

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Харківський національний медичний університет

МОДУЛЬ 3
Частина 2
РОДИНА КИШКОВИХ БАКТЕРІЙ

Методичні вказівки
з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія
та імунологія з мікробіологічною діагностикою"
до практичних занять
для студентів-бакалаврів III–IV курсу
за спеціальністю "Лабораторна діагностика"

Затверджено
вченою радою ХНМУ.
Протокол № 8 від 19.09.2013.

Харків
ХНМУ
2014

Модуль 3. Частина 2. Родина кишкових бактерій : метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю "Лабораторна діагностика" / упор. В.В. Мінухін, Н.І. Коваленко, Т.М. Замазій. – Харків : ХНМУ, 2014. – 44 с.

Упорядники В.В. Мінухін
 Н.І. Коваленко
 Т.М. Замазій

Тема: Лабораторна діагностика ешерихіозів

Кількість годин: 4.

Обґрунтування теми

Кишковий ешерихіоз – гостра кишкова інфекція (ГКІ), яка обумовлена різними серологічними групами ентеропатогенних (діареєгенних) кишкових паличок (ЕПКП), характеризується наявністю симптомів інтоксикації різного ступеня вираженості і синдрому ураження травного тракту, частіше у вигляді ентериту, ентероколіту. Рідше ешерихіоз протікає з позакишковою локалізацією.

Кишкова паличка є постійним мешканцем нижніх відділів травного тракту здорової людини і виконує у складі кишкового мікробіоценозу низку корисних для макроорганізму функцій. Проте окремі представники цього виду бактерій можуть викликати у людини різні захворювання, у тому числі ГКІ і позакишкові ешерихіози (ПКЕ). Ешерихії, разом з іншими умовно-патогенними мікроорганізмами, посідають значне місце в групі ГКІ. Це свідчить про варіабельність характеру симбіотичних зв'язків *Escherichia coli* з макроорганізмом і різне біомедичне значення подібних взаємин.

За даними ВООЗ, щорічно реєструється до 275 млн випадків діарейних захворювань у дорослих і дітей. У спектрі збудників ГКІ істотну питому вагу мають *E. coli*. У дітей раннього віку цей показник складає 29,4–81,4 %, у дорослих – 5–15 %. У загальній структурі реєстрованих ГКІ ешерихіози складають 2,8–3,4 %. За повідомленнями ВООЗ, ешерихіози посідають перше місце серед діарейних захворювань у новонароджених і дітей раннього віку. У дорослих вони реєструються як діарея мандрівників.

Мета:

– Загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою ешерихіозів.

– Конкретна:

а) знати:

1. Правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.

2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.

3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на ешерихіози.

4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на ешерихіоз.

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення представників родини кишкових бактерій.

6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення: музейні мікропрепарати, живильні середовища (Ендо, середовище Гісса, МПА), патогенний матеріал, чиста культура *E. coli*, бланки направлень, бікс, сірники, маркер, штативи, бактеріологічні петлі, ріст культури *E. coli* на Ендо, імунні сироватки, мікроскоп, імерсійне масло, предметні скельця, набір для фарбування за Грамом, чашки Петрі, пробірки, дезінфікуючий розчин, фізіологічний розчин, таблиці, атлас.

Зміст заняття

Таксономія

Родина: Enterobacteriaceae

Рід: Escherichia

Вид: Escherichia coli

Морфологічні та тинкторіальні властивості. *E. coli* – це короткі палички із заокругленими кінцями, поліморфні (можуть мати вигляд кокобактерій або нитки), розміром 1,1–1,5×2,0–6,0 мкм. Більшість штамів мають капсулу або мікрокапсулу, рухливі (перитрихи), але трапляються і нерухливі штами, спору не утворюють, грамнегативні.

Культуральні властивості. *E. coli* – факультативні анаероби, невибагливі до поживних середовищ, легко ростуть на МПА і МПБ. На щільних середовищах бактерії утворюють плоскі опуклі каламутні S-колонії з рівними або трошки хвилястими краями (3–5 мм у діаметрі) або сухі плоскі R-колонії з нерівними краями.

У рідких середовищах ростуть дифузно, викликаючи помутніння середовища і утворення осаду (рідше формують поверхневу плівку або пристінкове кільце).

На диференційно-діагностичних середовищах (Ендо, ЕМС, Плоскірева ешерихії розщеплюють лактозу з накопиченням кислоти, внаслідок чого змінюється забарвлення індикатора, тому колонії мають яскраве забарвлення: на середовищі Ендо – колонії малинового кольору з металевим блиском і без нього; на середовищі ЕМС (Левіна) – темно-фіолетові з металевим блиском і без нього; на середовищі Плоскірева – червоні з жовтим відтінком. Оптимальними умовами культивування є температура 37 °С, рН 7,2–7,8.

Ферментативні властивості. *E. coli* ферментативно активні. У них добре виражені сахаролітичні властивості: розщеплюють глюкозу, лактозу, маніт, мальтозу, сахарозу, арабінозу та інші вуглеводи до кислоти і газу (є штами, які не ферментують лактозу і сахарозу); відновлюють нітрати до нітритів; протеолітичні властивості виражені слабо: ешерихії утворюють індол, не утворюють сірководень, не розріджують желатин. *E. coli* оксидазо-негативні й каталазо-позитивні.

Антигенні властивості. У ешерихій виявлено три типи антигенів: О-, К- і Н-антиген. О-антиген – соматичний, це ліпополісахарид клітинної стінки, термостабільний. За О-антигеном визначають серологічну групу ешерихій. Відомо 171 різновидів О-антигену.

К-антиген – капсульний. Може бути представлений трьома антигенами: А, В, і L, які відрізняються за чутливістю до температури і хімічних речовин. Найбільше практичне значення має В-компонент. За структурою К-антигену виділено 100 сероваріантів ешерихій. К-антиген володіє здатністю маскувати О-антиген, обумовлюючи феномен О-інаглютинабельності. У такому випадку О-антиген можна виявити тільки після руйнування К-антигену кип'ятінням.

Н-антиген (джгутиковий) має білкову природу, термолабільний. Відомо 57 типів Н-антигену у ешерихій.

Антигенну структуру ешерихій визначають у реакції аглютинації і таким чином встановлюють антигенну формулу культури. Якщо культура аглютинується ОК-сироваткою 0111: K58 (B4) і Н-сироваткою "6", то антигенна формула культури буде мати вигляд 0111:B4:H6.

Умовно-патогенні й патогенні ешерихії не відрізняються за культуральними, морфологічними, тинкторіальними і біохімічними властивостями. Вони відрізняються тільки за антигенною структурою.

Крім сероваріанта в ешерихій визначають фаговаріант для з'ясування епідеміологічної ситуації. Ешерихії здатні продукувати коліцини, тому можна проводити їх коліциногенотипування і коліцинотипування для з'ясування епідеміологічної ситуації.

Резистентність. *E. coli* відносно стійкі в навколишньому середовищі. У ґрунті, воді вони зберігаються протягом 2–3 міс, а в молоці та інших харчових продуктах не тільки зберігаються, а й розмножуються. *E. coli* чутливі до високої температури, дезінфектантів. Під час кип'ятіння вони гинуть протягом 1 хв, при 60 °С – 15 хв, під дією дезінфекційних розчинів (3 % розчин хлораміну) – через 20–30 хв, особливо чутливі до діамантового зеленого.

Фактори патогенності. Умовно-патогенні ешерихії продукують ендотоксин.

У діареєгенних *E. coli* виявлені такі фактори патогенності:

✓ Фактори адгезії і колонізації – фімбрії, білки поверхневої мембрани, ліпополісахариди.

✓ Фактори інвазії – білки поверхневої мембрани; екзотоксини: цитотоніни і цитотоксини. Цитотоніни призводять до порушення водно-солевого обміну. З клітин кишечника виводяться іони натрію, калію, хлору, іони бікарбонату, внаслідок чого настає гіперсекреція рідини клітинами кишечника – розвивається діарея. Цитотоксини зумовлюють руйнування клітин ендотелію капілярів і стінки кишечника. У ЕІЕС виявлено шигаподібні (дизентерієподібні) токсини, а у ЕТЕС – токсини, які подібні до холероген-токсину.

✓ Ендотоксин – ліпополісахарид клітинної стінки зумовлює ендотоксикоз.

Фактори патогенності діареєгенних *E. coli* контролюються генами хромосоми, плазмід і помірними фагами. Тому патогенні варіанти кишкової

палички можуть виникнути з непатогенних внаслідок поширення серед них плазмід і помірних фагів.

Епідеміологія. Вид *E. coli* не є однорідним, а поділяється на підвиди. Розрізняють ешерихії умовно-патогенні і діареєгенні.

Умовно-патогенні ешерихії є представниками нормальної мікрофлори людей, ссавців, птахів, плазунів, риб і комах. Природним місцем їх перебування у людини є товста кишка. Ешерихії беруть участь у перетравленні їжі, виробляють вітаміни В1, В2, В3, В6, К, РР, синтезують амінокислоти та білки. Крім того, ешерихії є антагоністами патогенної мікрофлори, тому виконують захисну функцію. Зменшення їх кількості є ознакою дисбактеріозу. У разі потрапляння в інші органи і тканини вони спричиняють сепсис, ендометрит, перитоніт, цистит, пієліт, холецистит (парентеральний ешерихіоз). Часто парентеральний ешерихіоз виникає на фоні імунodefіциту.

Як представник нормальної мікрофлори людини *E. coli* постійно і у великій кількості виділяється з фекаліями в навколишнє середовище і потрапляє в ґрунт, стічні води та інші об'єкти: на руки, посуд, у питну воду, харчові продукти. Тому за міжнародними стандартами *E. coli* є одним із показників фекального забруднення довкілля.

Накопичення ешерихій у харчових продуктах призводить до харчових токсикоінфекцій.

Патогенні ешерихії є збудниками гострих кишкових захворювань (ГКЗ). Їх ще називають діареєгенними (кишковий ешерихіоз). Патогенні ешерихії поділяють на 5 груп:

ЕПКП – ентеропатогенні *E. coli*, що спричиняють колі-ентерит у дітей раннього віку (1-го року життя) (O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O142);

ЕТКП – ентеротоксигенні *E. coli*, які спричиняють холероподібні ГКЗ у дітей і дорослих (O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O139, O148, O153, O159);

ЕІКП – ентероінвазивні *E. coli*, що схожі на шигели (нерухливі, не ферментують лактозу) і спричиняють дизентерієподібні (шигельозоподібні) ГКЗ у дітей і дорослих (O29, O154, O136, O143, O144, O152, O164, O167);

ЕГКП – ентерогеморагічні *E. coli*, які ушкоджують ендотелій дрібних кровоносних судин, патогенні для дітей і дорослих (O157). Спалахи інфекції реєструються повсюдно. Природним резервуаром є велика рогата худоба і вівці. Фактори передачі: молоко, м'ясо з недостатньою термічною обробкою, вода.

ЕАгКП – ентероагрегуючі й ДАКП – дифузно-агрегуючі *E. coli*, їх властивості ще недостатньо вивчені.

Хвороби, які спричиняють ешерихії, називають ешерихіозами. Джерелом інфекції при ешерихіозах переважно є інфіковані люди. Але трапляються випадки, коли діареєгенні ешерихії уражають велику рогату худобу, свиней, поросят, телят, ягнят, які також можуть бути джерелом інфекції.

Основний механізм передачі – фекально-оральний. Найчастіше люди заражаються аліментарним шляхом під час вживання контамінованої їжі: недостатньо термічно обробленої яловичини, молока, води. Можливі контактнo-побутовий механізм передачі, а також під час контакту з хворими тваринами.

Патогенез і клінічна картина. Умовно-патогенні ешерихії можуть призводити до ендогенних інфекцій гнійно-запального характеру або екзогенної харчової токсикоінфекції.

Патогенні групи ешерихій зумовлюють екзогенні інфекції.

ЕПКП колонізують клітини тонкої кишки, спричиняють ушкодження поверхні епітелію з утворенням виразок, запалення. Хворі скаржаться на болі у животі, блювання, водянистий пронос без домішок крові (зневоднення організму). Захворювання має тяжкий і тривалий перебіг, може продовжуватися 2 тиж і більше.

ЕТКП колонізують ворсинки нижніх відділів тонкої кишки без їх ушкодження. Патогенність їх пов'язана з продукуванням холероподібного екзотоксину, тому хвороба має перебіг за типом холероподібної діареї. Реєструється переважно в країнах зі спекотним кліматом серед мандрівників із розвинених країн із помірним кліматом. Захворювання отримало назву "діарея туриста".

ЕІКП колонізують, проникають і розмножуються всередині клітин товстої кишки, наслідком чого є коліт з утворенням виразок. Хвороба проявляється болем у животі, водянистою діареєю з домішками крові.

ЕГКП руйнують клітини ендотелію дрібних кровоносних судин. Наслідком цього є кровотеча, випадіння фібрину, утворення згустків крові, порушення кровообігу. Все це призводить до ішемії (від грец. *ischo* – зупиняю, затримую і *haima* – кров) – знекровлення і некрозу (від грец. *nekrosis* – змертвіння) у кишечній стінці. ЕГКП продукують веротоксини або шига-подібні токсини. Уражаються сліпа, висхідна і поперечна товсті кишки.

Хвороба проявляється кишковими спазмами (біль у животі), появою спочатку водянистого, потім з домішками крові проносу, пізніше розвивається уремичний геморагічний синдром. Хвороба має тяжкий перебіг – розвивається анемія, ниркова недостатність, що призводить до летального наслідку.

