

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь



И.В.Гаевский

« 9 » сентября 2014 г.

Регистрационный № 008-0914

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДИСБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-
ПРОДУЦЕНТОВ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
НА ИХ ОСНОВЕ

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: республиканское унитарное предприятие
«Научно-практический центр гигиены»

Авторы: к.б.н., доцент Дудчик Н.В., к.м.н., доцент Филонюк В.А.,
д.м.н., профессор Шевляков В.В., Козлова Т.О., Трейлиб В.В., Янецкая
С.А., Наumenко С.А., Ушкова Л.Л., Грищенкова Т.В., Адамович А.В.,
к.б.н. Эрм Г.И., Студеничник Т.С.

Минск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

И.В.Гаевский
09.09.2014
Регистрационный № 008-0914

**МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДИСБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ
И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
НА ИХ ОСНОВЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доц. Н.В. Дудчик, канд. мед. наук, доц. В.А. Филонюк,
д-р мед. наук, проф. В.В. Шевляков, Т.О. Козлова, В.В. Трейлиб, С.А. Янецкая,
С.А. Науменко, Л.Л. Ушкова, Т.В. Грищенкова, А.В. Адамович, канд. биол. наук
Г.И. Эрм, Т.С. Студеничник

Минск 2014

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

В настоящей инструкции по применению изложены методы экспериментального определения дисбиотического действия микроорганизмов-продуцентов и биотехнологических препаратов на их основе.

Настоящая инструкция по применению предназначена для специалистов учреждений здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, занимающихся изучением и обоснованием гигиенических нормативов в объектах производственной и окружающей среды обитания человека (воздух рабочей зоны, воздух атмосферы населенных мест, вода водоемов и др.) производственных штаммов микроорганизмов и биотехнологических форм препаратов, действующим началом которых являются живые микроорганизмы или их споры.

ГЛАВА 2 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

Оборудование

Анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $pH \pm 0,1$ (pH-метр)	ГОСТ, ТУ ГОСТ 19881-74
Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или пробирках	ТУ 64-1-2451-78
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(45 \pm 0,5)^\circ C$	ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные квадрантные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г	ГОСТ 24104– 88E
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104– 88E
Дистиллятор электрический	
Лупа с пятикратным увеличением	ГОСТ 25706– 83
Микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000 ^x	ГОСТ 8284-78
Прибор для счета колоний бактерий ПСБ	ТУ 64-1-2041-72
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569-89
Стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры $(100–220)^\circ C$	ГОСТ 24437-89
Термометр $(0–100)^\circ C$, цена деления $1^\circ C$	ГОСТ 24498– 90
Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до $50^\circ C$, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью $\pm 1^\circ C$	ТУ 64-1-1382-72

Анаэростат	СТБ ISO 7218-2010
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317-87
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83
Материалы	
Бумага индикаторная универсальная	ТУ 6-091181-76
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Вата медицинская гигроскопичная	ГОСТ 5556-81
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 25336-82
Ножницы	ГОСТ 21241-89
Петли бактериологические	
Пипетки разной вместимости 2-го класса точности	ГОСТ 20292-74
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	ГОСТ 25336-82
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932- 90 Е
Стекля предметные	ГОСТ 9284-75
Стекля покровные	ГОСТ 6672-75
Цилиндры на 100–250 см ³	ГОСТ 1770-74
Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100, 200, 500 см ³	ГОСТ 10782-85
Стандарт-титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии	ГОСТ 8.135-2004 ГСИ
Штативы для пробирок	
Шпатели стеклянные	
Чашки Петри 90–100 мм	ГОСТ 25336-82
Питательные среды и реактивы	
Агар микробиологический в порошке или волокнах	ГОСТ 17206-96
Агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов	ФС 42-188ВС-90
Агар Эндо	ФС 42-186ВС-88
Солевой агар	ГОСТ 10444.1-84
Желточно-солевой агар	ГОСТ 10444.1-84
Молочно-желточно-солевой агар	ГОСТ 10444.1-84
Среда Байрд–Паркер	ГОСТ 10444.1-84
Среда Вильсона–Блера	ГОСТ 10444.1-84
Кровяной агар	ГОСТ 10444.1-84
Агар с желчью и эскулином	
Тиогликолевый буфер	ГОСТ 10444.1-84
Среда Мак Конки	ГОСТ 29184-91
Среда Блаурокка	ГОСТ 10444.1-84
Среда МРС	ГОСТ 10444.11-89
Лактобактоагар	
Среда Рогоза–Маана	ГОСТ 10444.11-89
Среда Сабуро с антибиотиками	ГОСТ 10444.1-84
Конго-рот-агар	

