

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
Фармацевтический колледж

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Тема: Микробиологическая диагностика сальмонеллеза

по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

Выполнил: Юрьева Мария Сергеевна (Юрьева)

Руководитель: Жукова Марина Васильевна (М. Жукова)

Рецензент: Матушкина Светлана Витальевна (Матушкина)

Заведующая клинико-диагностической лаборатории «Центр лабораторных технологий АБВ»

Работа допущена к защите ЦМК «Лабораторных и
санитарно-гигиенических дисциплин»
Протокол № 9 от «28» мая 2018 г.

Красноярск 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	5
1.1. Исторические сведения	5
1.2. Общая характеристика	6
1.3. Характеристика заболеваний.....	11
1.3.1. Внутрибольничная сальмонеллезная инфекция	12
1.3.2. Пищевые токсикоинфекции.....	13
1.4. Статистические данные о заболеваемости сальмонеллезными инфекциями	15
ГЛАВА 2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	18
2.1. Способы сбора биоматериала	18
2.2. Методы выделения сальмонелл.....	19
2.3. Современный метод диагностики с помощью масс - спектрометра Vitek MS CLINICAL	20
2.4. Серологическая идентификация бактерий рода Salmonella.....	22
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	24
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	25
ЭЛЕКТРОННЫЕ РЕСУРСЫ.....	27
ПРИЛОЖЕНИЕ А	28
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	29
ПРИЛОЖЕНИЕ В	30
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	31
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	32
ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....	33

ВВЕДЕНИЕ

Рост количества возбудителей бактериальных инфекций человека, многообразие их свойств и неодинаковое медицинское значение требуют углубления знаний о бактериях, участвующих в развитии инфекционных процессов.

Кишечная инфекция - это достаточно большая группа острых кишечных инфекционных патологий, которые дифференцируются друг с другом по типу возбудителя.

Среди потенциально-опасных и опасных микроорганизмов, вызывающих кишечные инфекции, повышается доля антибиотикоустойчивых штаммов, что затрудняет их лечение. В распространении острых кишечных инфекций необходимым условием является санитарно-бактериологический анализ объектов окружающей среды: воды, почвы и выявление в них патогенных и условно-патогенных бактерий - возбудителей ОКИ.

Возбудителем ОКИ могут быть: бактерии (сальмонелла, шигелла, энтеропатогенные кишечные палочки), вирусы, простейшие.

Сальмонелла является возбудителем инфекционных заболеваний пищеварительной системы, объединенных под общим названием — сальмонеллезы.

Большинство сальмонелл патогенны как для человека, так и для животных. Их делят на монопатогенные и полипатогенные. К монопатогенным относятся возбудители брюшного тифа, паратифа А и паратифа В. этими заболеваниями болеет только человек. К полипатогенным относятся возбудители заболеваний, поражающие человека и животных.

Заболеваемость сальмонеллезами повсеместно имеет тенденцию к росту, особенно это касается крупных городов с централизованной системой продовольственного снабжения.

Дети первого года жизни наиболее восприимчивы к сальмонеллёзу, у них заболевание протекает в более тяжелой форме.

Для этого необходимо уделять должное внимание диагностике, профилактике и информированию о данном виде возбудителей.

Проблемой является не только широкое распространение сальмонеллы в окружающей среде, а также нарастающая резистентность к противомикробным препаратам.

Целью работы является выделение и идентификация возбудителей заболеваний, вызываемых бактериями рода *Salmonella*, при помощи современных методов диагностики.

Для достижения поставленной цели, я выделила следующие **задачи**:

1. Изучить общую характеристику рода *Salmonella*.
2. Проанализировать статистику заболеваемости населения сальмонеллезом по РФ.
3. Провести выделение и идентификацию бактерий рода *Salmonella*, при помощи современного метода диагностики, масс-спектрометрии.

Объект исследования: больной человек и бактерионоситель

Предмет исследования: кровь, испражнения, моча

База исследования: Центр лабораторных технологий АБВ

Актуальность: В настоящее время сальмонеллез занимает ведущее место среди инфекционных болезней. Поэтому очень велика опасность заражения сальмонеллезом человека от больных животных и через пищевые продукты. Своевременная диагностика и правильная постановка диагноза, важна, поскольку кишечные инфекции являются одной из причин летальности у детей.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1. Исторические сведения

Первых представителей рода *S.typhi* впервые обнаружил К. Эберт (1880) в селезёнке и лимфатических узлах человека, погибшего от брюшного тифа.

Г. Гаффки (1884) - впервые выделил чистые культуры брюшнотифозной палочки и подробно её описал. Э. Ашар в 1886 году вместе с У. Бансод при заболеваниях, сходных с брюшным тифом, выделили из гноя и мочи больных, бактерии, отличающиеся по биохимическим и серологическим свойствам от возбудителей брюшного тифа. Их классифицируют как *S.paratyphi* А и *S.paratyphi* В. Почти одновременно американский учёный Д. Сальмон (1885) впервые описал возбудителей холеры свиней (*S.choleraesuis*). В дальнейшем было описано множество сходных бактерий, для возбудителей был организован отдельный род в составе семейства *Enterobacteriaceae*, получивший, в честь ученого Д. Сальмона название *Salmonella*. Сальмонеллы представляют собой большую группу бактерий, систематика которых претерпевала значительные изменения по мере совершенствования знаний об их антигенной структуре и биохимических свойствах.

К *семейству* *Enterobacteriaceae* относится более 2000 различных бактерий, вызывающих заболевания человека и животных. Заболевания, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, называют сальмонеллёзами. Сальмонеллы сходны по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам, но отличаются по антигенной структуре.

В начале 30-х годов Ф. Кауффманн и П. Уайт предложили разделять сальмонеллы в соответствии с их антигенной структурой.

В настоящее время её применяют для дифференцировки сальмонелл. Сальмонеллы делят на монопатогенные и полипатогенные. К первым относятся возбудители брюшного тифа, паратифа А и паратифа В. Этими заболеваниями болеет только человек. Ко второй группе относятся возбудители заболеваний, поражающие человека и животных.