Імунітет. Природний захист у дітей зумовлений IgM, які синтезуються в організмі дитини, IgA, що передаються з материнським молоком, а також біфідумфлорою. Постінфекційний імунітет є специфічним до того серо-варіанта, який спричинив інфекцію, нестійкий. Велика різноманітність серо-варіантів ешерихій призводить до зниження такого імунітету.

Мікробіологічна діагностика. Мікробіологічна діагностика ешерихіозів, зумовлених діареегенними *E. coli*, ґрунтується на виділенні чистої культури збудника та її ідентифікації. На аналіз відбирають випорожнення і блювотні маси. У деяких випадках досліджують виділення з носа, зів, вуха, гній,

кров, сечу, секційний матеріал. За епідеміологічними показаннями відбирають харчові продукти, воду, проводять дослідження змивів із рук обслуговуючого персоналу, іграшок, посуду тощо.

Методи дослідження: бактеріоскопічний, бактеріологічний, серологічний.

Досліджуваний матеріал засівають на диференційно-діагностичні середовища з лактозою (Ендо, ЕМС). Після інкубації при 37 °С протягом 18 год відбирають колонії, які аглютинуються полівалентною ОК-сироваткою, з наступною ідентифікацією до виду за біохімічними тестами і подальшим визначенням їх серологічного варіанту.

Певне діагностичне значення мають *серологічні методи* досліджень, хоча вони і менш інформативні, непереконаливі, оскільки можливі псевдо-позитивні результати через антигенну схожість з іншими ентеробактеріями. Використовують для ретроспективної діагностики, особливо під час спалаху. Нині серед серологічних методів дослідження використовують РНГА (діагностичний титр 1:200–1:400 для дорослих, 1:40–1:80 для дітей); реакцію імуофлуоресценції; реакцію імунної сорбції антигін, міченими ферментами; реакцію нейтралізації; реакцію аглютинації з аутокультурою при наростанні титру антитіл у 4 рази і більше в динаміці захворювання.

Для визначення цитотоксинів у випорожненнях хворих використовують реакцію ІФА.

Найбільш специфічним і швидким є метод ДНК-зондів. Він дає змогу виявити гени плазмід, відповідальних за патогенність *E. coli*.

Профілактика. Неспецифічна профілактика колі-інфекції полягає в дотриманні санітарно-гігієнічного режиму в лікувальних закладах, особливо в дитячих, пологових будинках, дитячих молочних кухнях. Велике значення має дотримання правил особистої гігієни, знищення мух і тарганів. Для профілактики внутрішньолікарняних інфекцій використовують піобактеріофаг (містить фаголізат багатьох збудників гнійно-септичних внутрішньолікарняних інфекцій, у тому числі й фаголізат *E. coli*). Колі-протейний фаг використовують для профілактики ентероколітів у дітей з 1-го року життя в осередках інфекції.

Лікування. Для лікування використовують колі-протейний фаг, антибіотики: ампіцилін, норфлоксацин, цефтріаксон. Для відновлення порушеного водно-сольового балансу використовують оральні (від лат. *os*, родовий відмінок *oris* – рот) сольові розчини, що містять іони калію, натрію, гідроген-карбонат-іони і глюкозу. Для відновлення нормальної мікрофлори кишечника призначають еубіотики: колібактерин, біфідумбактерин, біфікол, лактобактерин, бактисубтил, біоспорин, ліофілізовану культуру ацидоз-фільних бактерій. Ці препарати є життєздатною культурою нормальної мікрофлори і сприяють відновленню фізіологічної функції кишечника. Можна їх використовувати як у вигляді пігулок, порошоків, так і у складі молочнокислих харчових продуктів (йогурти, біокефір та ін.).

Практичні навички з теми

1. Виготовлення живильних середовищ для культивування ЕПКП (Ендо, скошений МПА, середовище Гісса).
2. Проведення первинного посіву патологічного матеріалу на середовища Ендо.
3. Опис характеру росту ЕПКП на середовище Ендо.
4. Мікроскопія зі скошеного МПА для визначення чистоти культури, визначення морфотинкторіальних властивостей ешерихій у препараті.
5. Постановка орієнтовної реакції аглютинації з полівалентною ОК-сироваткою.
6. Вивчення ферментативної активності:
 - проведення посіву на середовище Гісса для визначення сахаролітичних ферментів;
 - проведення посіву на МПБ для визначення індолу і сірководню.
7. Постановка розгорнутої реакції аглютинації з живою і нагрітою культурою.

Алгоритми лабораторної роботи:

Алгоритм: «Правила забору матеріалу при підозрі на кишкову інфекцію».

Матеріал для дослідження: кров, випорожнення, блювотні маси, секційний матеріал, сеча, гній, спинномозкова рідина; при харчових токсикоінфекціях: харчові продукти, змиви з рук обслуговуючого персоналу, іграшок та ін.

Взяття матеріалу. Відбір фекалій проводять двома способами: фекалії відбирають із суден, горшків чи лотків у стерильну баночку або забирають ректальним тампоном.

Оптимальний для виділення культури ентеробактерій відбір фекалій слід провести одразу після дефекації. Посуд, у який збирають фекалії від хворого, дезінфікують освітленим розчином хлорного вапна, потім багаторазово промивають гарячою водою до повного видалення слідів дезінфектанту. Фекалії відбирають із посуду (у немовлят – із пелюшок) стерильною дерев'яною паличкою у кількості 3–5 г із останніх порцій (більшість ентеробактерій уражує тонку кишку) і вміщують у стерильну баночку. Якщо у фекаліях є домішки, то їх обов'язково включають у пробу: гній, слиз, пластівці (але не кров!). У разі неможливості отримати фекалії після дефекації матеріал відбирають безпосередньо із прямої кишки ректальним тампоном.

Алгоритм "Взяття фекалій ректальним тампоном":

- надягніть гумові рукавички;
- покладіть фантом на лівий бік (пацієнту пропонують лягти на лівий бік і зігнути ноги в колінах);
- візьміть ректальний тампон (без пробірки) у праву руку;

- візьміть у ліву руку флакон зі стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду, зніміть з нього пробку мізинцем правої руки;
- опустіть ректальний тампон у флакон з ізотонічним розчином натрію хлориду;
- видаліть ректальний тампон із флакона, віджимаючи його об стінки флакона;

- закрийте флакон пробкою (тампон тримайте правою рукою);

Увага! Не можна відбирати матеріал сухим тампоном. Не можна вводити тампон силою. За наявності набряку слизової оболонки прямої кишки і виразок це призведе до додаткового травмування і спричинить біль у пацієнта.

- розведіть сідниці пацієнта великим і вказівним пальцями лівої руки;
- уведіть тампон у пряму кишку на 3–5 см у напрямку пупка, поверніть його паралельно до хребта і введіть ще на 5–7 см;

Увага! У дорослих тампон вводять на глибину 8–10 см, у дітей – на 3–5 см.

- видаліть тампон із прямої кишки, опустіть його у стерильну пробірку (з якої був взятий), підпишіть на пробірці номер аналізу;
- поставте тампон у штатив, вимийте руки;
- заповніть направлення.

3–5 г фекалій додають у пробірку з ізотонічним розчином натрію хлориду, або 30 % гліциринову суміш (30 частин гліцирину і 70 ізотонічного розчину натрію хлориду).

Фекалії, відібрані у стерильні баночки, мають бути посяні не пізніше 2 год від моменту взяття.

Доставлені фекалії розводять ізотонічним розчином натрію хлориду у співвідношенні 1:5 або 1:10 і дають відстоятися протягом 30–60 хв. Грубі часточки фекалій осідають на дно. Ентеробактерії як факультативні аероби скупчуються на поверхні, тому під час посіву матеріал відбирають з баночки бактеріологічною петлею або піпеткою з поверхні й наносять 1–2 краплі на поверхню живильного середовища. Поверхня пластинчастих середовищ повинна бути підсушеною, на ній не має бути крапель конденсаційної води.

Блювотні маси (3–5 г) збирають у стерильний посуд і розмішують в ізотонічному розчині натрію хлориду.

Алгоритм: *«Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на ешерихіози».*

1-й день дослідження. Проводиться посів патогенного матеріалу (випорожнень) на середовище Ендо, Левіна бак. петлею. Посів слід проводити на 2–3 чашки, набираючи для кожної чашки матеріал наново. Інкубація в термостаті при 37 °С 18–24 год.

2-й день дослідження. Проводиться перегляд колоній на середовищі Ендо. *E. coli* утворюють колонії в S-формі, червоного кольору з металевим

блиском або без нього, тому що в середовищі Ендо знаходиться лактоза, яку розщеплюють кишкові палички, рН середовища змінюється в кислий бік і завдяки індикатору фуксину колонії забарвлюються в червоний колір. На середовищі Левіна (індикатор метиленовий синій) утворюються колонії синього кольору.

Проводиться мікроскопія "підозрілих" колоній, забарвлених за методом Грама. Якщо виявляють грамнегативні палички, відбирають 10 ідентичних колоній і проводять реакцію аглютинації на склі з ОК-полівалентною сироваткою. Якщо реакція аглютинації буде позитивною в 5 і більше колоній, дослідження продовжують. Якщо реакція аглютинації буде позитивною в менше, ніж 5 колоніях, випишують негативний результат.

Пересівають колонію на скошений МПА, виділяють чисту культуру мікроорганізмів. Інкубація в термостаті при 37 °С 18–24 год.

3-й день дослідження. Проводять мікроскопію для підтвердження чистоти культури зі скошеного МПА (вологий, блискучий, сіруватий наліт, рідше буває мутним). Якщо під мікроскопом грамнегативні палички, проводять ідентифікацію культури мікроорганізмів. Засівають на середовище Гісса (з лактозою, глюкозою, манітом, сахарозою, мальтозою та ін.) і МПБ для визначення цукролітичних і протеолітичних ферментів. Проводять орієнтовну реакцію аглютинації з ОК-полівалентною сироваткою, груповими та монорецепторними сироватками:

1-й етап: з ОК- полівалентна сироватка «+»;

2-й етап: з ОК 1 групи (ентерити);

ОК 2 групи (дизентерієподібні захворювання) «+»;

ОК 3 групи (холероподібні захворювання);

3-й етап з: O₂₅, O₁₂₄, O₁₄₃«+», O₁₄₄.

Аглютинація з живою культурою має орієнтовне значення, тому проводять розгорнуту реакцію аглютинації з нагрітою та живою культурою (з живою – для визначення К-антигену (володіє пригніченням О-аглютинабельності та є термолабільним – при нагріванні руйнується), з нагрітою – для визначення О-антигену). У скошений агар наливають 3–5 мл стерильного фізрозчину, змивають культуру, змив ділять на 2 частини, одну з яких підігривають на водяній бані 40 хв.

Розгорнуту реакцію аглютинації ставлять у двох рядах пробірок. Сироватку в обох рядах розводять у співвідношенні 1:50–1:100 (у 1-й пробірці) до титру, вказаного на етикетці ампули з сироваткою.

1-й етап: додати в кожен пробірку 1 мл фіз. розчину.

2-й етап: додати в 1-у пробірку 1 мл сироватки 1:50, далі готувати послідовні двократні розведення сироватки (1:100, 1:200, 1:400, 1:800 та ін.), з останньої пробірки 1 мл виливають у дезінфікуючий розчин; КС – пробірка з контролем сироватки: 1 мл фізрозчину + 1 мл сироватки 1:50; КА – пробірка з контролем антигену: 1 мл фізрозчину + 2 краплі антигену.

3-й етап: у всі пробірки, крім контролю сироватки, вноситься по 2 краплі антигену (діагностикуму або суспензії бактерій). У пробірках при цьому повинна з'явитися невелика рівномірна муть. Контроль сироватки залишається прозорим. Пробірки ретельно струшують і ставлять в термостат на 2 год при $t=37^{\circ}\text{C}$, потім залишають при кімнатній температурі на 18–20 год.

Облік результатів починають із контролів. Контроль сироватки повинен залишатися прозорим, контроль антигену – рівномірно мутним. Проглядають неозброєним оком або за допомогою лупи (зручно на темному фоні). При позитивному результаті аглютинат поступово осідає на дно у вигляді «парасольки», а рідина над осадом прояснюється (порівняйте з рівномірно мутним контролем антигену). Для вивчення величини і характеру осаду вміст пробірок трохи струшують. Розрізняють дрібнозернисту і пластівчасту аглютинацію. Дрібнозерниста (О-аглютинація) виходить при роботі з О-сироватками. Пластинчаста (Н) – при взаємодії рухливих мікроорганізмів з джгутиковими Н-сироватками.

4-й день дослідження: облік результатів. Середовище Гісса розщеплюється до кислоти і газу, окрім сахарози, виділяється індол (папірець червоний).

У розгорнутій реакції аглютинації титр нагрітої культури повинен бути вище за титр живої – позитивна реакція, наприклад титр живої культури 1:400, нагрітої – 1:1600. Випикується позитивний результат – виділена ЕПКП О143. Якщо титри співпадають – сумнівна реакція і її треба повторити.

Термінологія: Enterobacteriaceae, Escherichia coli.

Запитання для контролю знань

1. Загальна характеристика родини ентеробактерій. Класифікація.
2. Ешерихії. Морфологія і біологічні властивості. Антигенна структура: О-, К- і Н-антигени. Класифікація. Стійкість до чинників навколишнього середовища.
3. Ешерихії як умовно-патогенні мікроорганізми і санітарно-показникові мікроорганізми. Значення у фізіології людини.
4. Патогенні варіанти ешерихій, значення в патології людини. Особливості імунітету.
5. Правила відбору матеріалу та доставка його в лабораторію для дослідження; підготовка до дослідження, супровідна документація.
6. Методи лабораторної діагностики ешерихіозів. Виділення та ідентифікація ентеропатогенних *E. coli* (ЕПЕС). Серодіагностика колієнтериту.
7. Профілактика та терапія ешерихіозів.

