у здоровых людей (КОЕ/г фекалий)

Виды микроорганизмов	Нормальные показатели (КОЕ/г фекалий)		Результаты исследования
	Возраст, годы		
	1-60	> 60	
Патогенные энтеробактерии	0	0	
Бифидобактерии	10^9-10^{10}	10^8-10^9	
Лактобактерии	10^7-10^8	10^6-10^7	
Эшерихии-общее количество	10^7-10^8	10^7-10^8	
Эшерихии типичные	10^7-10^8	10^7-10^8	
Эшерихии гемолитические (% от общего кол-ва эшерихий)	0	0	
Эшерихии лактозонегативные	$< 10^5$	$< 10^5$	
Другие условно- патогенные энтеробактерии *	$< 10^4$	$< 10^5$	
Стафилококки золотистые	0	0	
Стафилококки сапрофитные и эпидермальные	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	
Энтерококки	10^5-10^8	10^6-10^7	
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	
Неферментирующие бактерии **	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	

Примечание * - представители родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* и др. ** - *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и др.

Отличительной особенностью состава микробиоценозов толстого кишечника людей с дисфункциональными нарушениями билиарного тракта и, обусловленной этим состоянием патологией органов пищеварения, является наличие в составе микрофлоры толстой кишки гемолитических эшерихий.

Пример:

Иллюстрация выявления эндоэкологического неблагополучия (дисфункциональных нарушений билиарного тракта).

Больная Д. 56 лет обратилась в лечебно-диагностический центр ФБУН РНИИМП для обследования на дисбактериоз толстой кишки с жалобами на запоры и периодические боли в животе.

Проведение бактериологического исследования кала показало следующие результаты:

Виды микроорганизмов	Нормальные показатели (КОЕ/г фекалий)		Результаты исследования
	Возраст, годы		
	1-60	> 60	
Патогенные энтеробактерии	0	0	
Бифидобактерии	10^9-10^{10}	10^8-10^9	10^8
Лактобактерии	10^7-10^8	10^6-10^7	10^8
Эшерихии-общее количество	10^7-10^8	10^7-10^8	10^8
Эшерихии типичные	10^7-10^8	10^7-10^8	10^8
Эшерихии гемолитические (% от общего кол-ва эшерихий)	0	0	$10^8 - 80\%$
Эшерихии лактозонегативные	$< 10^5$	$< 10^5$	0
Другие условно- патогенные энтеробактерии	$< 10^4$	$< 10^5$	0
Стафилококки золотистые	0	0	0
Стафилококки сапрофитные и эпидермальные	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	0
Энтерококки	10^5-10^8	10^6-10^7	10^7
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	10^2
Неферментирующие бактерии	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	10^3

Сопоставление результатов с показателями нормальной микрофлоры выявило у больной Д. умеренно сниженное содержание бифидобактерий, значительно высокое содержание гемолитических эшерихий.

Проведение УЗИ диагностики функции желчного пузыря с использованием пробного завтрака подтвердило наличие ДЖВП по гипокинетическому типу (сократимость желчного пузыря 32 % при норме 75 %).

Проведение больной врачами лечебно-диагностического центра «Альянс-2000» курса комплекса лечебных мероприятий с использованием хофитола, оказывающего желчегонное и гепатотропное действие, способствовало восстановлению стула, исчезновению болей в животе.

При проведении бактериологического исследования кала после лечения гемолитические эшерихии обнаружены не были.

Выявление в составе микробиоценоза толстой кишки гемолитических эшерихий позволяет определить стратегическую линию дальнейшего специфического обследования и коррекции выявленных эндоэкологических нарушений без применения антибактериальных препаратов.

Эффективность использования метода

Было проведено параллельное обследование 1389 человек в возрасте старше 2 лет бактериологическим методом на дисбактериоз кишечника и УЗИ печени, желчного пузыря, поджелудочной железы с использованием пробного завтрака.