1.2. Общая характеристика

Морфология. Сальмонеллы - это мелкие 1,0-3,0x0,6-0,8мкм лактозонегативные, грамотрицательные палочки с закругленными концами, не образующие спор и капсул, в основном подвижные, имеют перитрихальные (по всей поверхности клетки) жгутики. (ПРИЛОЖЕНИЕ А)

Культивирование. Сальмонеллы относятся к факультативным анаэробам. Они не требовательны к питательным средам. Хорошо растут на простых питательных и желчесодержащих средах. На плотных средах могут образовывать колонии в R-форме (шероховатые) и S-форме (гладкие), на жидких дают диффузное помутнение. Хорошо растут на МПА и МПБ при температуре 37⁰ (от 20⁰ до 40⁰) и pH среды 7,2 - 7,4. На МПА образуют нежные, полупрозрачные, слегка выпуклые, блестящие колонии, в МПБ – равномерное помутнение.

При первичном посеве материала от больных (кал, моча, рвотные массы, кровь, желчь) часто отмечают медленный рост сальмонелл. Для их накопления производят посев на среды обогащения: селенитовый бульон, среду Мюллера, среду Кауфмана. Используют также элективные среды: желчь (10-20%) и среду Раппопорт.

На дифференциально-диагностических средах Эндо, ЭМС, Плоскирева сальмонеллы растут в виде бесцветных колоний, так как не расщепляют лактозу, входящую в состав среды. (ПРИЛОЖЕНИЕ Б)

На висмут-сульфитном агаре через 48 часов они образуют колонии черного цвета с металлическим блеском, оставляющие след после того, как их снимают петлей (кроме сальмонелл паратифа А). (ПРИЛОЖЕНИЕ В)

У свежевыделенных культур *S. paratyphi* В после инкубации в термостате в течение 18-20 часов и выдерживания при комнатной температуре в течение 1-2 суток на периферии колонии образуется слизистый вал.

Ферментативные свойства. Сальмонеллы ферментируют глюкозу, маннит, мальтозу с образованием кислоты и газа. Исключением является серотип *Salmonella typhi*, который газообразования не вызывает, расщепляет эти сахара только до кислоты. Сальмонеллы не ферментируют лактозу (на средах с этим углеводом – образуются бесцветные колонии) и сахарозу. Протеолитические свойства: большинство сальмонелл расщепляет белковые среды с образованием сероводорода (возбудители паратифа А отличаются отсутствием этого свойства). Индол не образуют. Желатин не разжижают.

Таблица 1 - Биохимические свойства сальмонелл

Вид бактерий	Тест								
	Лак-тоза	Глю-коза	Саха-роза	Ман-нит	Маль-тоза	Индол	H ₂ S	Лак-му-совое молоко	Же-ла-тин
<i>S.typhi</i>	-	К	-	К	К	-	+	К	-
<i>S. paratyphi</i> А	-	КГ	-	КГ	КГ	-	-	К	-
<i>S. paratyphi</i> В	-	КГ	-	КГ	КГ	-	+	Щ	-

Примечание: К - образование; КГ - образование кислоты; Щ - щелочение; + наличие свойства; - отсутствие свойства.

Токсигенность. Сальмонеллы содержат эндотоксин липополисахаридно-протеиновый комплекс.

Антигенная структура и классификация. Еще в начале XX века ученые заметили различную природу антигенов сальмонелл. Ф. Кауфман на основании результатов реакции агглютинации разных сальмонелл с набором сывороток разделил все сальмонеллы на группы и типы и предложил диагностическую схему их антигенной структуры.

В настоящее время для дифференциации сальмонелл применяют схему (серологическую классификацию) Кауфманна - Уайта. (ПРИЛОЖЕНИЕ Г)

Сальмонеллы содержат два антигенных комплекса: О и Н, О-антиген - липополисахариднопротеиновый комплекс; он термостабилен, инактивируется под действием формалина. Н-антиген связан со жгутиками, имеет белковую природу; он термолабилен, инактивируется под действием спирта и фенола, но устойчив к воздействию формалина.

Все сальмонеллы разделены на О-группы, каждая из которых характеризуется наличием определенных О-антигенов, обозначенных арабской цифрой (2, 4, 7, 8, 9 и т.д.) и дополнительных, общих для нескольких О-групп (1, 12). В настоящее время известно более 60 О-групп, обозначаемых прописными буквами латинского алфавита (А, В, С, D, Е и т.д.).

Брюшнотифозные сальмонеллы (*S. typhi*) обладают Н-; О- и Vi-антигенами, вызывающими в организме выработку Н-, О-, Vi-агглютининов; Н-агглютинины обуславливают крупнохлопчатую, О- и Vi-агглютинины - мелкозернистую агглютинацию. Vi-антиген, расположен в микробной клетке более поверхностно, чем О-антиген, и препятствует агглютинации культуры с О-сывороткой. Этот антиген термолабилен. Его присутствие связывали с вирулентностью возбудителя. Vi-антиген содержится также в клетках *S. paratyphi C*.

Ф. Эндрюс доказал, что жгутиковый Н-антиген неоднороден. Н-антиген состоит из двух фаз: первой (специфической) фазы, агглютинирующей специфической видовой сывороткой, и второй (неспецифической) фазы, агглютинирующей не только видовой, но и групповой сывороткой. Сальмонеллы, имеющие две фазы Н-антигена, называются двухфазными в отличие, от монофазных, имеющих только специфический Н-антиген.

Первая фаза Н-антигена, обозначают строчными буквами латинского алфавита: а, b, c, d, eh... u, z и т.д. Вторую фазу Н-антигена обычно обозначают арабскими цифрами: 1, 2, 5, 6, 7 и строчными латинскими буквами. Сочетание различных О - и Н-антигенов определяет антигенную структуру культур и их название.