Тестові завдання

1. До інфекційного відділення надійшла хвора дитина з підозрою на колієнтерит. Із випорожнень була виділена кишкова паличка. За допомогою якого дослідження можна встановити належність палички до патогенних варіантів?

А. У реакції аглютинації з сумішшю ОК-сироваток патогенних груп.

В. Провести фаготипування мікроорганізмів.

- С. Приготувати мазок і забарвити за Грамом.*
Д. Визначити рухливість бактерій у темному полі.
Е. Пересіяти колонії на жовтково-сольовий агар.
- 2.** З випорожнень хворої дитини 6-місячного віку, яка перебувала на штучному вигодовуванні, виділена культура кишкової палички з антигенною структурою O55. Яке захворювання можна припустити у цієї дитини?
А. Холероподібне захворювання. *Д. Дизентерієподібне захворювання.*
В. Колієнтерит. *Е. Харчове отруєння.*
С. Гастроєнтерит.
- 3.** Серед групи туристів (27 чоловік), які використовували для питва воду з озера, через два дні у 7 чоловік з'явилися симптоми гострої діареї. Для встановлення етіології цього захворювання у баклабораторію необхідно доставити матеріал для дослідження. Який матеріал необхідно направити в лабораторію для діагностики захворювання?
А. Випорожнення. *Д. Харчові продукти.*
В. Воду, випорожнення хворих. *Е. Мазки із зіву.*
С. Воду, кров хворих.
- 4.** З випорожнень хворого виділена культура збудника, що дає на живильному середовищі ріст, підозрілий для ешерихій. Який з перерахованих нижче результатів дозволив зробити таке припущення?
А. Утворення безбарвних колоній на середовищі Ендо.
В. Утворення колоній червоного кольору з металевим блиском на середовищі Ендо.
С. Утворення безбарвних колоній на середовищі вісмут-сульфіт агар.
Д. Утворення гемолізу на кров'яному агарі.
Е. Утворення ніжної плівки на лужній пептонній воді.
- 5.** До інфекційного відділення надійшла хвора дитина з підозрою на колієнтерит. При постановці реакції аглютинації з нагрітою і живою культурою титр сироватки живої і нагрітої культури склав 1:400. Як ви оціните результати цієї реакції?
А. Різко позитивна. *Д. Негативна.*
В. Позитивна. *Е. –*
С. Сумнівна, необхідно повторити.
- 6.** До інфекційного відділення надійшла хвора дитина з підозрою на колієнтерит. Виділена культура засіяна в МПБ для визначення утворення індолу. Як оцінити результати проби?
А. Індикаторний папірець почервонів. *Д. Розрив середовища.*
В. Індикаторний папірець почорнів. *Е. На поверхні середовища піна.*
С. Бульбашки газу.

Тема: Лабораторна діагностика черевного тифу і паратифів А і В

Кількість годин: 4.

Обґрунтування теми. Найбільш важкими кишковими інфекціями є черевний тиф і паратифи. Найвища захворюваність на черевний тиф у даний час в країнах Латинської Америки (може досягати 70 на 100 тис. населення), Африки, Південно-Східної Азії. В країнах Європи всього 0,3–1,3 на Півдні (Іспанія, Італія, Югославія) – 4–20 на 100 тис. населення. Летальність від них (0,1–1 %) пов'язана із важкими ускладненнями – кишковою кровотечею, перфорацією кишечника, перитонітом.

Черевний тиф і паратифи – гострі інфекційні захворювання, які супроводжуються бактеріємією, ураженням лімфоїдної тканини кишечника, лихоманкою і загальною інтоксикацією.

Бактерії черевного тифу широко розповсюджені у всьому світі й є патогенними тільки для людини. Природним місцем їх існування є організм людини, але їх можна виявити також у місцях, куди потрапляють виділення хворих, бактеріоносців: у воді водоймищ, в стічній воді, у ґрунті, де вони можуть відносно тривало зберігатися.

Мета:

– загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою черевного тифу і паратифів А і В.

– конкретна:

а) знати:

1. правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.

2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.

3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на черевний тиф та паратифи.

4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на черевний тиф та паратифи.

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення сальмонел.

6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення: музейні мікропрепарати, живильні середовища (10 % жовчний бульйон, вісмут-сульфіт агар, середовище Ендо, Ресселя), патогенний матеріал, сироватка, що досліджується, діагностикуми, бланки направлень, бікс, сірники, маркер, штативи, бак. петлі, ріст культури сальмонел на вісмут-сульфіт агарі, середовищах Ендо і Ресселя, мікроскоп, імерсійне масло, предметні скельця, набір для

фарбування за Грамом, аглютинаційні й хімічні пробірки, градуйовані піпетки, груші, чашки Петрі, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

Зміст заняття

Таксономія

Родина: *Enterobacteriaceae*

Рід: *Salmonella*

Вид: *S. enterica*, *S. bongori*

Серовари: *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*.

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Сальмонели, як і всі ентеробактерії, – маленькі палички із заокругленими кінцями, 1–3 мкм завдовжки, 0,5–0,8 мкм завширшки, зазвичай рухливі (перитрихи), не утворюють спору і капсулу, грамнегативні.

Культуральні властивості. Сальмонели – факультативні анаероби. Ростуть за температури від 7 до 45 °С, оптимальною є температура 37 °С, рН 6,8–7,2. Не вибагливі до живильних середовищ, ростуть на МПА і МПБ. Ріст сальмонел пригнічують або обмежують високі концентрації хлориду натрію і цукру.

У лабораторії сальмонели культивують на пластинчастих диференційно-діагностичних середовищах Ендо, ЕМС, Плоскірева, вісмут-сульфіт агарі. На середовищах Ендо, ЕМС, Плоскірева сальмонели утворюють гладкі, блискучі, маленькі напівпрозорі безбарвні (більшість сальмонел не розщеплюють вуглеводи, що входять до складу цих середовищ), ніжні колонії у S-формі. *S. typhi*, яка містить Vi-антиген, утворює мутні колонії. При дисоціації на щільних живильних середовищах S-форма колоній переходить у R-форму (колонії неправильної форми, тьмяні, сухі, каламутні з шорсткою поверхнею і нерівними краями).

У рідкому живильному середовищі S-форма сальмонел спричиняє помутніння, R-форма – осад.

Елективними середовищами для сальмонел є середовища, що містять 10–20 % жовчі.

У зв'язку з тим, що під час первинного посіву патологічного матеріалу від хворого часто відмічається уповільнений ріст культури, використовують середовища накопичення (при посіві крові – жовчний бульйон, або середовище Раппопорт, при посіві матеріалу, який має додаткову флору (фекалії, жовч, сеча) – селенітовий бульйон. Також використовують середовища Кауфмана, Мюллера, магнієве).

Ферментативні властивості. Ферментативні властивості сальмонел різноманітні і варіабельні. Більшість сальмонел розщеплюють вуглеводи (глюкозу, маніт, мальтозу) до кислоти і газу; *S. typhi* розщеплює ці вуглеводи до кислоти без газу; утворюють сірководень (за невеликим винятком, у тому числі й *S. paratyphi A*), не утворюють індол. Відновлюють нітрати до нітритів. Оксидазо-негативні, каталазо-позитивні.

Антигенні властивості. У сальмонел виділяють O-, H- і деякі мають K-антиген. Є декілька класифікацій сальмонел. Найдавнішою є класифі-

кація за Кауфманом-Уайтом. В основі цієї класифікації лежить розподіл сальмонел на серогрупи за спільністю будови О-антигену, а усередині серогрупи на серовари, відповідно до відмінностей у будові Н-антигену. Н-антиген представлений двома фазами: I і II. Перша фаза позначається літерами, її прийнято вважати специфічною, друга фаза – цифрами, її прийнято вважати неспецифічною. За Н-антигеном I фази серогрупи поділяють на серотипи. За Н-антигеном II фази визначають сероваріант.

Виявлено 67 різних О-антигенів, їх позначають арабськими цифрами від 1 до 67. О-антиген неоднорідний, він містить головний компонент і додаткові. За головним компонентом О-антигену всі сальмонели поділено на серологічні групи. Ці серогрупи позначають великими літерами латинського алфавіту (А, В, С, D, Е, F і т. д.) або номерами О-антигену (O51, O54, O66 та ін.). Серогрупи А, В, С, D, Е називають основними, всі інші – рідкісними.

Відповідно до останньої класифікації рід *Salmonella* включає два види *S. enterica*, до якого включені всі сальмонели, які є збудниками людини і теплокровних тварин, і *S. bongori*, який підрозділяється на 10 сероварів і включає сальмонели, ізольовані від холоднокровних тварин.

Вид *S. enterica* розподілений на 6 підвидів, які у свою чергу підрозділені на серовари. Всі серовари виду *enterica* мають назви, які відповідають колишнім видовим назвам, наприклад: *S. typhi* – *S. typhi*.

К-антиген у *S. typhi* представлений VI-антигеном, який може надавати бактерії явища О-інаглютинабельності. Цей антиген є рецептором для бактеріофагів. За спектром чутливості до набору VI-фагів установлюється фаговар *S. typhi*, який є необхідним для епідеміологічного аналізу спалахів черевного тифу з метою визначення джерела інфекції. Розроблена схема фаготипування сальмонел черевного тифу, паратифів А і В і деяких збудників сальмонельозів (*S. Typhimurium*).

Резистентність. Сальмонели стійкі в навколишньому середовищі. У воді відкритих водойм і питній воді вони зберігаються від 11 до 120 днів, у морській воді – від 15 до 27 днів, у ґрунті – від 1 до декількох місяців, у кімнатному пилу – від 80 днів до 18 міс, у яйцях і замороженому м'ясі – до 13 міс, на овочах і фруктах – 5–10 днів. За відповідної температури, рН і вологості сальмонели здатні розмножуватись в окремих об'єктах навколишнього середовища. Нагрівання до 70°C вони витримують протягом 30 хв, температура 100 °С вбиває їх миттєво.

Найбільш стійка *S. Typhimurium*, яка залишається життєздатною на тканинах і на папері до року.

Стійкість до високої температури підвищується у сальмонел, що містяться в харчових продуктах. Якщо шматок м'яса завтовшки 19 см і масою 400 г покласти у холодну воду і довести до кипіння, то сальмонели загинуть через 2,5 год, сальмонели гинуть за той же період варіння і в разі закладання в окріп шматків м'яса завтовшки 5–5,5 см і масою 200 г. У солоному і копченому м'ясі, яке містить 12–20 % кухонної солі,

сальмонели виживають до 1,5–2 міс. Звичайні хімічні дезінфектанти діють згубно протягом 10–15 хв. Вміст активного хлору у водопровідній воді у дозі 0,5–1 мг/дм³ або озонування води забезпечує її надійне знезараження від усіх ентеробактерій, у тому числі й сальмонел.

Фактори патогенності

- фактори адгезії і колонізації – фімбрії, білки поверхневої мембрани, ліпополісахарид;
- фактори інвазії – гіалуронідаза, лецитиназа, фібринолізин;
- Vi-антиген – основний фактор патогенності *S. typhi*, пригнічує фагоцитоз;
- ендотоксин – ліпополісахарид клітинної стінки;
- ентеротоксини (термостабільний і термолабільний) – спричиняють діарею, що пов'язано з порушенням функції аденілат-циклази ентероцитів;
- цитотоксин – пригнічує синтез білка у ентероцитів, що призводить до їх загибелі.

Епідеміологія. Нині відомо більше 2 300 серологічних варіантів сальмонел, їх кількість постійно поповнюється; кожного року в середньому додається 50 нових сероваріантів.

Сальмонели характеризуються поліпатогенністю; вони спричиняють захворювання людей, різних тварин і птахів. Винятком є *S. typhi*, *S. paratyphi A*, які є патогенними тільки для людей, тобто монопатогенними. *S. paratyphi B* і *S. paratyphi C* переважно патогенна для людей, але здатна зумовлювати епізоотії серед молодняка великої рогатої худоби і курчат.

Джерелом інфекції при черевному тифі є хворі люди і бактеріоносії, які виділяють збудник у навколишнє середовище з фекаліями, сечею, слиною. Головну роль як джерела інфекції виконують бактеріоносії. Джерелом паратифу В можуть бути тварини і птахи. Основним механізмом передачі – фекально-оральний. Основним фактором передачі є вода (водні епідемії), але інфекція може передаватись через забруднені руки, харчові продукти (особливо молоко, молочні продукти), посуд. Значну роль у поширенні інфекції відіграють мухи.

Доза, яка заражає – приблизно 100 клітин.

Захворювання реєструється повсюдно. Хворіє населення будь-якого віку.

Патогенез і клінічна картина. Патогенез і клінічні картини черевного тифу і паратифів А, В, С дуже схожі між собою. Інкубаційний період триває від 7 до 25 днів, у середньому – 15 днів. Тривалість інкубаційного періоду залежить від дози зараження, вірулентності збудника, а також імунного статусу хворого.