Амфолан агар	
Растворы и реактивы для окраски по Граму	ГОСТ 10444.1-84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Кислота соляная, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм ³	ГОСТ 3118-77
Масло вазелиновое медицинское	ГОСТ 3164-78
Масло иммерсионное	ГОСТ 13739-78
Натрия гидроокись, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм ³	ГОСТ 4238-77

Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000, питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

ГЛАВА 3 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ

1. Микробиологические исследования проводят с использованием стерильных растворов, сред, посуды, инструментов. Подготовку и стерилизацию посуды для микробиологического анализа производят согласно требованиям СТБ ISO 7218-2010 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования к выполнению микробиологических исследований».

2. При взвешивании компонентов сред и испытуемых образцов допускается погрешность 0,1%.

3. Для приготовления растворов реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации «х.ч.» или «ч.д.а.».

4. Необходимое значение водородного показателя рН (далее — рН) растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроокиси натрия массовой концентраций 0,1 моль/дм³ или раствора кислоты соляной объемной долей 0,1 моль/дм³; рН растворов и питательных сред определяют с помощью рН-метра. Ориентировочное определение рН растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги.

5. Приготовление растворов реактивов и сред

5.1. Изотонический 0,85% раствор хлористого натрия (физиологический раствор): 0,85 г хлористого натрия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды и стерилизуют при температуре (121±1)°С в течение 15 мин.

Хранят при комнатной температуре не более 14 сут.

5.2. Тиогликолевый буфер

Регенерацию тиогликолевого буфера осуществляют путем прогревания в кипящей водяной бане в течение 20 мин.

5.3. Среды для культивирования микроорганизмов

Готовят из сухих питательных сред и стерилизуют по прилагаемой производителем прописи. Готовую среду разливают в чашки Петри, чашки ставят на горизонтальную поверхность, дают среде застыть и подсушивают в условиях, исключающих обсеменение среды. Чрезмерное подсушивание чашек со средами нежелательно из-за потери необходимой влаги и увеличения концентрации ингибирующих веществ.

Чашки с застывшей средой не рекомендуется оставлять на свету.

Среда Эндо должна быть бесцветной, порозовевшая среда для диагностических целей непригодна.

Среды для анаэробных микроорганизмов готовят по любому из вариантов заранее (за 1–3 сут до исследования), разливают в чашки Петри, подсушивают в стерильных условиях, помещают в анаэроостаты доньшком вверх и хранят до исследования в анаэробных условиях. Последние создают трехкратным замещением специальной газовой смесью, не содержащей O_2 (например, N_2 — 85%, CO — 5%, H_2 — 10%), либо применением системы Gas Pack. Непосредственно перед посевом материала чашки со средой извлекают из анаэроостата. После нанесения разведения фекалий на поверхность среды каплю распределяют бактериологической петлей по соответствующему сектору чашки, накрывают ее крышкой и помещают в анаэроостат доньшком вниз. Для обеспечения эвакуации водяных паров и газов, образующихся в результате метаболизма микробов, используют один из следующих приемов:

- применение специального штатива, обеспечивающего наличие зазора между чашками:

- использование прокладок между чашками, например, предметных стекол;
- расположение чашек «елочкой».

Для поглощения влаги в анаэроостат помещают свежесушенную стерильную фильтровальную бумагу. Для связывания остаточного кислорода в анаэроостат с газовой смесью, содержащей водород, рекомендуется помещать палладиевый катализатор.