В практической работе для определения антигенной структуры сальмонелл используют адсорбированные монорецепторные агглютинирующие сыворотки, которые содержат антитела к одному антигену. Ставят реакцию агглютинации на стекле и по наличию агглютинации с определенными сыворотками характеризуют антигенную структуру выделенной культуры. Например, культура агглютинирует с О-сыворотками «9» и «12» и Н-сывороткой «d»; находят в схеме серовар с таким антигенным составом (S.typhi), ставят дополнительно реакцию с Vi - сывороткой.

Имеются наборы специфических сальмонеллёзных фагов, которые лизируют только сальмонеллы соответствующего фаговара.

Таблица 2 - Антигенная структура возбудителей брюшного тифа и паратифов

Сальмонеллы	О-группа	О-антигены (соматические)	Н-антигены	
			Фаза 1	Фаза 2
Паратиф А	A	1, 2, 12	a	-
Паратиф В	B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
Тиф	D	1, 9, 12	d	-

Факторы патогенности. Основными факторами патогенности сальмонелл является их способность проникать в макрофаги и размножаться в лимфоидных образованиях собственно слизистого слоя тонкого кишечника (пейеровы бляшки, солитарные фолликулы), а также продукция эндотоксина.

Совокупность действия факторов патогенности обеспечивает сальмонеллам трансцитоз, т.е. инвазию слизистой через М-клетки, а также резистентность к фагоцитозу, позволяющую сальмонеллам сохраняться и размножаться внутри фагоцитов. Трансцитоз обеспечивается белками секреторной системы 3 типа. Особенность синтеза этих белков заключается в том, что он индуцируется в среде с высоким осмотическим давлением, соответствующим таковому в тонком кишечнике. Проникшие через рот сальмонеллы попадают в эпителиальные клетки двенадцатиперстной и тонкой

кишки посредством эндоцитоза без повреждения слизистой. Из М-клеток сальмонеллы транспортируются в субэпителиальное пространство, где захватываются макрофагами и переносятся в прилегающие к М-клеткам пейеровы бляшки, где размножаясь в макрофагах, формируют первичный очаг инфекции. Все сальмонеллы обладают эндотоксином, который вызывает развитие лихорадки в случае бактериемии, вызванной сальмонеллами.

Из слизистой оболочки сальмонеллы могут попадать в лимфо- и далее в кровоток, вызывая бактериемию. В большинстве случаев она носит транзиторный характер, т.к. сальмонеллы элиминируются фагоцитами.

В отличие от других сальмонелл, возбудители брюшного тифа и паратифов, проникнув в кровоток, способны выживать и размножаться в фагоцитах. Они могут размножаться в мезентериальных лимфоузлах, печени, селезенке и вызывать генерализацию процесса. После гибели фагоцитов сальмонеллы вновь поступают в кровь, при этом Vi-антиген ингибирует бактерицидные факторы.

Резистентность. Сальмонеллы довольно устойчивы к воздействию факторов внешней среды. Хорошо переносят низкие температуры, также устойчивы к высушиванию. Выдерживают pH в диапазоне 4 - 9; могут сохраняться в чистой воде и льду в течение нескольких месяцев; в водоемах, сточных водах, почве сохраняют жизнеспособность до 3 месяцев; длительно сохраняются в комнатной пыли - от 80 до 550 дней. В зараженных продуктах сохраняются: в копченном и соленом мясе – до 2 месяцев; в колбасе - 3 месяца; в замороженном мясе и яйцах - до 1 года; на овощах и фруктах - 5 - 10 дней. При нагревании до 56С⁰ сальмонеллы гибнут в течение 45 - 60 минут, при температуре 100С⁰ погибают мгновенно. Под действием дезинфицирующих веществ (2 - 5% фенол, 3 - 10% хлорамин, 3% лизол) сальмонеллы погибают в течение нескольких минут.

Восприимчивость животных. Большинство сальмонелл вызывает заболевания человека и многих видов животных и птиц (полипатогенные).

В естественных условиях животные тифом не болеют. *S. paratyphi* В иногда могут вызвать заболевание домашних животных и птиц.

Вызываемые заболевания. Попадая в ЖКТ, микроорганизм выделяет большое количество токсинов, вызывающих развитие симптомов болезни.

В зависимости от источника инфекции, путей передачи, особенностей патогенеза и форм проявления инфекционного процесса, различают такие заболевания как: брюшной тиф, паратифы А и В, пищевые токсикоинфекции, госпитальный (нозокомиальный) сальмонеллез, которые вызываются бактериями рода *Salmonella*.

1.3. Характеристика заболеваний

Сальмонеллез передается по фекально-оральному механизму преимущественно пищевым путем. Основное значение в эпидемиологии сальмонеллеза играют мясные и молочные продукты, птичьи яйца. Водный путь заражения реализуется в случае попадания сальмонелл в источники питьевой воды для скота в животноводческих хозяйствах. Контактнo-бытовой путь нередко имеет важное эпидемиологическое значение в случаях внутрибольничных инфекций. В городских условиях возможна реализация воздушно-пылевого пути заражения.

Люди обладают высокой восприимчивостью к сальмонеллезу. Степень тяжести развившейся инфекции зависит от комплекса факторов, как внешних (количество попавших в организм возбудителей, их антигенный состав и биологические особенности), так и внутренних (состояние защитных систем организма человека, сопутствующие патологии, в частности пищеварительной системы). Наиболее тяжело инфекция протекает у младенцев (особенно недоношенных) и лиц пожилого возраста. Постинфекционный иммунитет нестойкий, сохраняется не более года.

1.3.1. Внутрибольничная сальмонеллезная инфекция

Возбудителем внутрибольничного сальмонеллеза чаще всего является *S. typhimurium*. Однако нередко заболевания, вызываемые другими сероварами (*S. derby*, *S. heidelberg*, *S. wien*, *S. haifa* и др.) Эти сальмонеллы по своим морфологическим, физиологическим, биохимическим и антигенным признакам не отличаются от бактерий - возбудителей пищевых токсикоинфекций, имеются некоторые биологические особенности, характерные для них. Так, например, возбудители внутрибольничных инфекций относятся к определенным биоварам, они более патогенны для белых мышей и т. п.