Збудник потрапляє через рот і проникає в тонкий кишечник, де уражає лімфоїдну тканину кишкової стінки (пейерові пляшки і солітарні фолікули). Розмножуючись, вони спричиняють лімфаденіт (запалення лімфатичних вузлів) і лімфангоїт (запалення лімфатичних судин). Із лімфоїдної тканини збудник проникає в кров – розвивається бактеріємія (генералізація процесу). У разі відсутності ефективного лікування бактеріємія може бути впродовж

всієї хвороби (Vi-антиген пригнічує дію сироваткових і фагоцитарних бактерицидних факторів). Унаслідок загибелі бактерій і вивільнення ендотоксину розвивається інтоксикація. Із крові збудник проникає у всі органи і тканини, осідаючи в ретикулоендотеліальних елементах паренхіматозних органів: печінці, селезінці, легенях, а також в кістковому мозку, де розмножуються в макрофагах, а також у жовчному міхурі. Особливо у великій кількості збудник накопичується у жовчному міхурі та жовчних протоках печінки, де є сприятливі умови для його розмноження (жовч і ослаблені бактерицидні властивості крові). Із жовчного міхура сальмонели знову надходять у тонку кишку, звідки деякі з них виділяються з випорожненнями, а деякі повторно проникають в уже сенсibiliзовані лімфатичні вузли. У цей період організм звільнюється від збудника не тільки через кишечник, а й через слинні, потові, грудні (у період лактації) залози, сечовидільну систему. Вторинне ураження лімфатичних вузлів призводить до утворення некрозу, струпів, а в разі їх відділення – до виразок. Утворені виразки загоюються. Однак залежно від ступеня ураження може розвинути кишкова кровотеча або перфорація (прорив) кишкової стінки, що призводить до перитоніту (запалення очеревини).

Початкова стадія захворювання (1-й тиждень) характеризується поступовим підвищенням температури тіла до 39–41 °С, наростанням інтоксикації, на 3–5-у добу збільшується печінка, селезінка. Протягом 2–3 тиж утримується висока температура тіла. Внаслідок пригнічення ендотоксином діяльності ЦНС розвивається запаморочення (звідси термін "тиф" – від грец. *typhos* – туман). Дія ендотоксину може призвести до міокардиту, інфекційно-токсичного шоку. Проникнення збудника у внутрішні органи призводить до виникнення в них запалення, абсцесів (пієлонефрит, холецистит, ентерит), як наслідок місцевих запальних процесів алергічної природи на шкірі живота, спини, грудної клітки з'являється розеольозний висип. На 4-й тиждень спостерігається поступове зниження температури, ослаблення проявів інших симптомів, настає одужання. Клінічне одужання не завжди збігається з бактеріологічним. Близько 5 % перехворілих стають хронічними носіями (більше 3 міс, а інколи на багато років). У формуванні носійства значну роль відіграють місцеві запальні процеси у жовчовивідних (інколи у сечовивідних) шляхах, наявність імунодефіциту, а також перетворення збудника на L-форму. Останні втрачають H-, O- і Vi-антигени, проникають всередину клітин (всередину макрофагів кісткового мозку), де стають недосяжними ні для антибактеріальних препаратів, ні для антитіл і можуть тривалий час персистувати в організмі перехворілого. З часом відбувається реверсія збудника у нормальну форму, відновлюється його вірулентність. Збудник знову проникає у жовчні протоки, спричинює загострення процесу, виділяється з випорожненнями, і такий носій стає джерелом інфекції.

Паратиф С як самостійне захворювання зустрічається рідко, звичайно у пацієнтів з імунодефіцитами. Характерні симптоми інтоксикації, міалгії, жовтушність шкіри, лихоманка.

Імунітет. Постінфекційний імунітет тривалий, стійкий, повторне зараження черевним тифом і паратифами буває рідко. Імунітет зумовлений клітинними факторами – посилюється активність фагоцитів, накопичуються клітини імунної пам'яті, гуморальними – накопичуються О-, Н- і Vi-антитіла. Першими до кінця 1-го тижня захворювання з'являються антитіла до О-антигену, які досягають максимальних титрів до розпаду захворювання, а далі зникають. Антитіла до Н-антигену з'являються в період реконвалесценції і у щеплених та тривало зберігаються. У бактеріоносіїв черевного тифу виявляються антитіла до Vi-антигену. Виникнення бактеріоносійства пов'язано з функціональною недостатністю макрофагів.

Мікробіологічна діагностика. Основним методом лабораторної діагностики черевного тифу є бактеріологічний. З перших днів захворювання, коли збудник циркулює в крові, на дослідження беруть кров на гемокультуру. Крім того, збудник можна висіяти з кісткового мозку – мієлокультура і ексудату розеол – роzeолокультура.

Бактеріологічне дослідження калу – копрокультура (від лат. *copros* – кал), сечі – уринокультура, жовчі – білікультура проводять не тільки для підтвердження діагнозу починаючи з кінця 2-го тижня захворювання, а й для контролю бактеріологічного одужання перед виписуванням реконвалесцентів із лікарні, а також для діагностики бактеріоносійства.

Для прискореної ідентифікації *S. typhi* використовують метод ДНК-зондів (як зонд використовують фрагмент ДНК, який містить ген Vi-антигену). Термін ідентифікації Vi-антигенів цим методом – 3–4 год.

Серологічне дослідження крові проводиться з кінця 1-го тижня захворювання, коли в сироватці крові накопичуються антитіла, які можна виявити в розгорнутій реакції аглютинації, запропонованій у 1896 р. Ф. Відалем, тому цю реакцію називають реакцією Відаля, а також в реакції непрямой гемаглютинації (з О-, Н- і Vi-діагностикумами), імуноферментного аналізу.

В реакції Відаля враховують динаміку утворення антитіл: раніше утворюються О-антитіла, але їх титр швидко знижується після одужання; Н-антитіла накопичуються пізніше і зберігаються після одужання або після щеплення роками.

Для діагностики бактеріоносійства користуються бактеріологічним методом – виділяють культуру збудника з калу, сечі або дуоденального вмісту. Проте у носіїв збудник виявляється не постійно. Тому для виявлення носіїв переважно використовують серологічний метод – реакцію непрямой Vi-гемаглютинації (РНГА). Для виявлення носіїв як допоміжний використовують алергічний метод. Для цього ставлять шкірну пробу з Vi-тифіном (Vi-антигеном). Утворений імунний комплекс Vi-антиген – Vi-антитіло через 20–30 хв спричинює місцеву алергічну реакцію у вигляді набряку і гіперемії. Позитивна реакція вказує на наявність в організмі Vi-антитіл і можливу наявність *S. typhi*.

Для виявлення L-форми *S. typhi* використовують пряму реакцію імунофлюоресценції, у якій застосовують люмінесцентну сироватку проти L-форм *S. typhi*.

Профілактика. Розроблено три типи вакцин – убита (ефективність 50–70 %), жива атенуйована (зі штаму Ту 21а), яка зумовлює більший захисний ефект, але дає побічні ефекти, і вакцина з Vi-Ag *S. typhi*.

Для профілактики черевного тифу в дорослих і дітей віком старше 5 років використовують черевнотифозну вакцину, що містить очищений Vi-полісахарид *S. typhi* (Тифім Ві, Франція). Оскільки черевний тиф зумовлює переважно спорадичні спалахи, вакцинацію проводять за епідеміологічними показаннями, медичному персоналу, військовослужбовцям, а також особам, які від'їжджають в епідемічні райони. Імунітет зберігається 3 роки. В осередках спалахів хвороби особам, що перебували у контакті з хворим, призначають черевнотифозний бактеріофаг.

Лікування. Для лікування черевного тифу використовують антибіотики: левоміцетин, ампіцилін, гентаміцин, бактрим, фторхінолони.

Практичні навички з теми.

1. Виготовлення живильних середовищ для культивування сальмонел (10% жовчний бульйон, вісмут-сульфіт агар, середовище Ендо, Ресселя).
2. Проведення первинного посіву патологічного матеріалу (кров і випорожнення) на середовища вісмут-сульфіт агару та 10 % жовчний бульйон.
3. Визначення характеру росту сальмонел на вісмут-сульфіт агарі.
4. Відбір чорних колоній на вісмут-сульфіт агарі для виділення «чистої» культури, пересів на середовище Ресселя.
5. Проведення мікроскопії з середовища Ресселя для визначення чистоти культури, визначення морфотинкторіальних властивостей сальмонел у препараті.
6. Приготування середовища Гісса і проведення посіву для вивчення ферментативних властивостей.
7. Проведення посіву на МПБ для визначення протеолітичних ферментів.
8. Постановка розгорнутої реакції аглютинації за Відалем з O- і H-діагностикумами) з метою діагностики черевного тифу і паратифів А і В.

Алгоритми лабораторної роботи

Алгоритм: "Правила забору матеріалу при підозри на черевний тиф, паратифи А, В, С".

Матеріал для дослідження: кров у перший тиждень захворювання; випорожнення, сеча, дуоденальний вміст на 2–3-й тиждень, кістковий мозок, роzeоли, вміст жовчного міхура, спинномозкова рідина, секційний матеріал.

Кров: беруть з вени на підвищенні температури тіла хворого.

Випорожнення від хворих і реконвалесцентів збирають без попереднього вживання проносного. Забір матеріалу у хворих проводять наприкінці 2-го – на початку 3-го тижня захворювання. Посуд для забору і доставки

досліджуваного матеріалу не слід обробляти дезінфікуючими засобами. Проби відбирають у кількості 3–5 г. Якщо не можливо швидко доставити матеріал до лабораторії, його поміщають у консервант у співвідношенні 1:3. Як консервант використовують 30 % стерильний розчин гліцерину у фізіологічному розчині.

Сечу для посіву беруть у стерильний посуд після омивання зовнішнього отвору сечовивідного каналу стерильним фізіологічним розчином, краще сечу брати за допомогою катетера.

Жовч: беруть порції В та С (5–10 мл).

Взяття зскрібка з розеол: шкіру над розеолою протирають тампоном, змоченим спиртом і стерильним сухим тампоном, після чого легенько скарифікують. Це місце протирають стерильним ватяним тампоном, змоченим бульйоном або фізіологічним розчином, і проводять посів.

Для дослідження секційного матеріалу під час розтину беруть шматочки паренхіматозних органів (печінка, селезінка, нирки), відрізки тонкого кишечника зі вмістом, кров з серця, мезентеріальних лімфатичних вузлів, кістковий мозок. У лабораторії шматочки органів розтирають у ступці зі стерильним піском, переводять у рідку фазу і проводять посів.

Алгоритм: *"Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на черевний тиф і паратифи"*.

Дослідження гемокультури. Кров засівають у співвідношенні 1:10. Крім того, чим більшу кількість крові використовують для посіву, тим вище процент позитивних висівів. На першому тижні хвороби рекомендують брати для посіву не менше 10 мл крові, а в більш пізні періоди хвороби – 15–20 мл. Таку кількість крові слід сіяти в 100–200 мл живильного середовища. Кров засівають у 10 % жовчний бульйон або в середовище Раппопорт (10 % жовчний бульйон + 1 % глюкоза). Середовища з жовчю є елективними для збудників тифо-паратифозних захворювань. Інші бактерії на таких середовищах зовсім не ростуть або їх ріст затриманий. Жовч перешкоджає згортанню крові, нейтралізує нормальні антитіла сироватки, руйнує комплемент і знижує бактерицидні властивості крові при збереженні її живильних властивостей, а також перешкоджає дії бактеріофага. Якщо неможливо провести посів крові на місці сироватку разом зі згустком пересилають до лабораторії, де згусток розтирають стерильною склянкою паличкою і засівають на живильне середовище. Посіви інкубують при температурі 37 °С протягом 10 діб. При черевному тифі середовище має червоний колір внаслідок ферментації глюкози, при паратифі А і В додатково виявляють газоутворення. З середовища готують мазки, забарвлюють за Грамом і проводять мікроскопію. Якщо культура однорідна, проводять орієнтовну реакцію аглютинації на склі з сальмонельозними груповими або монорецепторними аглютинуючими сироватками, далі проводять висів на чашку з диференційним середовищем Ендо, ВСА. За відсутності росту на сере-

довищі Раппопорт через 24 год посіви крові далі інкубують, щодня переглядають і пересівають на 3-, 4-, 6-, 9-й день на щільне середовище.

На 3-й день вивчають характер росту на середовищі Ендо, виявляють підозрілі колонії (напівпрозорі, безкольорові або блідо-рожеві), на ВСА (колонії червоного тифу чорного кольору, тому що сальмонели виділяють сірководень, а в середовищі є солі заліза, під дією сірководню солі перетворюються на сірчане залізо). При знятті колоній залишається слід. Колонії паратифу А зеленого кольору, оскільки не виділяють H_2S ; колонії паратифу В чорного кольору зі слизовим валом. Готують мазки, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію. За наявності грамнегативних паличок проводять пересів на середовище Ресселя (посів проводять штрихами по скошеній поверхні й уколom в агаровий стовпчик, середовище містить глюкозу, лактозу, іноді сечовину й індикатор) або Олькеницького і Гісса. Інкубують при $37^\circ C$ 18–24 год.

На 4-й день відмічають результати посіву, ураховують біохімічні властивості виділеної культури. В середовищі Ресселя розщеплювання глюкози відбувається тільки в умовах анаеробіозу, тому скошена поверхня середовища при розщеплюванні глюкози не змінюється, а стовпчик забарвлюється в колір, що відповідає індикатору і утворюються бульбашки газу (паратифи А і В). Якщо виділені культури зброджують лактозу або розщеплюють сечовину, міняючи колір усього середовища, то вони не є сальмонелами і можна дати негативну відповідь.

Культуру, що розщеплює тільки глюкозу, піддають подальшому вивченню: готують мазки, забарвлюють за Грамом і проводять мікроскопію. Проводять посів на середовища Гісса і МПБ для виявлення ферментативних властивостей.

Далі проводять розгорнуту реакцію аглютинації.

На 5-й день проводять облік біохімічної активності за результатами ферментації вуглеводних та інших середовищ: при черевному тифі не розщеплюється лактоза і сахароза, утворюється індол, сірководень "+/-"; при паратифі А і В – не розщеплюється лактоза і сахароза, при паратифі А – не утворюється індол і сірководень, а при паратифі В – індол утворюється, але не утворюється сірководень.

