

*АО “Медицинский Университет Астана”
Кафедра: внутренних болезней по интернатуре*

СРС

**На тему: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В
ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ.**

*Выполнила: Амангелдиева А.
Группа: 785 ВБ
Проверила: Костина О.В.*

Астана-2018 год

Микробиологические методы исследований — «золотой стандарт» микробиологической диагностики, так как результаты микробиологических исследований позволяют точно установить факт наличия возбудителя в исследуемом материале. Идентификацию чистых культур (до вида микроорганизма) проводят с учётом морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, токсигенных и антигенных свойств микроорганизма. Большинство исследований включает определение чувствительности к антимикробным препаратам у выделенного возбудителя. Для эпидемиологической оценки роли микроорганизма проводят внутривидовую идентификацию определением фаговаров, биоваров, резистентваров.





Для постановки этиологического диагноза используют бактериологический метод. Материалом для исследования служат испражнения, рвотные массы, промывные воды желудка, пищевые продукты и сырье с которыми связывают развитие болезни. Материал должен быть исследован в первые часы после его забора.

Микробиологическая диагностика.

Основной метод диагностики — *бактериологический*: посев и выделение возбудителя из крови (гемокультура — на 1-ой или 2-й неделе болезни), кала (копрокультура — на 2-й или 3-й неделе болезни), желчи. Бактериологический метод. Материалом для исследования является биоптат слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, рвотные массы, кал, промывные воды желудка с последующей обработкой и посевом на дифференциально-диагностические среды. Биоптат помещают в 20% раствор глюкозы объемом 2 мл. Он может быть использован для посева на дифференциально-диагностические среды в течение 2 ч (при хранении при +4°C до 5 ч). Возможно также использование транспортной среды Стюарта.



Материал засевают на чашки со средами Левина (Эндо) – для выделения энтеробактерий, желточно-солевой – для стафилококков, МПА с фурагином – для выделения псевдомонад, щелочной агар – для вибрионов, МПА – для бацилл, среду Китта-Тароцци – для клостридий. Выделяют чистые культуры, проводят их идентификацию, определяют чувствительность к антибиотикам, определяют факторы патогенности.



Среды для выделения НР:

– **неселективные:** шоколадный агар, агар «Колумбия», содержащий 10% крови барана;

– **селективные:** агар «Колумбия», содержащий 10% крови барана и селективную добавку из антибиотиков (ванкомицин, триметоприм, амфотерицин).

Переносят транспортную среду вместе с биоптатом на среду для выделения НР, зажимают биоптат стерильным пинцетом и волнообразными движениями проводят им по агару, стараясь не повредить поверхностный слой. Биоптат удаляют. Инкубируют среду в микроаэрофильных условиях при 37°C в течение 3–5 суток. После инкубации удостоверяются в принадлежности выросшей культуры микроорганизмов к группе грамотрицательных палочек, изогнутых или спиральных, оксидазо-, каталазо- и уреазоположительных. Далее отбирают хорошо изолированную колонию (прозрачные, блестящие колонии) и пересевают ее на агар для получения чистой культуры. Инкубируют в микроаэрофильных условиях при 37°C в течение 72 часов. Выделенные чистые культуры идентифицируют и определяют антибиотикочувствительность.



Определение уреазной активности микроорганизмов

При взаимодействии микробной культуры с раствором мочевины происходит ее разложение под влиянием уреазы бактерий с образованием аммиака и смещением рН в щелочную сторону. При наличии в растворе индикатора фенолового красного при этом изменяется цвет смеси на ярко-красный.

Определение редукции нитратов микроорганизмами

При взаимодействии микробной культуры с питательной средой, содержащей нитраты, в случае образования ими нитратредуктазы происходит редукция субстрата с образованием нитритов, которые выявляются с помощью солянокислого риванола по хромогенной реакции с изменением цвета смеси на розово-красный.

Определение оксидазной активности микроорганизмов

При взаимодействии микробной культуры с раствором тетраметилпарафенилендиамина происходит его разложение под влиянием оксидазы бактерий с изменением цвета смеси на красный.

Определение каталазной активности микроорганизмов

При взаимодействии микробной культуры с раствором перекиси водорода происходит ее разложение под влиянием каталазы бактерий с образованием пузырьков газа (O_2) в культуре. При проверке анаэробных микроорганизмов на каталазную активность следует выдержать культуру на воздухе в течение примерно 30 мин., а затем добавить перекись водорода.



Методы исследования микробиоты тонкой кишки

Нарушение качественного и количественного состава микрофлоры тонкой кишки проявляется развитием синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) — состояния, при котором наряду с увеличением общего количества бактерий в кишке $>10^5$ КОЕ/мл (в ряде случаев до 10^{11} КОЕ/мл) происходит изменение бактериального спектра в сторону грамотрицательных и анаэробных штаммов, что клинически проявляется диареей, вздутием живота, симптомами нарушенного всасывания жирорастворимых витаминов — остеомалацией, гипокоагуляцией, снижением сумеречного зрения и др.