ГЛАВА 4

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИСБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

1. Макроорганизм и его микрофлора представляют единую, сложившуюся в процессе эволюции экологическую систему, причем аутофлора оказывает влияние на самые разнообразные процессы, совершающиеся в организме. Из многочисленных микробиотопов организма важнейшая роль отводится микрофлоре кишечника, которая благодаря многообразию выполняемых ею физиологических функций рассматривается в настоящее время как важнейший фактор гомеостаза. В этой связи в качестве тест-системы при экспериментальном изучении дисбиотического действия микроорганизмов-продуцентов и биотехнологических препаратов на их основе на аутофлору организма используется микробиоценоз толстого кишечника.

Микробиологическое обследование фекалий животных опытной и контрольной групп в острых опытах проводят до (фон) и через 20 ч после однократной затравки соответствующими микроорганизмами-продуцентами или микробными препаратами, а затем через 144 ч (восстановительный период); в субхронических экспериментах — до (фон) и после месячного ингаляционного или перорального воздействия и если установлены существенные качественно-количественные сдвиги в микробиоценозе — повторно через 1 мес. после воздействия. Затравку осуществляют общепринятыми методами.

При исследовании микрофлоры желудочно-кишечного тракта фекалии у животных отбирают в определенное время суток. Учитывая, что в нормальной микрофлоре фекалий преобладают анаэробные микроорганизмы, обеспечивают максимальное ограничение контакта исследуемого материала с кислородом воздуха. С этой целью свежерегенерированный тиогликолевый буферный раствор разливают по 1 мл в пробирки, которые затем маркируют и взвешивают. Материал доставляется в лабораторию в течение 2 ч с момента сбора анализа. Материал хранят не более 2 ч при температуре 15–22°C и не более 4 ч при температуре 2–8°C.

1.1. Приготовление исходного разведения фекалий

Отбор фекалий от животных производят непосредственно в тиогликолевый буфер, после чего пробирки снова взвешивают и по разнице весов определяют массу фекалий. Далее добавляют столько буферного раствора, чтобы с учетом исходно взятого 1 мл буфера разведение фекалий было 1:10 (соотношение веса фекалий и всего объема буфера составит при этом 1:9), получая исходное разведение материала 10^{-1} .

Допускается также взвешивание 1 г фекалий, гомогенизация в 9 мл физиологического раствора (0,85% раствор хлорида натрия) или фосфатного буфера, получая исходное разведение материала (10^{-1}).

Из исходных готовят ряд последующих десятикратных разведений материала в физиологическом растворе или тиогликолевом буфере до 10^{-1} - 10^{-10} . Каждое разведение фекалий готовят новой стерильной пипеткой.

1.2. Культивация посевов разведений фекалий

Из приготовленных разведений делают дозированные посеvy на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов. На плотные среды в чашках Петри наносят 0,1 мл взвеси из соответствующих разведений с последующим втиранием материала шпателем. В жидкие, полужидкие и плотные среды, разлитые в пробирки высоким столбиком, вносят по 1 мл взвеси на 9 мл среды (приложение 2).

Все посеvy инкубируют при 37°C 24–48 ч; чашки со средой Сабуро оставляют после этого еще на двое суток при комнатной температуре (18–24°C).

Для культивирования анаэробов используют анаэроостаты, анаэробные камеры. Можно использовать разовые коммерческие пакеты и генераторы. Посевы инкубируют не менее двух суток.

Рекомендуемые микробиологические показатели, питательные среды, используемые разведения и условия культивирования микроорганизмов представлены в приложении 2.

ГЛАВА 5

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

1. После инкубации определяют число выросших микроорганизмов на средах в тех разведениях, где количество колоний поддается визуальному учету.

1.1. Для количественного учета отбирают чашки с плотными питательными средами, на которых выросло от 5 до 150 колоний.

Количество колониобразующих единиц микроорганизмов (КОЕ) в 1 г исследуемого материала рассчитывают по формуле:

$$\bar{O} = Lg(N \cdot 10 \cdot 10^n), \quad (1)$$

где X — логарифм числа КОЕ в 1 г фекалий;

N — число колоний, формирующихся на средах при высеве соответствующего разведения фекалий;

10 — постоянный коэффициент при посеве 0,1 мл разведения фекалий;

n — степень разведения фекалий, взятого для посева.