Після визначення морфологічних, культуральних і ферментативних властивостей виділеної культури, необхідно провести аналіз антигенної структури. Проводять реакцію аглютинації з полівалентними, груповими і видовими сироватками за таблицею Кауфмана-Уайта. Серологічну ідентифікацію сальмонел починають з реакції аглютинації на склі з полівалентною О-сироваткою ABCDE. Позитивний результат говорить про належність до роду сальмонел, за відсутності аглютинації виділену культуру випробовують з полівалентною О-сироваткою до рідкісних груп сальмонел. При позитивній реакції культуру випробовують з кожною О-сироваткою,

яка входить до складу полівалентної, для визначення серогрупи (гр. А-О₂, гр. В-О₄, гр. С-О₆, гр. D-О₉, гр. Е-О₃ або О₁₀). Після встановлення належності культури до О-групи, визначають її Н-антигени з сироватками першої, а потім другої фази.

Ураховують результати розгорнутої реакції аглютинації. При позитивному результаті роблять остаточні висновки про видову належність виділеної культури. Слід зазначити, що з крові часто висівають черевнотифозну культуру, яка має Vi-антиген (V-форма), що не аглютинується О-сироваткою. Тому, якщо виділений штам не аглютинується або аглютинується не до діагностичного титру, то слід поставити реакцію аглютинації на склі з Vi-сироваткою.

Збудники черевного тифу, що містять, Vi-антиген, випробовують Vi-фагами (нині є набір типових черевнотифозних Vi-бактеріофагів, який складається з 96 специфічних Vi-бактеріофагів). Визначення фаготипу має велике епідеміологічне значення (для виявлення джерела інфекції).

Дослідження копрокультури. Дослідження проводять як із діагностичною метою, так і при обстеженні реконвалесцентів, а також здорових людей, які поступають на роботу або вже працюють на підприємствах харчування і водопостачання. В лабораторії випорожнення засівають на щільні диференційно-діагностичні середовища (вісмут-сульфіт агар, середовище Плоскірева, Ендо) і одночасно середовища збагачення (селенітовий бульйон (1:5), середовище Мюллера або Кауфмана). Заздалегідь готують емульсію. Посіви залишають у термостаті при температурі 37 °С на 18–24 год. Далі проводять пересів на ВСА (Ендо) (дослідження *див. вище*).

Дослідження уринокультури. Виділення уринокультури у хворих спостерігається на 2–3-му тижні, продовжується в період реконвалесценції.

У лабораторії сечу (30–50 мл) центрифугують при 3 тис. оборотів протягом години, і осад засівають на середовище збагачення (селенітове, Мюллера, Кауфмана) і на 1–2 чашки з щільним диференційним середовищем (Плоскірева, Ендо, вісмут-сульфіт агар). Подальший хід дослідження, як і при посіві випорожнень.

Дослідження білікультури. Може бути проведено у хворого в період реконвалесценції з метою виключення бактеріоносійства та у здорових людей – для виявлення хронічних бактеріоносіїв. Жовч засівають у флакон з 10 % жовчним бульйоном у співвідношенні 1:10, або МПБ. Посіви інкубують при 37 °С 18–24 год. Дослідження проводять 7 днів зі щоденним пересівом на ВСА (дослідження *див. вище*). Негативний результат видається на 8-й день дослідження.

Дослідження вмісту розеол. Тампон із патогенним матеріалом (вміст розеол) опускають у пробірку з жовчним або селенітовим бульйоном. Посіви інкубують при 37 °С протягом 18–20–48 год.

Дослідження спинномозкової рідини проводиться в тяжких випадках захворювання, які супроводжуються менінгеальними явищами. Отриману

під час пункції рідину збирають у стерильну пробірку і доставляють до лабораторії, засівають у жовчний бульйон та інкубують при 37 °С протягом 18–20–48 год.

Дослідження секційного матеріалу. Проводять для уточнення діагнозу або ретроспективної діагностики. Дослідження проводять як випорожнення.

Об'ємна реакція аглютинації за типом Відаля. Використовують сироватку хворого, взяту з 8–10-го дня захворювання. Окрім діагностики гострого захворювання, за допомогою реакції Відаля можна розпізнати і тих, хто раніше хворів на черевний тиф або паратиф, що має важливе епідеміологічне значення. На час появи аглютининів, висоту їх титрів і тривалість збереження впливає стан реактивності організму. В ослабленому організмі зі зниженою реактивністю антитіла продукуються слабо і повільно. Таким чином, негативний результат реакції аглютинації не дозволяє виключити захворювання. Позитивним результатом у нещеплених людей вважають титр аглютинації не нижче 1:100. Сироватку хворого титрують у співвідношенні 1:100–1:3200. Беруть 6 рядів пробірок, використовуючи діагностикуми:

- 1 ряд: О-діагностикум черевнотифозний
- 2 ряд: Н-діагностикум черевнотифозний
- 3 ряд: О-діагностикум паратифозний А
- 4 ряд: Н-діагностикум паратифозний А
- 5 ряд: О-діагностикум паратифозний В
- 6 ряд: Н-діагностикум паратифозний В

Пробірки інкубують при 37 °С. Результати оцінюють загальноприйнятним для реакції аглютинації методом. Реакцію Відаля ставлять з парними сироватками. За останні роки реакцію використовують обмежено.

Термінологія: *Enterobacteriaceae, Salmonella typhi, Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B.*

Запитання для контролю знань

1. Морфологія і біологічні властивості сальмонел. Антигенна структура: О-, Н-, Vi-антигени. Міжнародна класифікація. Стійкість до чинників навколишнього середовища.

2. Основи патогенезу тифо-паратифозних захворювань. Характеристика імунітету.

3. Правила взяття матеріалу для дослідження на різних стадіях хвороби, доставка його до лабораторії; супровідна документація. Методи лабораторної діагностики: виділення гемо-, урино-, копро- та білків культури збудника.

4. Серологічна діагностика тифо-паратифозних захворювань. Обстеження на носійство. Експрес-діагностика.

5. Методи профілактики та принципи лікування тифо-паратифозних інфекцій.

Тестові завдання

1. До інфекційного відділення надійшла дитина з підозрою на черевний тиф. Необхідно вибрати елективне середовище для первинного посіву патогенного матеріалу:
A. Кров'яно-телуристовий агар. D. Сироватковий агар.
B. Лужний агар. E. Середовище з 10–20 % жовчю.
C. Середовище Кітта-Тароци.
2. З крові хворого виділена культура збудника черевного тифу. Які культуральні властивості характерні для цього збудника?
A. Колонії червоного кольору з металевим блиском на середовищі Ендо.
B. Безбарвні колонії на вісмут-сульфіт агарі.
C. Гемоліз на кров'яному агарі.
D. Безбарвні колонії на середовищі Ендо і Плоскірева.
E. Ніжна плівка на лужній пептонній воді.
3. До лікаря-інфекціоніста звернувся чоловік зі скаргами на лихоманку, яка триває три дні, загальну слабкість, безсоння, погіршення апетиту. При огляді відзначається блідість шкірних покривів, обкладений білим нальотом язик. Лікар запідозрив черевний тиф. Який метод лабораторної діагностики слід провести для підтвердження діагнозу?
A. Виділення гемокультури. D. Виділення білікультури.
B. Виділення копрокультури. E. Виділення мієлокультури.
C. Виділення уринокультури..
4. При постановці реакції аглютинації Відаля в сироватці пацієнта виявлені титри антитіл до О-антигену *S. paratyphi* В 1:400, Н-антигену *S. typhi* і *S. paratyphi* В 1:50. Як можна трактувати отримані результати?
A. Хворіє на черевний тиф. D. Хворіє на паратиф А.
B. Реконвалесцент черевного тифу. E. Хворіє на паратиф В.
C. Реконвалесцент паратифу А.
5. При розслідуванні спалаху черевного тифу в селищі Н. були виділені штами черевнотифозних бактерій від хворих, з молочних продуктів і від продавця молочного магазину – хронічного носія. Для встановлення джерела інфекції було проведено фаготипування:
A. Усіх штамів черевнотифозних бактерій.
B. Штамів черевнотифозних бактерій, виділених від хворих.
C. Штамів черевнотифозних бактерій, виділених з молока.
D. Штамів черевнотифозних бактерій, виділених від хронічного носія.
E. Штамів черевнотифозних бактерій, виділених від людей.
6. При профілактичному обстеженні на черевний тиф у сироватці крові виявлені О-, Н - і Vi антитіла. Про що говорять результати дослідження?
A. Бактеріоносій. D. Реконвалесцент.
B. Початок захворювання. E. Необхідно повторити дослідження.
C. Розпал захворювання.

Тема: Лабораторна діагностика сальмонельозу

Кількість годин: 4.

Обґрунтування теми. Одне з основних місць в етіологічній структурі діарейних захворювань посідає сальмонельоз.

Сальмонельоз – група поліетіологічних гострих кишкових зоонозних інфекцій, обумовлена сероварами сальмонел, яка характеризується переважним ураженням шлунково-кишкового тракту і протікає частіше у вигляді локальної форми інфекції, у формі гастроентериту, рідше – генералізованих форм: тифоподібної або септико-піемічної.

Ситуація щодо захворюваності на сальмонельоз у більшості економічно розвинутих країн і в Україні визначається як несприятлива і має тенденцію до погіршення. Згідно з епідпрогнозом ВООЗ передбачається вірогідний ріст захворюваності на сальмонельоз протягом найближчих 20 років у всіх країнах світу. Виникнення сальмонельозу пов'язане з вживанням харчових продуктів, забруднених сальмонелою, а також із госпітальною інфекцією, частіше серед дітей до 2 років.

Найчастіше сальмонельоз на Україні викликають *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. anatum*, *S. choleraesuis*, *S. newport*, *S. haifa*, *S. arizona*, *S. kentuki*.

Природний резервуар більшості збудників – людина і різні тварини (включаючи плазунів, земноводних, риб і птахів). Основні шляхи передачі – водний і харчовий, рідше – контактний.

В останні 10 років в Україні частіше джерелом сальмонельозу бувають кури, індики, качки, гуси, свині, у яких може бути носійство або хвороба.

Мета:

– загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою сальмонельозів.

– конкретна:

а) знати правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.

2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.

3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на сальмонельоз.

4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на сальмонельоз.

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення сальмонел.

6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення: музейні мікропрепарати, живильні середовища (10 % жовчний бульйон, вісмут-сульфіт агар, середовище

Ендо, Ресселя), патогенний матеріал, імунні сироватки, бланки направлень, бікс, сірники, маркер, штативи, бак. петлі, ріст культури сальмонел на вісмут-сульфіт агарі, середовищі Ендо, Ресселя, мікроскоп, імерсійне масло, предметні скельця, набір для фарбування за Грамом, хімічні пробірки, градуйовані піпетки, груші, чашки Петрі, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

Зміст заняття

Таксономія

Родина: *Enterobacteriaceae*

Рід: *Salmonella*

Вид: *S. enterica*

Серовари: *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. enteritidis*,
S. derby, *S. choleraesuis*, *S. dublin*.

Збудниками сальмонельозу є велика група сальмонел, яка відповідно до сучасної класифікації входить до підвиду *enterica*, які спричиняють захворювання як у тварин так і у людей.

Морфологічні та тинкторіальні, культуральні, ферментативні, антигенні властивості, резистентність, фактори патогенності сальмонел описані вище.

Епідеміологія. Основними збудниками харчових токсикоінфекцій є сальмонели. Спалахи токсикоінфекцій найчастіше пов'язані зі вживанням інфікованого м'яса – 70–75 %, у тому числі м'яса вимушеного забою худоби, в 10 % випадків – зі вживанням яєць і м'яса птиці, а також молока, в 3–5 % випадків – з вживанням рибопродуктів, моллюсків, черепах. Незважаючи на величезну кількість сероваріантів сальмонел (більше 2300) у 98 % випадків захворювання спричиняють сальмонели основних груп А, В, С, D, E, а серед них – *S. enteritidis*, *S. typhimurium* (70–80 % випадків), *S. choleraesuis*, *S. dublin*.

Сальмонельоз у тварин протікає як у формі клінічно вираженої системної інфекції, так і у формі бактеріоносійства. Тварини виділяють збудника з сечею, випорожненнями, слиною і молоком. Резервуаром сальмонел є також водоплавні птахи і кури, в яких відбувається трансваріальна передача збудника. Основні фактори передачі – м'ясо, молоко, яйця, субпродукти, особливо печінка великої рогатої худоби і свиней, а також вода.

Іншим джерелом сальмонельозу є люди – хворі й носії. Особливо небезпечні як джерело інфекції носії і хворі, що працюють на підприємствах харчової промисловості. Зараження може відбуватися як аліментарним (харчовим), так і водним та контактено-побутовим шляхами.

Особливістю епідеміології сальмонельозу останніх років є те, що як джерело інфекції основну роль відіграє птиця, підвищується етіологічна роль *S. enteritidis*, збільшується кількість групових захворювань серед дітей віком до 14 років (понад 60 % всіх випадків захворювань), а також частіше рееструються внутрішньолікарняні спалахи сальмонельозів.

Природна сприйнятливість людей до сальмонел висока.

Хворий на сальмонельоз виділяє сальмонели в період від 3 днів до 3 тиж, інколи до року.