Методы, применяемые для диагностики СИБР, подразделяются на прямые (посев тонкокишечно-го аспирата) и косвенные (дыхательные тесты. Посев аспирата из тонкой кишки (прямой метод). На сегодняшний день в мировой практике «золотым стандартом» диагностики СИБР служит посев аспирата тонкокишечного содержимого. Забор аспирата осуществляется с помощью специального зонда либо энтероскопа. К наиболее часто выявляемым при культуральном исследовании аспирата микроорганизмам относятся стрептококки, эшерихии, лактобациллы, бактероиды. Диагностически значимым считается содержание микроорганизмов в аспирате тонкой кишки $>10^6$ КОЕ/мл. Однако исследование микробной культуры требует специальных условий для анаэробного культивирования и имеет ряд недостатков, таких как низкая воспроизводимость, трудность идентификации некультивируемых бактерий и невозможность оценки пристеночной микрофлоры. Кроме того, при помощи традиционной энтероскопии не может быть диагностирован «дистальный» СИБР, локализованный преимущественно в подвздошной кишке. В некоторых случаях бактериальная обсемененность может быть неравномерной или избыточный рост бактерий может иметь место в областях, труднодоступных для аспирации (например, при аномалиях развития тонкой кишки, приводящих к псевдообструкции и застою содержимого), что также может служить поводом для неинформативности исследования

Микробиологическое исследование кала

Показанием для такого исследования является дисбактериоз. Нарушение деятельности микрофлоры, возникающее при дисбактериозе, негативно отражается на протекании физиологических процессов и на организм в целом. Дисбактериоз может быть ярко выражен клинически в виде нарушений деятельности ЖКТ – диареи, колита, синдрома малой сорбции. При разных формах дисбиотических изменений лидирующим агентом могут быть разные условно-патогенные возбудители – стафилококки, дрожжеподобные грибы, аспергиллы, клебсиеллы и др.

Этот вид анализа состоит из выделения и идентификацию микроорганизмов, являющихся возбудителями острых кишечных инфекций. Взятие исследуемого материала. Исследуемым материалом могут служить испражнения, полученные при естественной дефекации или с помощью ректальных тампонов (петель). Время до начала бактериологического исследования, если консервант не применяется, не должно превышать двух часов. Универсальным консервантом является транспортная среда Кэри-Блер. Объем испражнений, вносимых в транспортную среду, не должен превышать 1/3 её объема. После внесения пробу перемешивают со средой. Время хранения образцов до начала исследования может составлять до 1 суток в холодильнике, однако оптимальным является проведение посева через 1–2 часа после забора. Материал для анализа берётся до начала приёма лекарственных средств. За 3-4 дня до сбора кала следует прекратить приём слабительных препаратов, использование ректальных свечей, масел и т.д.



Желчь исследуют при воспалительных заболеваниях желчного пузыря и желчных протоков (холециститы, холангиты, желчнокаменная болезнь), при диагностике брюшного тифа и брюшнотифозного носительства. Наиболее часто из желчи выделяют *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Actinomyces spp.*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*

Желчь собирают путем зондирования, в три стерильные пробирки, отдельно по порциям А, В и С (соответственно дуоденальное содержимое, пузырную желчь и желчь из желчных протоков), либо во время операции с помощью шприца в одну пробирку, соблюдая правила асептики.

Дуоденальное содержимое и желчь имеют зеленовато-желтый цвет и щелочную реакцию. Кислая реакция, белесоватый оттенок жидкости, наличие хлопьев свидетельствуют о примеси желудочного сока, такой материал не пригоден для исследования. Пробы доставляют в лабораторию в течение 1-2 часов от момента взятия.



● **Культивирование.**

По 0,1 мл каждой порции желчи высевают на кровяной агар, инкубируют при 35-37⁰ С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; по 0,1 мл на среду Эндо (среда МакКонки) – при 35-37⁰ С в аэробных условиях, в течение 24 часов; на анаэробный агар (агар Шедлера и другие) - при 35-37⁰ С в анаэробных условиях в течение 7 дней; в тиогликолевую среду - при 35-37⁰ С в анаэробных условиях в течение 7-10 дней. Для выделения сальмонелл желчь засевают в соотношении 1:9 в селенитовый бульон, а также помещают в термостат нативную желчь, в последующем на протяжении 3 дней ежедневно производят высевы на висмут - сульфит агар с селенитового бульона и из нативной желчи.



- При оценке результатов необходимо учитывать количество микроорганизмов в 1 мл желчи, так как по степени микробного обсеменения можно судить о локализации воспалительного процесса и оценивать его динамику при повторных исследованиях. Находка значительных количеств *S. aureus* может свидетельствовать о печеночном или поддиафрагмальном абсцессе.



Литература

1. Ivashkin V.T., Sheptulin A.A., Sklyanskaya O.A. Syndrome of diarrhea. 2 ed., corr., revised. M.: GEOTAR media, 2002. – С. 58–63.
3. Кучумова С. Ю., 2. Полуэктова Е. А., Шептулин А. А., Ивашкин В. Т. Физиологическое значение кишечной микрофлоры // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол.— 2011. — Т. 21, № 5. — С. 17–27
3. КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ Пособие Под редакцией доцента С.В. Лелевича