При бактериологическом обследовании гемолитические эшерихии в составе микробиоценоза толстой кишки были обнаружены у 766 человек ($55,1 \pm 1,3$ %). При углубленном обследовании (УЗИ печени, желчного пузыря, поджелудочной железы с использованием пробного завтрака) этих же 766 человек, у 648 ($84,7 \pm 1,3$ %) была выявлена дискинезия желчевыводящих путей. Сопоставление данных бактериологического обследования толстой кишки и присутствие в них гемолитических эшерихий у людей с ДЖВП и без нее, показало существенные различия: если гемолитические эшерихии у лиц с установленным наличием ДЖВП регистрировались в $84,7 \pm 1,3$ %, то в группе лиц без ДЖВП гемолитические эшерихии были обнаружены в $6,3 \pm 1,2$ % случаев. Наличие статистически достоверных различий в обнаружении гемолитических эшерихий в составе микробиоценоза толстого кишечника людей с ДЖВП и людей с отсутствием данного вида функциональных нарушений ($t = 12,1$) позволяет полагать, что нарушение поступления желчи в кишечник может явиться одним из факторов, способствующих вегетированию гемолитических эшерихий.

Наиболее характерной особенностью микробного пейзажа толстой кишки людей с ДЖВП является присутствие гемолитических эшерихий в достаточно высоких концентрациях. Их содержание в микробиоценозе толстой кишки составляет от 8 – 10 % до 100 % от общего количества эшерихий, что в среднем соответствует lg 6 - 7.

Рекомендации для врачей лечебно-профилактических организаций, осуществляющих медицинские осмотры детского (старше 2 лет) и взрослого населения, центров, кафедр и клиник, проводящих диспансерное наблюдение и профилактические осмотры населения:

1. Обращать внимание на наличие гемолитических эшерихий (\geq lg 6) в составе кишечного микробиоценоза у лиц старше двух лет и использовать данный показатель в качестве критерия отбора контингентов людей для углубленного обследования методом УЗИ с функциональной нагрузкой с целью выявления ДЖВП.

2. Учитывая временность исчезновения гемолитических эшерихий в кишечном микробиоценозе после применения антибактериальных препаратов, делать выбор в пользу восстановления среды обитания эшерихий путем устранения ДЖВП.

Схема посева фекалий на дисбактериоз

Исследуемые микроорганизмы	Питательные среды	Разведения для посева и посевная доза	Условия культивирования
Патогенные энтеробактерии	Плоскирева, ВСА	10^{-1} , посев петлей	1 сутки – 37° 2 сутки – 37°
Эшерихии	Среда Эндо	10^{-5} , 10^{-6} , посев по 0,1 мл	1 сутки при 37°
Бифидобактерии	Бифидум-среда	10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} посев по 1 мл	4 суток при 37°С
Лактобактерии	МРС	10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} посев по 1 мл	4 суток при 37°С
Условно-патогенные энтеробактерии	Среда Симмонса (чашка Петри)	10^{-4} , посев по 0,1 мл	37°С 2 суток
Энтерококки	Энтерококк-агар	10^3 , 10^5 , 10^6 , посев по 0,1 мл	2 суток, при 37°С
Стафилококки	Желточно-солевой агар	10^{-3} , посев по 0,1 мл	1 сутки при 37°С, 2 сутки при комнатной температуре
Гемолитические энтерококки, стафилококки и кишечные палочки	5% кровяной агар	10^{-5} , 10^{-6} , посев по 0,1 мл	1 сутки при 37°С
Протей	Скошенный агар (посев по Шукевичу)	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} посев по 0,1 мл в конденсат скошенного агара	1 сутки при 37°
Микроскопические грибы	Среда Сабуро	10^{-3} , посев по 0,1 мл	1-е сутки при 37°, 2-е-5-е сутки при 22°
Клостридии	Среда Вильсон-Блер, высокий столбик	10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , посев по 1 мл	2-3 суток при 37°С

Набор питательных сред для диагностики дисбактериоза:

Питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (агар Эндо ГРМ).	ТУ 9385-022-14237 183-07 Р № ФСР 2007/00353 Производство НПО «Питательные среды» г. Махачкала
Питательный агар для культивирования микроорганизмов, сухой (ГРМ-агар).	ТУ 9398-020-78095326 НПО «Питательные среды» г. Махачкала
Агар Плоскирева.	ТУ 9385-112-14237183-08 НПО «Питательные среды» г. Махачкала