Источники инфекции. Чаще бактерионоситель, реже больной.

Пути передачи. Распространение внутрибольничных сальмонеллез происходит тремя путями: контактно-бытовым, воздушно-пылевым и пищевым. Наиболее распространен контактно-бытовой путь передачи инфекции.

Патогенез. Проявления болезни разнообразны и варьируют от бессимптомного бактерионосительства и легчайших субклинических форм до выраженных интестинальных расстройств с тяжелой интоксикацией, бактериемией, иногда с генерализацией процесса и развитием осложнений.

Внутрибольничные сальмонеллезы у детей раннего возраста протекают более тяжело и длительно. Они сопровождаются значительной интоксикацией и более глубокими поражениями желудочно-кишечного тракта, а также бактериемией и развитием токсико-септических и даже септико-дистрофических состояний. У детей старше 3 лет часто отмечаются легко протекающие кишечные формы и бессимптомное бактерионосительство.

Сальмонеллезная интоксикация нарушает функции гипоталамуса и обменные процессы. При этом дети грудного возраста теряют большое количество солей и воды, что приводит к возникновению токсикоза и обезвоживанию организма.

У детей старше 1 года может наступить синдром нейротоксикоза. Особенно опасно для детей раннего возраста присоединение сальмонеллезов к стафилококковой инфекции, респираторной вирусной инфекции, пневмонии, эшерихиозу. Часто у таких больных развивается сепсис смешанной этиологии или менингит.

Иммунитет. Вырабатываются только по отношению к одному серовару сальмонелл.

Профилактика. Строгое соблюдение санитарно - гигиенического режима в лечебных учреждениях. С целью специфической профилактики используют поливалентный сальмонеллезный фаг. Его вводят детям в стационарах, контактировавшим с больными сальмонеллезами и носителями. Получают фаг также матери, находящиеся в тесном контакте с больными детьми.

Лечение. Назначают комплексное, этапное и патогенетически обоснованное. При проведении лечебных мероприятий необходимо учитывать возраст больного, период и тяжесть заболевания, сопутствующие заболевания. При генерализации сальмонеллезной инфекцией назначают антибиотики.

1.3.2. Пищевые токсикоинфекции

При употреблении продуктов, зараженных сальмонеллами различных сероваров (*S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. enteritidis* и др.), возникают пищевые токсикоинфекции.

Источники инфекции. Основными факторами передачи сальмонеллеза являются мясо и мясные продукты, на долю которых приходится свыше 60% всех случаев сальмонеллеза.

Животные и птицы, больные сальмонеллезами, или здоровые, в организме которых, не причиняя им вреда, находятся сальмонеллы. Связь заболеваний с употреблением яиц и яичных продуктов встречается в 8%, а с употреблением рыбных продуктов - в 3,5% вспышек.

Яйца куриные, утиные и других птиц могут инфицироваться сальмонеллами не только в окружающей среде, но и в ячниках, яйцеводах больных птиц. В белке яйца содержится лизоцим, обладающий бактерицидным действием. В желтке бактерицидных веществ нет, и поэтому сальмонеллы долго сохраняются в нем.

Пути передачи. Основной путь передачи - пищевой. Заражение происходит при употреблении мяса, мясных продуктов, яиц, молока, молочных продуктов, инфицированных сальмонеллами.

Патогенез. Попав в организм через рот, сальмонеллы проникают в пищеварительный тракт. При этом значительная часть бактерий погибает и освобождается эндотоксин, который может проникнуть в кровь. Появляются симптомы поражения желудочно-кишечного тракта и общего токсикоза. Заболевание длится не более 4 - 5 дней; иногда переболевшие становятся носителями сальмонелл. (ПРИЛОЖЕНИЕ Д)

Иммунитет. Непродолжительный. В крови больных накапливаются различные антитела: агглютинины, преципитины и т. п.

Профилактика. Постоянный строгий ветеринарно-санитарный контроль за скотом, убоем и разделкой туш, хранением и обработкой мяса и мясных продуктов. Необходимо строгое соблюдение санитарно-гигиенического режима и личной гигиены на предприятиях общественного питания.

Специфическая профилактика. Людям, находящимся в очагах пищевой токсикоинфекции, следует давать сальмонеллезный поливалентный бактериофаг.

Лечение. Основным терапевтическим средством является дезинтоксикация организма - введение большого количества жидкости, промывание желудка. Применяют также антибиотики.

1.4. Статистические данные о заболеваемости сальмонеллезными инфекциями

Острые кишечные инфекции (ОКИ) по-прежнему занимают одно из ведущих мест в структуре инфекционной заболеваемости и экономической значимости инфекционных болезней в Российской Федерации. Количество обратившихся в отношении заболеваемости ОКИ, можно увидеть на сравнительной диаграмме 2015 - 2016 год.