При необходимости проводят микроскопический и биохимический анализ выделенных культур для подтверждения их принадлежности к исследуемому семейству, роду.

1.2. Идентификация патогенных и условно-патогенных энтеробактерий

Идентификацию патогенных и условно-патогенных энтеробактерий проводят в соответствии с Инструкцией по применению «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 08.05.2009 (рег. № 026-0309).

1.3. Идентификация бактерий родов *Proteus-Providencia*

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

1.4. Идентификация грибов рода *Candida*

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

1.5. Идентификация бифидобактерий

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

1.6. Идентификация лактобактерий

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

1.7. Идентификация бактериоидов

Бактериоиды культивируют на специальных средах с желчью и эскулином. На агаре с желчью и эскулином бактериоиды в результате гидролиза эскулина образуют черные колонии. Подсчет колоний ведется с учетом морфологии и каталазного теста (как правило, бактериоиды каталазоположительны).

1.8. Идентификация клостридий

Для определения клостридий используют среду Вильсона–Блера. По 1 мл взвеси фекалий из разведений 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} засевают в расплавленную и охлажденную до 50°C среду Вильсона–Блера (по две пробирки каждого разведения). По одной пробирке каждого разведения помещают в водяную баню при 80°C на 20 мин. О количестве клостридий судят по числу черных колоний в глубине агарового столбика Вильсона–Блер.

1.9. Идентификация стафилококков

Стафилококки определяют при посеве 0,1 мл на желточно-солевой агар, среду Байрд–Паркера или другие аналоги из разведений 10^{-1} – 10^{-5} . Инкубируют в течение 48 ч. Учитывают количество стафилококков и определяют лецитиназную активность. Колонии, различные по морфологии, пересевают на скошенный мясопептонный агар. Плазмокоагулирующую способность определяют путем внесения агаровой культуры петлей в агглютинационную пробирку с 0,5 мл стерильной кроличьей или человеческой плазмы, разведенной 1:5. Пробирки помещают в термостат и проверяют образование сгустка через 30 мин и 4 ч. В качестве контроля ставят пробирку с плазмой без добавления культуры. Рост в анаэробных условиях определяют на среде с маннитом под вазелиновым маслом.

1.10. Идентификация энтерококков

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

1.11. В приложении 1 представлено количественное содержание основных групп микроорганизмов в фекалиях интактных белых крыс. В приложении 3 приведена краткая характеристика основных представителей микрофлоры кишечника.

ГЛАВА 6

КРИТЕРИИ УСТАНОВЛЕНИЯ ДИСБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ НА НОРМАЛЬНУЮ МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА

1. Реакцию нормальной микрофлоры на воздействие микроорганизмов-продуцентов и биотехнологических препаратов на их основе разделяют на 2 категории.

1.1. Первая категория — кратковременные изменения микрофлоры, не сопровождающиеся нарушением физиологических функций макроорганизма и быстро восстанавливающиеся после прекращения воздействия повреждающего агента. Это т. н. дисбактериальные реакции, являющиеся отражением процесса адаптации биоценоза макроорганизма — микрофлоры к изменившимся условиям внешней среды.

Критерии дисбактериальных реакций:

- изменения бактериологических показателей опытной группы животных статистически значимо ($p \leq 0,05$) отличаются от параллельного контроля, однако находятся в пределах физиологической нормы (фона)

- изменения не более двух бактериологических показателей опытной группы статистически достоверно ($p \leq 0,01$) отличаются от контроля.

1.2. Вторая категория — количественные и качественные изменения микрофлоры кишечника, сохраняющиеся после окончания воздействия — дисбактериоз.