Патогенез і клінічна картина. Захворювання частіше протікає в локальній формі гастроентериту, провідним синдромом якого є діарейний. Інвазувавши слизову тонкого кишечника і проникаючи в підслизову, сальмонели частково захоплюються макрофагами, переносяться ними в пейєрові бляшки, де розмножуються в макрофагах, формують первинне вогнище інфекції. Частково розмножуються в підслизовій, виділяють ендотоксин і білковий ентеротоксин. Ентеротоксин обумовлює діарею, блювання, що призводить до зневоднення організму.

При порушенні бар'єрної функції лімфатичного апарату кишечника відбувається генералізація процесу і виникає бактеріємія, в результаті якої сальмонели заносяться в різноманітні внутрішні органи і кістковий мозок, формуючи вторинні гнійні вогнища (септико-піємічна форма). Патогенез тифоподібної форми аналогічний патогенезу черевного тифу і паратифів.

Інкубаційний період триває від 2–6 год до 2–3 діб, у середньому 7–29 год. Початок захворювання зазвичай гострий: підвищення температури тіла, озноб, багаторазове блювання, часті (10–15 разів на добу), водянисті, смердючі, часто мають вигляд болотної твані, випорожнення з домішками слизу або без них, помірний (не різкий) біль у животі; сильна інтоксикація (загальна слабкість, головний біль, зниження апетиту). Захворювання найчастіше закінчується одужанням через 3–7 днів. При генералізованій формі температура тіла досягає 38–39 °С, у хворого відмічають в'ялість, адинамію, безсоння, головний біль, збільшення печінки і селезінки, блідість шкіри обличчя, появу розеолезного висипу на шкірі грудної клітки і живота. Захворювання триває 10–14 діб. В 0,6–1 % випадків розвивається сальмонельозна септикопіємія, яка характеризується тривалою, хвилеподібною лихоманкою, головним болем, ознобом, міалгією (м'язовим болем), тахікардією (підвищенням частоти пульсу), збільшенням печінки і селезінки, а також нервовим збудженням, маренням. Захворювання має затяжний хронічний перебіг. У різних органах і тканинах формуються обмежені гнійники.

Особливо тяжкий перебіг сальмонельозу в дітей раннього віку та людей похилого віку. У дітей відмічається короткий інкубаційний період, спостерігаються катаральні прояви, екзантеми (плямистий висип), збільшення печінки і селезінки. Захворювання має затяжний характер, одужання настає повільніше, ніж у дорослих.

Імунітет. Постінфекційний імунітет ненапружений, сероваро-специфічний, опосередкований секреторним IgA, який запобігає процесу генерації сальмонелами слизової тонкого кишечника. В крові можуть визначитися антитіла, які свідчать про інфекційний процес.

Мікробіологічна діагностика. Матеріал для дослідження: випорожнення, блювотні маси, промивні води шлунка, кров, сеча; за спеціальними

показаннями – жовч, спинномозкова рідина, секційний матеріал. Додаткові об'єкти дослідження – залишки їжі, яку вживали хворі, початкові продукти; змиви з різноманітного обладнання та інших предметів, які могли вплинути на якість фактора передачі збудника.

Оптимальними строками для проведення бактеріологічних досліджень при гастроінтестинальних формах сальмонельозів є перші дні захворювання, при генералізованих формах кінець 2-ого – початок 3-ого тижня .

Мікробіологічна діагностика проводиться бактеріологічним і серологічним методами.

Основним методом діагностики є бактеріологічний. Його проводять аналогічно методу дослідження на виявлення збудників черевного тифу і паратифів А і В.

Оптимальним строком для проведення бактеріологічних досліджень при гастроінтестинальних формах сальмонельозів вважають перші дні захворювання, при генералізованих формах – кінець 2-го і початок 3-го тижня. При вивченні різноманітних матеріалів (випорожнення, кров, сеча, жовч та ін.) отримання позитивних результатів найбільш ймовірно при дослідженні випорожнень.

Профілактика. Для профілактики сальмонельозів проводять ветеринарно-санітарні, санітарно-гігієнічні та протиепідемічні заходи. Специфічна профілактика серед людей не проводиться.

Лікування спрямоване на дезінтоксикацію і відновлення водно-солевого обміну, також використовують антибактеріальні препарати.

Внутрішньолікарняний (нозокоміальний) сальмонельоз

Збудником внутрішньолікарняної сальмонельозної інфекції найчастіше є *S. typhimurim*. Відзначаються також "шпитальні" спалахи, викликані *S. enteritidis*, *S. virchow*, *S. infants*, *S. haife* та ін. Хоча морфологічні й культуральні властивості цих збудників не відрізняються від властивостей інших сальмонел, є деякі біологічні особливості, характерні для них. Так, наприклад, збудники внутрішньолікарняних інфекцій відносяться до певних біоварів, відсутнє типування типовими бактеріофагами, вони більше патогенні для білих мишей та ін.

Джерела інфекції. Частіше бактеріоносій, рідше – хворий.

Шляхи передачі. Переважає непрямий контакт (іграшки, білизна, предмети догляду за хворим). Рідше – повітряно-пиловий і харчовий шляхи передачі. Доза, що заражає – від 1 до 10 тис. клітин.

Патогенез і клінічна картина. Захворювання розвивається на тлі ослаблення організму і зниження його імунної активності. Збудник потрапляє до організму перорально або через дихальні шляхи, що і визначає розвиток патологічного процесу: розлад функції шлунково-кишкового тракту зневодненням або ураження органів дихання, бактеріємія, септичні ускладнення. Захворюють у першу чергу діти раннього віку, особливо

новонароджені, а також дорослі, пацієнти хірургічних і реанімаційних відділень, які перенесли великі оперативні втручання, люди похилого і старечого віку, хворі з важкою соматичною патологією.

Патогенез уражень нерідко пов'язаний із попередніми медичними маніпуляціями (фіброезофагогастродуоденоскопія та ін.).

Для внутрішньолікарняних інфекцій характерний тривалий інкубаційний період від 8 до 43 діб. Прояви хвороби варіюють від безсимптомного носійства до виражених кишкових розладів з розвитком генералізованих форм інфекції з септичними ускладненнями.

Імунітет. Формується тільки відносно одного серовару сальмонел.

Профілактика. Суворе дотримання санітарно-гігієнічного режиму в лікувальних установах. Застосовується полівалентний бактеріофаг.

Специфічна профілактика. При виникненні внутрішньолікарняної сальмонельозної інфекції дітям, що контактували з хворим, слід давати сальмонельозний полівалентний бактеріофаг.

Лікування. Застосовується етіотропна антибіотикотерапія, симптоматична терапія.

Мікробіологічна діагностика сальмонельозної інфекції: ідентифікація сальмонел заснована на вивченні ферментативних властивостей і виявлення сальмонел за двома основними антигенами.

Мета дослідження: виділення збудників захворювання і визначення серовару сальмонел.

Матеріал для дослідження: кров, випорожнення, сеча, дуоденальний вміст, секційний матеріал. Залежно від стадії хвороби досліджують різний матеріал. Бактерії виділяють зі змивів з різноманітних предметів обладнання, вентиляційних решток і з повітря палат.

Методи дослідження:

- ✓ бактеріоскопічний;
- ✓ бактеріологічний – основний метод;
- ✓ серологічний – РПГА, ІФА;
- ✓ молекулярно-генетичний – метод ДНК-зондів.

Практичні навички з теми

1. Виготовлення живильних середовищ для культивування сальмонел (10 % жовчний бульйон, вісмут-сульфіт агар, середовище Ендо, Ресселя).
2. Проведення первинного посіву патологічного матеріалу (випорожнення) на середовища вісмут-сульфіт агару та 10 % жовчний бульйон.
3. Визначення характеру росту сальмонел на середовищі вісмут-сульфіт агарі.
4. Відбір чорних колоній на вісмут-сульфіт агарі для виділення "чистої" культури, пересів на середовище Ресселя.
5. Проведення мікроскопії з середовища Ресселя для визначення чистоти культури, визначення морфотинкторіальних властивостей сальмонел у препараті.

6. Приготування середовища Гісса і проведення посіву для вивчення ферментативних властивостей.

7. Проведення посіву на МПБ для визначення протеолітичних ферментів.

8. Постановка орієнтовної реакції аглютинації на склі з метою визначення серовару сальмонел.

Алгоритми лабораторної роботи

Алгоритм: "Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену сальмонелами".

Патологічний матеріал потрібно доставити до лабораторії не пізніше 3–4 год.

Виділення збудників. Спочатку матеріал (особливо випорожнення) засівають на середовища збагачення (наприклад, на селенітовий або 20 % жовчний бульйон). Диференційно-діагностичні середовища для висіву з середовищ збагачення бувають високоселективними (наприклад, вісмут-сульфіт агар), середньоселективними (середовище Плоскірева) і низькоселективними (середовища Ендо і Левіна). Біохімічні й культуральні властивості визначають на мінімальному диференціюючому ряді.

Для подальшої роботи відбирають бактерії, які ферментують глюкозу, не ферментують сахарозу і утворюють H_2S . Культури пересівають з середовища Олькеницького, в 1 % пептону воду для визначення утворення індолу і напіврідкий агар для визначення рухливості.

Останнім часом широко використовують диференційно-селективне середовище, найчастіше – ксилозо-лізіно-дезоксихолатний (XLD) агар і середовище для сальмонел і шигел (SS-agar). На них сальмонели утворюють колонії червоного кольору з чорним центром за рахунок утворення H_2S .

Визначення антигенної структури. Спочатку ставлять реакцію аглютинації на склі з O- і H-полівалентними, а потім моновалентними антисироватками. Для прискореної ідентифікації можна використовувати флюоресцючі полівалентні сальмонельозні антисироватки.

Серологічні дослідження проводять для діагностики, а також виявлення і диференціації різних форм носійства. Для виявлення антитіл в крові хворих і реконвалесцентів застосовують РПГА з полівалентними еритроцитарними діагностикумами, які містять O-Аг серогруп А, В, С, D і E та ІФА.

Термінологія. Enterobacteriaceae, Salmonella, S. enterica, S. typhimurium, S. heidelberg, S. enteritidis, S. derby, S. choleraesuis, S. dublin.

Запитання для контролю знань.

1. Морфологія і біологічні властивості сальмонел. Антигенна структура: O-, H-антигени. Міжнародна класифікація. Стійкість до чинників навколишнього середовища.

2. Основи патогенезу харчових токсикоінфекцій. Характеристика імунітету.

3. Правила взяття матеріалу для дослідження на різних стадіях хвороби, доставка його до лабораторії; супровідна документація. Методи лабораторної діагностики.

4. Методи профілактики та принципи лікування.

Тестові завдання

1. До мікробіологічної лабораторії доставлений салат для виділення збудників харчових токсикоінфекцій (сальмонел). На які живильні середовища проводиться первинний посів?
 - A. Жовтково-сольовий агар, МПБ.
 - B. М'ясо-пептонний агар, МПБ.
 - C. Селенітовий бульйон, середовище Ендо, Плоскірєва, вісмут-сульфіт агар.
 - D. Печінковий бульйон, середовище Ру.
 - E. Кров'яний агар, лужний агар.
2. При мікробіологічному дослідженні м'ясного фаршу виділені бактерії, які відносяться до роду сальмонел. Вивчення яких властивостей мікроорганізмів, дозволило дійти такого висновку?
 - A. Культуральних.
 - C. Антигенних.
 - E. Протеолітичних.
 - B. Тинкторіальних.
 - D. Сахаролітичних.
3. До стаціонару надійшов пацієнт із підозрою на харчову токсикоінфекцію сальмонельозної етіології. Які методи мікробіологічної діагностики використовуються для підтвердження клінічного діагнозу. Виберіть найповнішу відповідь.
 - A. Алергічний, серологічний, бактеріоскопічний.
 - B. Бактеріологічний, серологічний, біологічний.
 - C. Бактеріологічний, бактеріоскопічний, серологічний.
 - D. Серологічний, біологічний, експрес-методи.
 - E. Біологічний, бактеріологічний, експрес-методи.
4. У мікробіологічній діагностиці сальмонел використовується метод бактеріоскопії. Які морфологічні ознаки характерні для сальмонел?
 - A. Грамнегативні палички, нерухомі.
 - B. Грампозитивні палички, рухливі.
 - C. Грампозитивні палички, нерухом.
 - D. Грамнегативні палички, рухливі, перитрихи.
 - E. Грамнегативні палички, рухливі, амфітрихи.
5. Антигенну структуру сальмонел визначають в реакції:
 - A. Реакції аглютинації на склі.
 - D. Реакції гальмування гемаглютинації.
 - B. Реакції преципітації.
 - C. Реакції зв'язування комплекменту.
 - E. Імуноферментного аналізу.
6. До інфекційного відділення надійшла дитина з підозрою на гастроентерит сальмонельозної етіології. Необхідно вибрати середовище для виділення чистої культури.
 - A. Середовище Раппопорт.
 - D. Селенітовий бульйон.
 - B. Середовище Ендо.
 - E. Середовище Ресселя.
 - C. Середовище з 10–20 % жовцю.

Тема: Лабораторна діагностика шигельозу

Кількість годин: 4.

Обґрунтування теми. Шигели належать до родини *Enterobacteriaceae*, роду *Shigella*. Вони є збудниками гострого кишкового захворювання – бактеріальної дизентерії, або шигельозу.

Шигельоз є одним із найбільш поширених захворювань. Ендемічні за шигельозом країни Центральної Африки, Південно-Східної Азії, Центральної Америки. Щорічно на шигельоз хворіють понад 200 млн людей. У деяких країнах захворюваність становить 20–60 % від усіх кишкових інфекцій, а в більшості країн Африки, Латинської Америки, Азії є однією з основних причин смерті дітей віком до 5 років. В останні роки відмічається тенденція до зростання захворюваності на шигельоз і в країнах Східної Європи, на теренах колишнього СРСР, у тому числі й в Україні. Питома вага шигельозів у структурі гострих кишкових захворювань у більшості розвинених країн становить 5–10 %, у країнах колишнього СРСР – 20–30 %. Незважаючи на кваліфіковану медичну допомогу, шигельоз нерідко призводить до летальних наслідків.