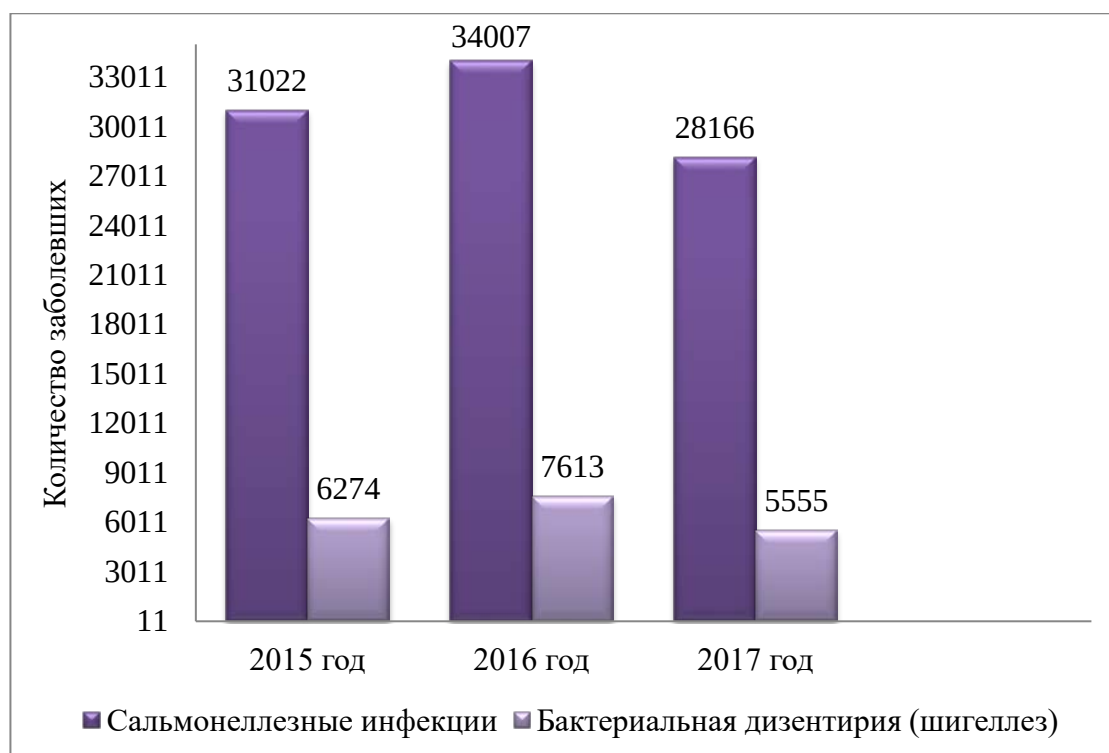


Рисунок 1 - Структура заболеваемости ОКИ, вызванные патогенными энтеробактериями

За январь-октябрь 2017 г. по сравнению с аналогичным периодом 2016 г. в Российской Федерации зарегистрировано снижение заболеваемости по следующим нозологическим формам: сальмонеллезные инфекции – на 17,4%, бактериальная дизентерия (шигеллез) – на 27,2%

Внутригодовая динамика заболеваемости людей сальмонеллезами не имеет очевидной закономерности, хотя летом уровень несколько возрастает. По-видимому, это связано с большими трудностями при сохранении готовой продукции (готовых блюд) из-за высокой температуры и выездами для летнего

отдыха в места, где трудно обеспечить сохранность готовой продукции. В летнее время растет и число вспышек. Число обратившихся наблюдается в сравнительной диаграмме.



Рисунок 2 - Динамика сальмонеллезных инфекций в РФ на 100 тыс. населения, 2010-2017 г.

По данным выявлено, что в 2017 году число обратившихся снизилось, в 1.2 раза, чем в 2016 году и в 2 раза меньше, чем в 2010 году, это за аналогичные периоды времени. Это объясняется такими причинами, которые показывают, что была грамотно проведена осведомительная беседа с населением на тему профилактики сальмонеллёза.

Распределение заболеваемости острыми кишечными инфекциями по территории Российской Федерации неравномерное и зависит от уровня диагностики, состояния питьевого водоснабжения, качества безопасности продуктов питания, выпускаемых и реализуемых для населения.

Значительный интерес представляют *S. Enteritidis*, циркулирующих в регионах Сибири и Дальнего Востока. Установлено, что в этих регионах циркулируют три основных плазмидо-вариантов, имеющих повсеместное распространение. При этом прослеживается четкая связь с местом производства и реализации птицеводческой продукции.

Процентное отношение видов сальмонелл по Красноярскому краю, на базе «Центра лабораторных технологий АБВ» представлены на сравнительной диаграмме за период с 2016 – 2018 гг.

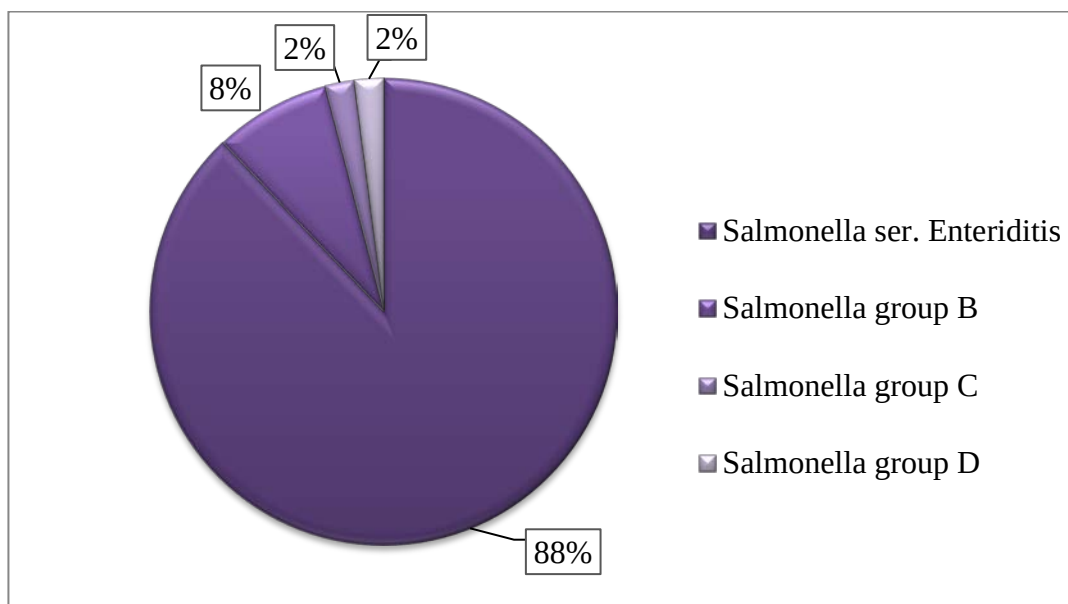


Рисунок 3 - Статистические данные, базы практики "Центр лабораторных технологий АБВ" в период 01.09.2016 – 15.05.2018 гг.