Критерии дисбактериоза:

- изменения не менее двух бактериологических показателей 1 группы статистически значимо ($p \leq 0,05$) отличаются от параллельного контроля и выходят за пределы физиологических колебаний ($\pm 2\sigma$) среднегрупповых значений показателя контрольных животных;

- изменения трех и более бактериологических показателей 2 группы статистически значимо ($p \leq 0,01$) отличаются от параллельного контроля;

- изменения любого из бактериологических показателей статистически значимо отличаются от контроля, не выходят за пределы физиологической нормы, однако сохраняются после окончания воздействия (в остром опыте — не менее 144 ч, в хроническом опыте — не менее 1 мес.).

Количественное содержание основных групп микроорганизмов
в фекалиях интактных белых крыс

Микроорганизмы	Объем выборки	Частота встречаемости микроорганизма (%)	$M \pm m$ (lg КОЕ/г)	σ
Анаэробные бактерии	220	100	$9,22 \pm 0,06$	0,92
Кишечные палочки	220	100	$6,13 \pm 0,07$	1,08
Стафилококки	143	100	$4,21 \pm 0,08$	0,90
Фекальные стрептококки	150	100	$5,35 \pm 0,13$	1,65
Лактозонегативные условно-патогенные грамотрицательные бактерии	173	19	$3,49 \pm 0,15$	0,83
Лактобактерии	219	100	$8,66 \pm 0,07$	1,04
Клостридии	129	9	$2,81 \pm 0,26$	0,87

Рекомендуемые микробиологические показатели, среды и условия
культивирования микроорганизмов

Исследуемые группы микроорганизмов	Питательные среды	Разведения фекалий для посева	Условия культивирования
Кишечные палочки	Среда Эндо, среда Мак Конки	10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}	37°С 20 ч, аэробные
Золотистый стафилококк	Солевой агар, среда Байрд–Паркер, ЖСА, МЖСА	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}	37°С 48 ч, аэробные
Бифидобактерии	Блаурокка и среды для выделения бифидобактерий	10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-10}	37°С 48–72 ч, анаэробные
Лактобактерии	Среда для молочнокислых бактерий МРС-4, лактобакагар, среда Рогоза-Маана и др.	10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}	37°С 48 ч, анаэробные
Клостридии	Среда Вильсона–Блера	10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}	37°С 20 ч, аэробные
Бактероиды	Агар с желчью и эскулином	10^{-6} , 10^{-8}	37°С 5–7 дней, анаэробные
Микробы рода <i>Proteus</i>	Скошенный агар по Шукевичу, амфолан-агар	10^{-1}	37°С 18–48 ч, аэробные
Энтерококки	Желчно-эскулиновый агар с азидом натрия, кровяной агар и др.	10^{-6}	37°С 48 ч, аэробные
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	Сабуро с антибиотиками, Никкерсона и др.	10^{-1} , 10^{-4}	37°С 24–48 ч, аэробные

Краткая характеристика основных представителей микрофлоры кишечника

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

Бактероиды представлены гетерогенной группой микроорганизмов и включают палочковидные бактерии родов *Anaerorhabdus*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Bilophila* и мн. др. Некоторые виды потенциально способны вызывать патологические процессы, но подавляющее их число приходится на инфекции, вызванные видами *Bacteroides fragilis* (*B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. vulgaris*, *B. distasonis*). Грамотрицательные, подвижные или неподвижные палочки спор не образуют, строгие анаэробы. Палочки могут быть как морфологически сходными, мелкими, так и с заметным полиморфизмом. Ключевые признаки группы — способность расти в присутствии 20% содержания желчных кислот и резистентность к канамицину, ванкомицину и колистину. Культивирование бактериоидов представляет сложную задачу, требующую условий абсолютного анаэробноза, так как даже при кратковременном контакте с кислородом воздуха их рост прекращается.

Лактобактерии объединяют обширный род микроорганизмов, которые идентифицируют по некоторым фенотипическим признакам: способности образовывать газ при ферментации глюкозы. Лактобактерии чаще представляют собой грамположительные палочки длиной 4–5 мкм, располагаются поодиночке или короткими цепочками, неподвижны. Спор не образуют. Являются факультативными анаэробами или микроаэрофилами. Оптимальная температура инкубации 37°C в эксикаторе с использованием газогенераторного пакета.