Мета:

– загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою шигельозу;

– конкретна:

а) знати:

1. Правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.

2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.

3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на шигельоз.

4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на шигельоз.

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення шигел.

6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення: музейні мікропрепарати, живильні середовища (Плоскірева, Ресселя), патогенний матеріал, імунні сироватки, бланки направлень, бікс, сірники, маркер, штативи, бак. петлі, ріст культури шигел на середовищі Ендо, Ресселя, мікроскоп, імерсійне масло, предметні скельця, набір для фарбування за Грамом, пастерівські піпетки, хімічні пробірки, груші, чашки Петрі, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

Зміст заняття

Таксономія

Родина: Enterobacteriaceae.

Під: Shigella.

Вид: *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. sonnei*

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Шигели мають форму паличок із заокругленими кінцями 2–3 мкм завдовжки і 0,4–0,7 мкм завширшки, не утворюють спору і капсулу, нерухливі, грамнегативні. Деякі види шигел (*S. flexneri*) на поверхні мають фімбрії – фактор адгезії та F-пілі, які беруть участь у кон'югації.

Культуральні властивості. Шигели – факультативні анаероби, не вибагливі до живильних середовищ, легко культивуються на МПБ і МПА при температурі 37 С, але деякі види (*S. sonnei*) можуть рости при температурі від 10 до 45 С. Оптимальний рН 7,2. Для їх культивування використовують диференційно-діагностичні середовища Ендо, ЕМС, Плоскірєва. На цих середовищах шигели утворюють дрібні колонії (1–1,5 мкм), круглі, трохи випуклі, з рівним краєм, безбарвні (не розщеплюють лактозу), з гладенькою блискучою поверхнею, напівпрозорі, м'якої консистенції, які легко знімаються петлею з поверхні агару. У разі дисоціації культури на щільному середовищі одночасно можуть утворюватися колонії у S-, R- і перехідній формах.

У рідкому живильному середовищі S-форми утворюють рівномірне помутніння, R-форми утворюють осад, надосадна частина бульйону залишається прозорою. Інколи на поверхні бульйону утворюється плівка.

Ферментативні властивості. Біохімічна активність у шигел виражена слабо. Більшість із них не ферментують лактозу і сахарозу, але описані лактозопозитивні штами *S. flexneri*. *S. sonnei* розщеплюють ці вуглеводи із запізненням (лактозу – на 3–5-у добу, сахарозу – на 5–6-у добу), але відомі штами *S. sonnei*, які ферментують лактозу в 1-у добу росту. При ферментації глюкози відсутнє газоутворення. Розрізняють шигели, які ферментують і не ферментують маніт. До шигел, які не ферментують маніт, належать *S. dysenteriae*. Шигели (не) розріджують желатину, не утворюють сірководень, деякі види здатні утворювати індол.

Антигенні властивості. Основним є O-антигени. O-антиген – це ліпополісахарид клітинної стінки, він одночасно є ендотоксином. За ступенем специфічності розрізняють антигени, загальні для всієї родини, а також видові, групові й типоспецифічні. У шигел також виявлені антигени, спільні з холерними вібріонами, лептоспірами, що може бути причиною псевдопозитивних серологічних реакцій.

Відомо 40 серотипів шигел, які об'єднані в 4 серогрупи. За Міжнародною класифікацією ці групи позначають великими літерами латинського алфавіту: А, В, С, D (*табл. 1*).

Таблиця 1 – Класифікація бактерій роду *Shigella*

Серогрупа	Вид	Сероваріант	Підсероваріант	Антигенна формула
A	<i>S. dysenteriae</i>	1-12	—	—
B	<i>S. flexneri</i>	1	1a	1:4...
			1b	1:6...
		2	2a	II:3,4...
			2b	11:7,8...
		3	3a	111:6,7,8...
			3b	111:3,4,6...
			3c	111:6...
		4	4a	IV:3,4...
			4b	IV:6...
		5	*	V:7,8...
		6	—	VI:-:...
		X-variant	—	-:7,8...
		Y-variant	—	-:3,4...
C	<i>S. boydii</i>	1-18	—	
D	<i>S. sonnei</i>	-		

За здатністю ферментувати вуглеводи – рамнозу, мальтозу і ксилолу – *S. sonnei* поділяють на 14 біохімічних типів і підтипів.

Резистентність. Шигели відносно стійкі до факторів навколишнього середовища. У ґрунті деякі штами шигел зберігаються до 3 міс, влітку навіть до 5 міс, у воді – до 3 міс, на овочах, хлібі – до 2 тиж молодці, молочних продуктах – декілька тижнів. Сприятливим середовищем для шигел є харчові продукти. *S. sonnei* в молодці й молочних продуктах здатні не тільки тривало жити, а і розмножуватися. Шигели чутливі до високої температури та дезінфікуючих засобів. Найбільш стійкі до дії різноманітних факторів – *S. sonnei*. Пряме сонячне світло вони витримують протягом 30 хв, ультрафіолетове опромінення – 10 хв, під час кип'ятіння гинуть миттєво, при температурі 60 °С – через 30 хв. Під дією 1 % розчину фенолу, 3 % розчину хлораміну гинуть через 30 хв, чутливі до активного хлору.

Фактори патогенності:

✓ Фактори адгезії і колонізації – фімбрії, білки поверхневої мембрани, ліпополісахарид. Адгезії сприяють ферменти, що руйнують слиз – нейрамінідаза, гіалуронідаза, муциназа.

✓ Фактори інвазії сприяють проникненню шигел в ентероцити, макрофаги, де вони розмножуються і проявляють цитотоксичну та ентеротоксичну дію. Внутрішньоклітинне розмноження і руйнування клітин зумовлює особливість патогенезу при шигельозі.

✓ Фактори, що пригнічують механізми захисту макроорганізму: захист шигел від фагоцитів забезпечують К-антиген, групові антигени 3, 4, а також ліпополісахарид; крім того, ліпід А ендотоксину пригнічує активність лімфоцитів (клітин імунної пам'яті).

✓ Токсини: ендотоксин (ліпополісахарид) захищає шигели від дії низьких значень рН і жовчі; екзотоксини (екзотоксин Шига – нейротоксин і шигаподібні токсини) проявляють цитотоксичну дію; ентеротоксин активує аденілатциклазу, що призводить до розвитку діареї.

Епідеміологія. Шигельоз – антропонозна інфекція, її джерелом є хворі люди і носії. Механізм передачі – фекально-оральний. Шляхи передачі – водний (переважно для *S. flexneri*), аліментарний, особливо через молоко і молочні продукти (переважно для *S. sonnei*) і контактно-побутовий (переважно для *S. dysenteriae*). Природна сприйнятливість у людей висока, тому шигельози розповсюджені всюди, частіше виникають у вигляді спалахів аліментарного і водного характеру. Забруднення продуктів харчування можуть спричинювати комахи-переносники – мухи, таргани.

Особливістю епідеміології шигельозу є зміна видового складу збудників, а також біотипів *S. sonnei* і серотипів *S. flexneri* у певних регіонах. Причинами зміни видового складу збудника є зміна колективного імунітету, а також зміна властивостей збудника. Повернення епідемій шигельозу, спричиненого *S. dysenteriae*, пояснюють тим, що збудник набув плазмід, які зумовили множинну стійкість його до лікарських препаратів і підвищили вірулентність.

Патогенез і клінічна картина. Інкубаційний період при шигельозі триває від 3 год до 7 діб, частіше – 1–2 доби. Інфекційний процес локалізується у нижньому відділі товстої кишки (сигмоподібній і прямій). Білки поверхневої мембрани шигел специфічно взаємодіють з рецепторами плазмолемми ентероцитів і сприяють проникненню бактерій всередину клітини. Розмножуючись внутрішньоклітинно, вони руйнують її і знову виходять у кишечник. Процес відбувається циклічно: адгезія, інвазія, розмноження, руйнування клітин, потім все спочатку. Внаслідок цього виникає некроз, відторгнення епітелію, розвивається місцева запальна реакція. Зона ушкодження тканин поширюється в глибину стінки кишечника, може досягти м'язового шару, а в особливих випадках ушкоджувати його. Це призводить до утворення виразок і навіть перфорації. Місцевий запальний процес посилюється дією токсинів, біологічно активних речовин збудника, медіаторів запалення. Внаслідок ушкодження нервової системи товстої кишки (дія нейротоксину) порушуються мікроциркуляція у всіх оболонках кишки, процеси регенерації, перистальтики, може виникнути спастичний стан товстої кишки. Токсини також пригнічують синтез ферментів травлення, ендотоксин викликає інтоксикацію, посилення перистальтики кишечника, пронос.

У розпал хвороби виявляють потовщення стінки кишечника, набряк, дифузну гіперемію, ерозії і виразки; в судинах формуються тромби. Загалом виникають порушення у всіх органах і тканинах: пригнічуються функції шлунка, печінки, підшлункової залози, нервової і серцево-судинної системи.

Клінічно це проявляється нудотою, блюванням, появою рідких випорожнень, що призводить до зневоднення організму. Випорожнення спочатку виділяються у великій кількості, але потім їх кількість значно зменшується і вони набувають вигляду і запаху тертої картоплі. Поступово випорожнення втрачають каловий характер і під час дефекації з прямої кишки виділяється лише згусток, що складається з мутного слизу і крові, – "ректальний плювок". Інколи випорожнення мають вигляд "м'ясних помив". Позиви "до низу" бувають дуже частими (20–25 разів на добу), бувають випадки, що кількість їх не можна порахувати. Дуже виснажують хворих псевдопозиви, часті випорожнення, тенезми (болісні спазми прямої кишки). Температура тіла – від субфебрильної до високої (40 °С і вище). Період лихоманки триває 4–5 днів. У гострий період хвороби розвивається або посилюється дисбактеріоз не тільки в товстій кишці, а й в усьому організмі. Це значно ослаблює місцевий імунітет, а також ефективність антибактеріальних препаратів унаслідок міграції плазмід резистентності від умовно-патогенної мікрофлори до шигел.

Найбільш тяжкий перебіг має шигельоз Григор'єва–Шига, який супроводжується токсикозом і бактеріємією, яка посилює токсикоз.

У 90 % випадків шигельоз має стертий і легкий перебіг – феномен "айсберга". Більш тяжкий перебіг шигельозу спостерігається у дітей і людей похилого віку. В Україні частіше діагностують середньої тяжкості й тяжкі форми захворювання, що пов'язано з проявом екологічного імунодефіциту, зниженням неспецифічних факторів захисту, а також зі збільшенням штамів, резистентних до лікувальних препаратів.

Після перенесеної хвороби інколи формуються різні постдизентерійні порушення: дисбактеріоз, "синдром подразненої кишки", постдизентерійний коліт. У 1 % хворих формується затяжний перебіг хвороби.

Імунітет. Після перенесеної інфекції формується ненапружений і нетривалий тип- і серовароспецифічний імунітет, перехресний імунітет проти різних сероваріантів шигел не формується. Основна роль належить секреторним IgA, які запобігають адгезії, і цитотоксичній антитіло залежній активності інтраепітеліальних лімфоцитів, які разом із секреторним IgA знищують шигели. Часто при шигельозі зменшується кількість Т- і В-лімфоцитів, що призводить до розвитку вторинного імунодефіциту.

Мікробіологічна діагностика

Основним матеріалом для дослідження при будь-якій клінічній формі шигельозу є фекалії. Для дослідження відбирають також блювотні маси, промивні води шлунка, кров, секційний матеріал, а для визначення шляхів поширення – харчові продукти, воду.

Використовують *бактеріологічний, люмінесцентно-мікроскопічний і серологічний* методи діагностики.

При *бактеріологічному дослідженні* патологічний матеріал засівають на лактозовмісні диференційні живильні щільні середовища. У випадку виявлення бактеріоносіїв посів випорожнень обов'язково проводиться в селенітовий бульйон з наступним виділенням збудника на щільних лактозовмісних диференційних живильних середовищах. Серед колоній, які виростили на середовищах, відбирають лактозонегативні колонії, які ідентифікують до виду і серовара, а виділені культури *S. flexneri* – до підсерварів, *S. sonnei* – до хемоварів. Для виявлення антигену шигел у крові, сечі, випорожненнях використовують РПГА, ІФА, РЗК, реакцію коагуляції (при дослідженні сечі й випорожнень).

Серологічні реакції ставлять у динаміці з метою виявлення наростання титру антитіл. Використовують РПГА і РНІФ.

Профілактика при шигельозах спрямована на дотримання санітарних норм і правил у побуті, на підприємствах харчової промисловості, у лікарнях, дитячих закладах тощо. Важливе значення має своєчасне виявлення, ізоляція і лікування хворих, а також проведення поточної та остаточної дезінфекції в осередку.

Проводяться пошуки щодо виробництва живої оральної вакцини.

Лікування. Використовують препарати нітрофуранового ряду (ніфу-роксазид), оксихінолони (мексаформ), норфлоксацин, ампіцилін, а також препарати бактеріофагів: бактеріофаг дизентерійний полівалентний, інтести-бактеріофаг. Для корекції нормальної мікрофлори призначають еубіотики (біфі-форм, коли-бактерин, біфідумбактерин, біфікол, лактобактерин).

Практичні навички з теми

1. Виготовлення живильних середовищ для культивування шигел (середовище Ендо, Плоскірева, Ресселя, Гісса, МПБ).