Из общей структуры исследований на сальмонеллез, на основании статистических данных базы практики «Центр лабораторных технологий АБВ», выявлено, что в период с 01.09.2016 – 15.05.2018 , на 10908 исследований было выделено 149 сальмонеллезных больных, из них 88 процентов приходится на Salmonella Enteritidis.

ГЛАВА 2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторным критерием диагноза сальмонеллеза является выделение возбудителя (сальмонелл).

Показания к исследованию:

Исследование на сальмонеллез проводят с целью диагностики заболеваний, выявления сальмонеллоносительства, определения соответствия гигиеническим требованиям безопасности пищевых продуктов, выявления обсемененности объектов внешней среды.

В зависимости от стадии болезни исследуют разный материал: испражнения, кровь, моча, дуоденальное содержимое. При токсикоинфекциях материалом для исследования могут служить промывные воды желудка, рвотные массы, остатки пищевых продуктов.

Я для достижения поставленной цели на базе практики «Центра лабораторных технологий АБВ» исследовала испражнения.

2.1. Способы сбора биоматериала

Сбор биоматериала осуществляется в одноразовые стерильные сухие пробирки с вмонтированным зондом-тампоном (тубсеры) и с транспортной средой Stuart. Сохранять собранный материал в транспортной системе со средой Stuart можно до нескольких дней (лучше на холоде).

При отборе проб необходимо исключить возможность контаминации их за счет смежных областей кожи, других органов, внешней среды и т.п.

Испражнения собирают сразу после дефекации с помощью стерильной стеклянной палочки или деревянного шпателя. При наличии патологических примесей (слизь, кровь, гной и т.п.) их включают в отбираемую пробу. В случае невозможности получения испражнений после дефекации материал берут

непосредственно из прямой кишки с помощью "зонд тампона", вводя его в кишку на 8-10 см. Тампон помещают в пробирку с консервантом.

2.2. Методы выделения сальмонелл

Основной метод исследования сальмонелл – микробиологический, который включает в себя 2 вида исследований:

- Бактериологический
- Серологический

После подготовки материала от больных к исследованию производят его посев на среду обогащения. Непосредственный высев материала из среды обогащения до ее инкубирования в термостате может заменить прямым высевам на дифференциально-диагностические среды.

Методика посевов на питательные среды приведена в таблице 3.

Таблица 3 - Методика посева кала на сальмонеллез

Питательная среда	Инкубация	Метод посева
S/S агар	37°C	При посеве тщательно втирают в среду со всех сторон тампона на участке 2 x 1 см ² у края чашки, стараясь оставить весь патологический материал на поверхности формируемой «площадки». Дальнейший рассев исследуемого материала осуществляется этим же тампоном, не отрывая его от поверхности питательной среды.
Селенитовый бульон (Магниева среда) 3,5 мл		После посева исследуемого материала на S/S агар, поместить тампон в пробирку с 3,5 мл селенитового бульона (магниева среда)
ВСА (висмут-сульфитный агар)		Высев с селенитового бульона производится методом «площадки»

Характер роста сальмонелл на указанных средах приведен в таблице 4.

Таблица 4 - Характер роста сальмонелл на дифференциально-диагностических средах

Название среды	Вид колоний сальмонелл
SS агар	С черным центром
Висмут сульфит агар	Черные, среда под колонией прокрашивается. Некоторые серовары сальмонелл (<i>S.paratuberculosis</i> A, <i>S.gallinarum</i> могут быть слегка зеленоватыми)

Идентификация сальмонелл

После 18 - 20 часового инкубирования чашек с дифференциально-диагностическими средами (висмут-сульфит агар 48 час.) производится учет характера роста с отбором 3 - 5 подозрительных колоний на идентификацию бактерий бактериологическим анализатором (масс-спектрометр Vitek MS CLINICAL).

2.3. Современный метод диагностики с помощью масс - спектрометра Vitek MS CLINICAL

Масс-спектрометрия - метод идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду (m/z) в ионизированном состоянии.

Структурная схема масс-спектрометра достаточно проста. В состав прибора входит три основных узла: генератор ионов, система разделения ионов (также называется анализатором) и детектор. Органические и неорганические вещества, которые нужно исследовать, первоначально состоят из нейтральных молекул и атомов. В приборе происходит их разделение на заряженные частицы-ионы.

Затем с помощью анализатора поток ионов разделяется в пространстве и времени, а на детекторе фиксируются полученные сигналы от заряженных частиц. (ПРИЛОЖЕНИЕ Е)

Масс – спектрометр Vitek MS CLINICAL определяет спектр белков напрямую из бактериальной клетки без предварительной длительной пробоподготовки. Для каждого вида микроорганизмов сформирован характерный набор белков (биомаркеров), полученный на основе анализа не менее 50 масс-спектров этого вида. При этом образцы получены из различных источников (больниц, лабораторий, микробиологических коллекций), а каждый образец тщательно идентифицирован с помощью секвенса 16s РНК или других сертифицированных методов анализа. Структурированная таким образом база данных позволяет быстро и точно идентифицировать микробиологические штаммы.

Вся методика идентификации на Vitek MS CLINICAL состоит из 2-х этапов:

Этап 1. Подготовка образца

Анализ начинается с того, что на подложке масс-спектрометра смешивают биоматериал из колонии бактерий и специальную матрицу (2',5' дигидроксibenзойная кислота), раствор уже готов к использованию и устойчив к свету). Затраты по времени для подготовки 24 изолятов - 10 минут, для 96 изолятов - 33 минуты.

Этап 2. Идентификация

После этого образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и аналита (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам.

Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация

микроорганизмов. Затраты по времени для идентификации 24 изолятов - 12 минут, для 96 изолятов - 43 минуты.

Таким образом, на идентификацию одного микроорганизма требуется меньше 2-х минут времени, при этом образцом может служить первичная колония. База данных Vitek MS состоит из 755 клинически значимых видов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов/дерматофитов, микобактерий) и покрывает большинство видов, встречающихся в ежедневной практике микробиологической лаборатории, и эта база постоянно пополняется.