Среда Левина.	ТУ 92290072-0041-9785-97 НПО «Питательные среды» г. Махачкала
Среда для стафилококков. Для культивирования стафилококков применяют желточно-солевой агар (ЖСА). В качестве основы используют элективный солевой агар для стафилококков. По прописи, указанной на этикетке готовят 1,8-2 % агар, рН 7,2-7,4. К расплавленному и охлажденному до 45°-50°С агару, соблюдая правила асептики, добавляют 20 % желточной взвеси (асептически извлеченной из яйца желток взбалтывают с 200 мл изотонического раствора хлорида натрия). Смешивают тщательно агар с желточной взвесью, разливают по 20 мл в чашки Петри. Хранят в холодильнике до 2-х недель (приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.).	ТУ 9385-074-39484474-2010 № РУ 08258; ЗАО «НИЦФ» г. Санкт-Петербург (элективный солевой агар).
Энтерококк-агар	ТУ 9398-110-78-095326-2010 № РУ 10008 ФСР 2011/10008 ГНЦ ПМ «Питательные среды» г. Оболенск ФГУП «Аллерген» г. Ставрополь.
Среда для выделения лактобактерий – МРС плотная авторская.	ТУ 9385-019-39484474-2012 № РУ 83215 ФСР 2012/14084 ЗАО «НИЦФ» г. Санкт-Петербург. Каталожный номер 054106.
Кандид-агар или среда Сабуро с антибиотиками.	НПО «Питательные среды» г. Махачкала. ТУ 9385-024-39484474-2012
Бифидум-среда.	ТУ 9398-041-78095326 ГНЦ ПМ «Питательные среды» г. Оболенск
Кровяной агар. Приготовление среды. В качестве основы используют сухой питательный агар. По прописи, указанной на этикетке, готовят 2 % агар, рН 7,4-7,6. К расплавленному и охлажденному до 45°С агару, соблюдая правила асептики, добавляют 5 % (5 мл крови на 100 мл питательной среды) цитратной или дефибринированной крови человека без антибактериальных препаратов. Смесь тщательно перемешивают, чтобы не образовалось пены, и разливают в стерильные чашки Петри, предварительно подогретые в термостате, слоем 3-4 мм. Слой агара должен быть равномерно окрашен в красный цвет. Хранят не более 2-х недель в целлофановых мешках при 4°-6°С.	Приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.
Цитратный агар Симмонса.	ТУ 8398-046-78095326-2008 НПО «Питательные среды»

	г.Махачкала
ГРМ Висмут-сульфит агар ВАС.	ТУ 9385-080-14237183-08 Р № ФСР 2008/03067 НПО «Питательные среды» г. Махачкала
Система для идентификации энтеробактерий. Набор № 2.	ТУ 9389-116-14-237183-2008 НПО «Диагностические системы» г. Нижний Новгород

Приложение 3

Нормативные и методические документы

1. ОСТ 91500.11.0004-2003 Отраслевой стандарт. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника.
2. Комплексная диагностика, лечение и профилактика дисбактериоза (дисбиоза) кишечника в клинике внутренних болезней. Методические рекомендации. М. 1997 (С.Д. Митрохин, М.Д. Ардатская, Е.В. Никушкин)
3. Приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

ОТРЫВНОЙ ЛИСТ

учета эффективности использования информационно-методического письма
«Состав микробиоценоза толстой кишки людей как вспомогательный метод диагностики
эндоэкологического неблагополучия при дисфункциональных нарушениях билиарного
тракта»

Просим указать:

1. Каким учреждением и когда получено информационно-методическое письмо

2. Какое принято решение по документу _____

3. Формы внедрения ИМП (семинары, совещания, приказы и др.)

4. Результаты применения ИМП: положительные, неопределенные, отрицательные
(текст) _____

5. Замечания и предложения по ИМП _____

Дата _____ Подпись _____

(должность, Ф.И.О. заполнившего отрывной лист)

***Направить в ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотреб-
надзора по адресу: 344000, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный,119***