2. Проведення первинного посіву патологічного матеріалу (випорожнень) на середовище Ендо, Плоскірева.

3. Визначення характеру росту шигел на середовищі Ендо, Плоскірева.

4. Проведення пересіву на середовище Ресселя для виділення "чистої" культури.

5. Проведення мікроскопії з середовища Ресселя для визначення чистоти культури, визначення морфотинкторіальних властивостей шигел у препараті.

6. Проведення ідентифікації виділеної культури згідно з інструкцією.

Алгоритми лабораторної роботи

Алгоритм: "Правила забору матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену шигелами".

Матеріал для дослідження: випорожнення. Матеріал беруть з перших днів захворювання. Найбільша ймовірність виділення культури шигел у перші дні захворювання, коли в 1 г фекалій містяться десятки мільйонів бактерій. Починаючи з 4–5-ї доби їх кількість різко зменшується навіть

при тяжкому перебігу хвороби. Краще брати ректальним тампоном, ректальною трубкою або стерильною петлею. Можна брати з підкладного судна або горшка. Для мікробіологічного дослідження у стерильний посуд відбирають грудочки калу (3–5 г), що містить слиз і гній (але не кров!). При транспортуванні і зберіганні випорожнень при кімнатній температурі час від забору матеріалу до первинного посіву не повинен перевищувати 2 год, якщо матеріал зберігається на холоді (4 °С), цей час може збільшитися до 12–24 год.

Алгоритм: "*Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену шигелами*".

I день дослідження. Випорожнення засівають на середовище Ендо, Плоскірева (є одночасно і елективним середовищем, оскільки пригнічує ріст кишкової палички і перешкоджає розмноженню бактеріофага) та середовище накопичення – селенітовий бульйон. Інкують в термостаті при 37 °С 18–24 год.

II день дослідження. Вивчають колонії на щільних диференційних середовищах. На середовищі Ендо колонії шигел безбарвні, оскільки не ферментують лактозу, на середовищі Плоскірева колонії кремового кольору в S-формі, *S. sonnei* – у R-формі. Проводять мікроскопію. Якщо при мікроскопії виявлені грамнегативні палички, то засівають на середовище Ресселя, яке містить глюкозу і лактозу (посів проводять штрихами по скошеній поверхні й уколом в агаровий стовпчик). Проводять висів із середовища збагачення на середовище Плоскірева. Всі посіви інкують при 37 °С 18–24 год.

III день дослідження. З культури з середовища Ресселя, що не розщепила лактозу, готують мазки, забарвлюють за Грамом і проводять мікроскопію. Якщо при мікроскопії виявлені грамнегативні палички, проводять посів на середовища Кліглера або середовище з сечовиною за Преусом, цитратний агар Сімонса, середовище Кларка, Гісса і 1% пептону воду з індикаторними папірцями для визначення цукролітичних і протеолітичних властивостей.

Проводять серологічну діагностику з полівалентною сироваткою А в РА на склі, якщо результат позитивний, ставлять РА з видовими сироватками групи А.

При негативному результаті з полівалентною сироваткою А проводять реакцію аглютинації на склі з полівалентною сироваткою Флекснера–Зонне, якщо результат позитивний, проводять реакцію аглютинації з видовими сироватками (окремо з сироваткою Флекснера, Зонне). Якщо виділена *S. flexneri*, тоді проводять дослідження з типовими сироватками групи В.

При негативному результаті з полівалентними сироватками групи А і Флекснера–Зонне використовують полівалентну сироватку Бойда, при позитивному результаті використовують типові сироватки.

При постановці реакції аглютинації слід враховувати відношення культури до маніту і залежно від цього використовувати ту або іншу сироватку. Так, культури, що не розщеплюють маніт, випробовують з полівалентними сироватками до шигел групи А.

IV день дослідження. Проводять облік результатів попередніх посівів. Культура, що не розщеплює лактозу (за винятком *S. sonnei*, яка ферментує на 2–3-ю добу) і сахарозу, маніт «+/-», розщеплює глюкозу до кислоти (за винятком *S. flexneri*, сировару 6), не гідролізує сечовину, не утилізує цитрат як єдине джерело вуглеводу (шигели не ростуть на цитратному середовищі Сімонса), яка дає позитивну реакцію з метиловим червоним і негативну реакцію Фогеса–Проскауера, утворює індол, не утворює сірководень, є підозрілою на шигели.

Для остаточної ідентифікації досліджуваної культури проводять посіви на середовище з лізином, ацетатний агар. Посіви інкубують при 37 °С 18–20 год.

При виділенні *S. sonnei* проводять визначення біоваріанту для встановлення джерела інфекції (табл. 2).

Таблиця 2 – Біоваріанти *S. sonnei*

Біоваріанти	Розщеплювання вуглеводів	
	Рамноза	Ксилоза
I a,b	+	–
II g,e	(+)	–
III d,c	+	+
IV f	+	(+)

+ повне розщеплювання; (+) розщеплювання через 5–6 днів; – не змінюється.

Після вивчення ферментативних властивостей і серологічного типування дають остаточну відповідь.

Термінологія: Enterobacteriaceae, Shigella, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. sonnei*

Запитання для контролю знань

1. Морфологія і біологічні властивості шигел. Антигенна структура та Міжнародна класифікація шигел. Стійкість до чинників навколишнього середовища.

2. Основи патогенезу дизентерії. Особливості імунітету внаслідок перенесеного захворювання.

3. Правила взяття матеріалу для дослідження та його транспортування до лабораторії; супровідна документація.

4. Методи лабораторної діагностики шигельозів. Метод визначення коліциногенної активності та коліциноварів. Серодіагностика. Виявлення бактеріоносіїв.

5. Принципи профілактики та лікування бактеріальної дизентерії.

Тестові завдання

1. Від хворої дитини з гострою кишковою інфекцією виділений збудник шигельозу. Які морфологічні ознаки характерні для збудника?

- A. Грамнегативна нерухома паличка.
- B. Грампозитивна рухлива паличка.
- C. Грампозитивна стрептобацила.
- D. Утворює капсулу на живильному середовищі.
- E. Утворює спори у зовнішньому середовищі.

2. Пацієнт, який хворіє протягом трьох днів, скаржиться на болі в животі, часте рідке випорожнення, наявність крові в калі. Лікар клінічно діагностував шигельоз. Який метод мікробіологічної діагностики доцільно застосувати в цьому випадку і який матеріал потрібно узяти від хворого для підтвердження діагнозу?

- A. Бактеріоскопія, кал.
- B. Бактеріологічний, кал.
- C. Бактеріоскопія, кров.
- D. Бактеріологічний, сеча.
- E. Серологічний, кров.

3. Із фекалій хворого виділені *S. sonnei*. Які необхідно провести додаткові дослідження для встановлення джерела інфекції?

- A. Фаготипування виділеної чистої культури.
- B. Визначити антибіотикограму.
- C. Поставити реакцію преципітації.
- D. Поставити реакцію зв'язування комплементу.
- E. Визначення біоваріанту.

4. До мікробіологічної лабораторії доставлені випорожнення від пацієнта з підозрою на шигельоз. На які живильні середовища проводиться первинний посів?

- A. Жовтково-сольовий агар, МПБ.
- B. МПА, МПБ.
- C. Селітовий бульйон, Ендо, Плоскірева.
- D. Середовище Ендо, ВСА.
- E. Кров'яний агар, лужний агар.

5. Від хворого з діагнозом шигельоз був виділений збудник із здатністю продукувати екзотоксин. Про який вид шигел йде мова?

- A. *S. sonnei*.
- B. *S. flexneri*.
- C. *S. dysenteriae*.
- D. *S. boydii*.
- E. *S. flexneri*, *S. dysenteriae*.

6. Із метою ретроспективної діагностики було призначено проведення серологічного дослідження сироватки крові для встановлення титру антитіл до шигел. Яку з перерахованих реакцій доцільно використовувати для цього?

- A. Реакцію преципітації. D. Реакцію бактеріолізу.
B. Реакцію гемолізу. E. Реакцію пасивної гемаглютинації.
C. РЗК.

7. У дитячому садку протягом 4 днів госпіталізовано 10 дітей різних вікових груп з ознаками гострої кишкової інфекції. При бактеріологічному дослідженні випорожнень хворих виділений збудник дизентерії Sonne. Який препарат необхідно призначити дітям, які були в контакті з цими хворими, для специфічної профілактики захворювання?

- A. Вакцина TABte. D. Антибіотики.
B. Сульфаніламід. E. Дизентерійний бактеріофаг.
C. Імуноглобулін.

8. При бактеріологічному дослідженні випорожнень хворого на кишкову інфекцію була виділена Shigella sonne. Яка із перелічених серологічних реакцій була використана для ідентифікації виділеної чистої культури?

- A. Нейтралізації. D. РЗК.
B. Лізису. E. Аглютинації.
C. Преципітації.

9. Для вирішення питання ретроспективної діагностики перенесеної бактеріальної дизентерії було призначено серологічне дослідження сироватки крові з метою встановлення титру антитіл до шигел. Яку серологічну реакцію слід використати для цього?

- A. Преципітація. D. Гемоліз.
B. Бактеріоліз. E. Пасивна гемаглютинація.
C. РЗК.

10. Пацієнт вилікувався після перенесеної дизентерії Зоне і повторно заразився цим же збудником. Як називається така форма інфекції?

- A. Персистуюча. D. Хронічна.
B. Суперінфекція. E. Рецидив.
C. Реінфекція.

ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. Борисов Л.В. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л.В. Борисов. – М. : Медицина, 1984. – 255 с.
2. Гирін В.М. Посібник з медичної вірусології / В.М. Гирін. – К. : Здоров'я, 1995. – 367 с.
3. Микробиология / А.В. Воробьев, А.С. Быков, Э.П. Пашков, А.М. Рыбакова. – М. : Медицина, 2004. – 690 с.
4. Микробиология / И.Л. Дикий, И.Ю. Холупяк, Н.Е. Шевелева, М.Ю. Стегний. – Харьков : Прапор, изд. УкрФА, 1999. – 413 с.
5. П'яткін К.Д. Микробиологія з вірусологією та імунологією / К.Д. П'яткін, Ю.С. Кривошеїн. – К. : Вища шк., 1992. – 431 с.
6. Ситнік І.О. Микробиологія, вірусологія, імунологія / І.О. Ситнік, С.І. Климнюк, М.С. Творко. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1998. – 392 с.
7. Частная медицинская микробиология с технической микробиологическими исследованиями : учеб. пособие / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М. : ОАО «Издательство медицина», 2005. – 600 с.
8. Федорович У.М. Спеціальна мікробіологія / У.М. Федорович. – Львів : Ахіл, 2002. – Ч. 2. – 475 с.
9. Черкес Ф.К. Микробиология / Ф.К.Черкес. – М. : Медицина, 1987. – 512 с.

Додаткова

1. . Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Н.П. Елинова и др.. – М. : Медицина, 1988. – 208 с.
2. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабычев. – СПб. : Специальная литература, 1998. – 561 с.
3. Люта В.А. Микробиологія з технікою мікробіологічних досліджень та основи імунології : у 2 кн. / В.А. Люта, О.В.Кононов. – К. : Здоров'я, 2006. – Кн.1. Загальна мікробіологія : підручник. – 512 с.
4. Медицинская микробиология / под ред. В.И. Покровского. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 768 с.
5. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / под ред. В.В. Теца. – Изд. 2-е, перераб, и доп. – М. : Медицина, 2002. – 352 с.
6. Медицинская микробиология / под ред. А.М. Королюка и В.Б. Сбойчакова. – СПб, 2002. – 267 с.

Навчальне видання

МОДУЛЬ 3

Частина 2

РОДИНА КИШКОВИХ БАКТЕРІЙ

***Методичні вказівки
з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія
та імунологія з мікробіологічною діагностикою"
до практичних занять
для студентів-бакалаврів III–IV курсу
за спеціальністю "Лабораторна діагностика"***

Упорядники Мінухін Валерій Володимирович
 Коваленко Наталія Іллівна
 Замазій Тетяна Миколаївна

Відповідальний за випуск В.В. Мінухін

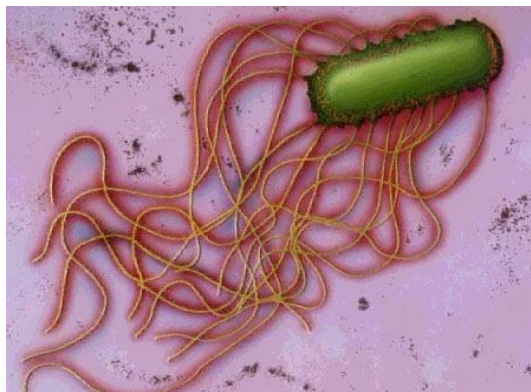


Редактор М.В. Тарасенко
Коректор Є.В. Рубцова
Комп'ютерна верстка О.Ю. Лавриненко
Комп'ютерний набір Т.М. Замазій

План 2014, поз. 107².
Формат А5. Ризографія. Ум. друк. арк. 2.8.
Тираж 150 прим. Зам. № 14-3122.

Редакційно-видавничий відділ
ХНМУ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022
izdatknmu@mail.ru, izdat@knmu.kharkov.ua

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавництв, виготовників і розповсюджувачів видавничої продукції серії ДК № 3242 від 18.07.2008 р.



МОДУЛЬ 3
Частина 2
РОДИНА КИШКОВИХ БАКТЕРІЙ

*Методичні вказівки
з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія
та імунологія з мікробіологічною діагностикою"
до практичних занять
для студентів-бакалаврів III–IV курсу
за спеціальністю "Лабораторна діагностика"*