Главные преимущества анализатора Vitek MS:

- Заменяет стандартные биохимические методы
- Достоверный результат за две минуты
- Высокая воспроизводимость анализа
- Значительная экономия средств (стоимость 1 исследования складывается из стоимости одноразовых планшет и матрикса)

Масспектрометр Vitek MS CLINICAL определяет только род *Salmonella*, затем для определения вида применяется серологическая идентификация бактерий рода *Salmonella* в реакции агглютинации на предметном стекле.

2.4. Серологическая идентификация бактерий рода *Salmonella*

Серологическая идентификация бактерий рода Salmonella в реакции агглютинации на предметном стекле.

Серологическую идентификацию сальмонелл начинают с испытания их в реакции агглютинации на стекле с агглютинирующей адсорбированной поливалентной сывороткой к сальмонеллам групп А, В, С, Д, Е, а в случае получения отрицательного результата с агглютинирующей адсорбированной поливалентной сывороткой к сальмонеллам редких групп. При получении положительных результатов агглютинации со смесью О-сывороток, культуру испытывают с каждой О-сывороткой, входящей в смесь.

После установления принадлежности культуры к одной из О-групп, выявляют наличие дополнительных О-антигенов, присущих представителям указанной группы.

После этого проводят реакцию агглютинации с Н-сыворотками. При этом вначале используют Н-сыворотки, соответствующие Н-антигенам 1 фазы, а потом Н-антигенам 2 фазы. Начинать следует с Н-сывороток, соответствующих более распространенным сероварам данной группы.

Способ постановки реакции агглютинации на предметном стекле.

На предметное стекло наносят пипеткой каплю растворенной сыворотки, вблизи нее петлю культуры, выращенной в течение 18 - 24 часов на питательном скошенном агаре и растирают ее в сыворотке. Для определения О-антигена следует брать культуру с верхней части скошенного агара, а для определения Н-антигена - с нижнего участка роста (наиболее подвижные особи).

Учет результатов реакции агглютинации производят в течение 2 - 3 мин при помощи лупы с увеличением (2х) по четырехкрестной системе:

- ++++ - отчетливый агглютинат при полном просветлении жидкости;
 - +++ - отчетливый агглютинат на фоне мутноватой жидкости;
 - ++ - незначительный агглютинат на фоне мутной жидкости;
 - +
 -
- незначительное количество агглютината на фоне мутной жидкости;
- гомогенная мутная жидкость

*Положительной считается реакция агглютинации интенсивностью не менее, чем на +++.

Таким образом, на базе практики «Центр лабораторных технологий АБВ», современными методами диагностики я выявила по антигенной структуре бактерий сальмонеллезной группы - *S. enteritidis* (О – антиген 1, 9, 12; Н – антиген в 1-ой фазе g, m)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований:

1. Изучила общую характеристику (морфологию, культивирование, ферментативные свойства, факторы патогенности, резистентность, вызываемые заболевания) рода *Salmonella*.
2. На основании анализа статистики заболеваемости населения сальмонеллезом я пришла к выводу, что:
 - Заболевание сальмонеллезом за последние 8 лет имеет выраженную тенденцию снижения.
 - Наиболее распространен вид *S. enteritidis*.
 - Случаи заболевания регистрируются в течение всего года, чаще всего – в летнее/осеннее время года.
3. Изучила современный метод диагностики сальмонелл. На базе практики «Центр лабораторных технологий АБВ» современным методом диагностики с помощью масс-спектрометра Vitek MS CLINICAL и серологической идентификации бактерий рода *Salmonella* в реакции агглютинации на предметном стекле выявила *S. enteritidis*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические указания МУ 4.2.2723-10 "Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 13 августа 2010 г.)
2. Методические указания утв. Минздравом СССР 17.12.1984 N 04-723/3 по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями (действуют до сих пор)
3. Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е. Применение Maldi-tof масс-спектрометрии в клинической микробиологии. 2014. - 28 с.
4. Бережнова И.А. Инфекционные болезни. - Москва, 2007. - 292 с.
5. Воробьев А.А., Быков А.С. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии 2013. – 127с.
6. Ганина В.И. Техническая микробиология продуктов животного происхождения: Учебное пособие / В.И. Ганина, Н.С. Королева, С.А. Фильчакова. - М.: ДеЛи принт, 2008. - 352 с.
7. Госманов Р.Г. Микробиология и иммунология: учебное пособие. 2-е изд., пер. и доп. / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова, А.К. Галиуллин. - СПб.: Лань, 2013. - 240 с.
8. Джей Д.М. Современная пищевая микробиология / Д.М. Джей, М.Д. Лесснер, Д. Гольден. - М.: Бином, 2014. - 686 с.
9. Емцев В.Т Мишустин Е.Н. Микробиология: Учебник для вузов /— 5-е изд.; перераб. и доп. - М.Дрофа. 2008. – 448 с.
10. Кисленко В.Н., Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология. Общая микробиология 2009. – 397 с.
11. Кочемасова З.Н. Микробиология: учебник для студентов фармацевтических институтов стер. / З.Н. Кочемасова, С.А. Ефремова, Ю.С. Набоков. - М.: Альянс, 2014. - 352 с.