Качественные изменения состава микробного пейзажа в кишечнике при дисбактериозе выражаются в изменении ряда свойств кишечной палочки — основного симбионта аэробной микрофлоры. Ферментативные свойства эшерихий: образуют индол, дают отрицательную реакцию Фогеса–Проскауэра и положительную с метилротом; не расщепляют мочевины и обычно не утилизируют цитрат аммония. Не разжижают желатин. Способность расщеплять лактозу — хорошо известное свойство *E. coli*, однако встречаются штаммы, не ферментирующие ее. Одним из характерных признаков является снижение ее антагонистических свойств. Кишечная

палочка часто утрачивает ферментативную активность и подвижность. Гемолизирующие эшерихии, выделенные от лиц с дисбактериозом кишечника, обладают, как правило, токсическими свойствами.

Энтерококк представляет собой диплококки удлиненной формы, более полиморфные, чем стрепто- и пневмококк; располагается по одиночке, группами и длинными цепочками. Окрашивается положительно по Граму, неподвижен, желатин не разжижает, молоко не створаживает. Энтерококк в отличие от стрептококка дает в бульоне диффузный рост. Доминирующими видами в кишечной флоре здорового человека являются *E. faecalis* и *E. faecium*. Внутривидовую дифференциацию энтерококков проводят по ферментативным, гемолитическим свойствам. Гемолизирующие энтерококки также способны вызвать пищевые отравления и дисбактериозы кишечника. Энтерококки выделяют из испражнений у 25% клинически здоровых особей.

Клостридии – один из многочисленных родов факультативной микрофлоры кишечника. Многие виды образуют сильные экзотоксины и являются патогенными для животных и человека. Имеют вид грамположительных палочек размером от 0,9 до 9 мкм, расположены одиночно, попарно, в виде цепочек или скоплений параллельных клеток. Чаще всего подвижны за счет перитрихальных жгутиков. Метаболически весьма разнообразны. Обычно каталазоотрицательны и облигатные анаэробы. Среди известных патогенных видов следует отметить *Clostridium difficile* — возбудитель, вызывающий псевдомембранозный энтероколит на фоне нерациональной терапии антибиотиками. Бактерии продуцируют 2 вида экзотоксина: токсин А (энтеротоксин) и токсин В (цитотоксин). Важный фактор патогенности *C. difficile* — адгезивная способность к клеткам эпителия толстого кишечника у человека и животных.

Стафилококки — повсеместно распространенные микроорганизмы, вызывающие поражения у человека и животных. Стафилококки неподвижны, факультативные анаэробы, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Восстанавливают нитриты, образуют H_2S , разлагают глюкозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, глицерин, маннит с выделением кислоты. По наличию коагулазы все стафилококки разделены на две группы: коагулазоположительные (*S. aureus*) и коагулазоотрицательные. Наиболее клинически значимый — *S. aureus*. Золотистый стафилококк часто входит в состав нормальной микрофлоры человека и животных.

Условно-патогенные микроорганизмы семейства кишечных не являются элементами облигатной микрофлоры, вместе с тем они обнаруживаются и у здоровых особей. Условно-патогенные микроорганизмы становятся возбудителями воспалительных заболеваний лишь при определенных условиях, снижающих резистентность микроорганизма. К ним относятся *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* и др. Все перечисленные представители семейства *Enterobacteriaceae* являются грамотрицательными, аэробными, подвижными или неподвижными палочками. Растут на обычных питательных средах, расщепляют глюкозу с образованием или без образования газа и редуцируют нитриты из нитратов. В здоровом кишечнике вышеперечисленные представители семейства *Enterobacteriaceae* встречаются непостоянно и в небольших количествах.

Кроме них могут встречаться бактерии рода *Pseudomonas*, дрожжеподобные грибы и некоторые другие транзиторные микроорганизмы. При одинаковой клинике

могут быть разные микробные ассоциации и наоборот. Дисбактериоз характеризуется ассоциацией разных представителей энтеробактерий, но по составу отличной от нормобиоценоза. Более того, состав микрофлоры при дисбактериозе более пестрый и содержит до 5 и более родов, не характерных для нормальной микрофлоры.