12. Красникова Л.В. Микробиология: Учебное пособие / Л.В. Красникова. - СПб.: Троицкий мост, 2012. - 296 с.
13. Мальцев, В.Н. Медицинская микробиология и иммунология: Учебник / В.Н. Мальцев Е.П. Пашков. - М.: Практическая медицина, 2014. - 512 с.
14. Мартинчик А.Н. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебник для студентов сред. проф. учебных заведений / А.Н. Мартинчик, А.А. Королев, Ю.В. Несвижский. - М.: ИЦ Академия, 2013. - 352 с.
15. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. Учебник. 2009. – 345 с.
16. Просеков А.Ю. Общая биология и микробиология: Учебное пособие / А.Ю. Просеков. - СПб.: Просп. Науки, 2012. - 320 с.
17. Прунтова О.В., Мазиров М.А. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. В 2 ч. Ч. 2 / ; Владим. гос.ун-т. - Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2008. - 108 с.
18. Рогов И.А., Антипова Л.В. Химия пищи. Учебник 2008. – 428 с.
19. Рубина Е.А. Микробиология, физиология питания, санитария: Учебное пособие / Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. - М.: Форум, НИЦ ИНФРА-М, 2013. - 240 с.
20. Сидоренко О.Д., Борисенко Е.Г., Ванькова А.А., Войнова Л.И. Микробиология: Учебник для вузов - М.: Инфа М, 2008. - 287 с.
21. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: Учебник для вузов. - М., 2009. - 415 с.
22. Шабанова В. А. Пищевые инфекции. Дизентерия, сальмонеллез, лямблиоз, аскаридоз. - Слог, 2014. - 135 с.

ЭЛЕКТРОННЫЕ РЕСУРСЫ

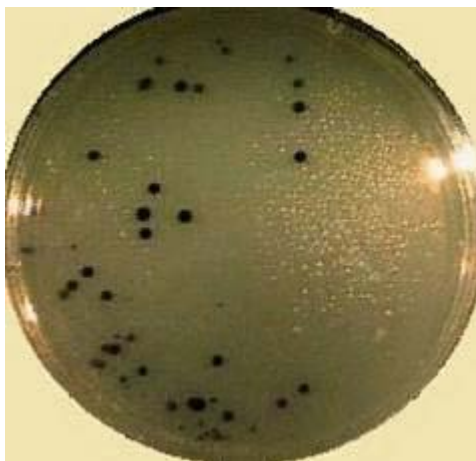
1. Медицинский справочник болезней [Электронный ресурс]:- Режим доступа: <http://www.krasotaimedicina.ru/diseases/http://www.krasotaimedicina.ru/diseases/infectious/salmonellosis>. - Загл. с экрана.
2. Энциклопедия заболеваний [Электронный ресурс]: - Режим доступа: <http://vlanamed.com/kishechnaya-infektsiya/>. - Загл. с экрана.
3. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [Электронный ресурс]: - Режим доступа: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statisticalmaterials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=8812. - Загл. с экрана.
4. Электронный фонд правовой и нормативно технической документации [Электронный ресурс]: -Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/12000446>. -Загл. с экрана.
5. Научно-практический рецензируемый медицинский журнал [Электронный ресурс]: - Режим доступа: <http://transmed.almazovcentre.ru/jour/article/view/33/34>. - Загл. с экрана.



Морфология сальмонелл



Культивирование сальмонелл на среде ЭНДО



Рост сальмонелл на висмут - сульфитном агаре

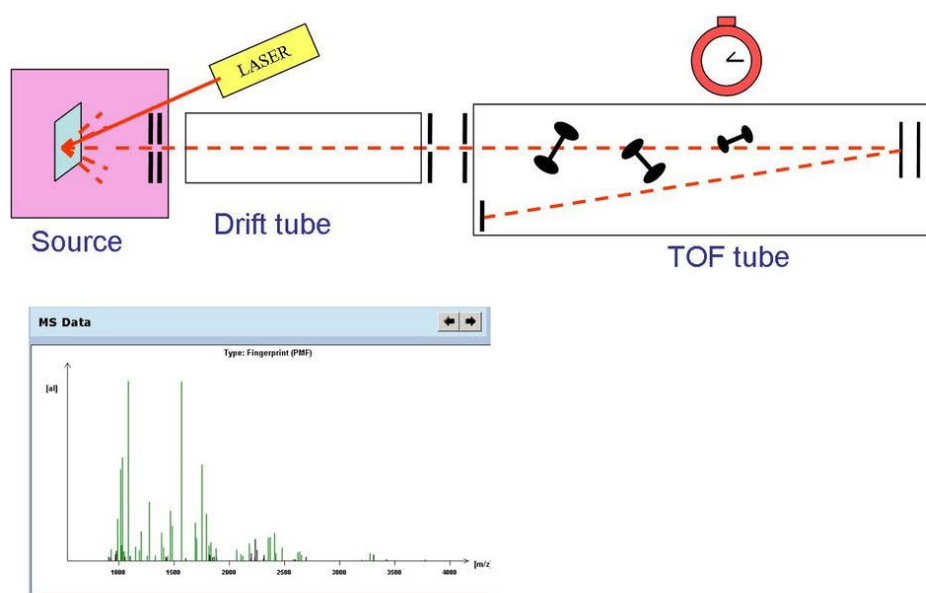
ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Краткая классификация сальмонелл по антигенной структуре Клауфмана-Уайта

Название серовара	Серогруппа	Антиген		
		О	Н	
			Фаза 1	Фаза 2
<i>S. paratyphi</i> A	A	1, 2, 12	a	-
<i>S. derby</i>	B	1, 4, 5, 12	f, g	1, 2
<i>S. haifa</i>		1, 4, (5), 12	z ₁₀	1, 2
<i>S. paratyphi</i> B		1, 4, 12	b	1, 2
<i>S. typhimurium</i>		1, 4, 12	i	1, 2
<i>S. infants</i>	C ₁	6, 7	R	1, 5
<i>S. choleraesuis</i>		6, 7	C	1, 5
<i>S. virchow</i>		6, 7	R	1, 5
<i>S. newport</i>	C ₂	6, 8	eh	1, 2
<i>S. dublin</i>	D	1, 9, 12 (vi)	g, p	-
<i>S. enteritidis</i>		1, 9, 12	g, m	-
<i>S. panama</i>		1, 9, 12	e, v	1, 5
<i>S. typhi</i>		1, 9, 12 (vi)	d	-
<i>S. anatum</i>	E ₁	3, 10	ch	1, 6



Механизм заражения сальмонеллезом



Структурная схема масс - спектрометра