

МЕТОДИКИ

УДК 57.083.18:579.842.15 Shigella

АЛГОРИТМ ИДЕНТИФИКАЦИИ АТИПИЧНЫХ МАННИТНЕГАТИВНЫХ ШИГЕЛЛ ЗОННЕ

А.П.Бондаренко¹, В.А.Шмыленко¹, Т.Н.Тригорлова², О.Б.Бондарь²,
И.В.Чишагорова²

¹ ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии

² ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае»

Длительный и массивный очаг дизентерии Зонне в детском доме – интернате г. Бикина в 2012-2014 гг. и повышенная заболеваемость дизентерией в г. Хабаровске в 2012 г. были обусловлены атипичным возбудителем. Его идентификация представляет определённые трудности. Разработан алгоритм идентификации атипичных маннитнегативных шигелл Зонне.

Ключевые слова: маннитнегативные шигеллы, алгоритм идентификации.

Algorithm of identification of atypical mannitol negative Shigella Sonne

A.P. Bondarenko¹, V.A. Shmilenko¹, T.N. Trigorlova², O.B. Bondar², I.V. Chishagorova²

¹Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of Federal service for surveillance on customer rights protection and human wellbeing (Rosпотребнадзор)

²Khabarovsk Region Hygiene and Epidemiology Center

Long lasting and massive focal point of Sonne dysentery in an orphan asylum of Bikin city in 2012-2014 and evaluated morbidity on dysentery in Khabarovsk city were caused by circulation of atypical infectious agent. It is hard to diagnose such pathogen. Our research group has developed an algorithm of identification of atypical mannitol negative Shigella Sonne what is described in the article.

Key words: mannitol negative Shigella, algorithm of identification.

Введение:

В последние годы в Российской Федерации регистрируется низкий уровень заболеваемости дизентерией Зонне. Аналогичная тенденция отмечается и в Хабаровском крае. В 2009 г. показатель заболеваемости составил 0,29 на 100 тысяч населения Хабаровского края. Ситуация начала меняться с 2010 г. Рост заболеваемости в крае в 2010 г. был связан со вспышкой дизентерии Зонне (молочный фактор) в посёлке Троицком (показатель заболеваемости 8,71 на 100 тысяч населения Хабаровского края и 238,8 на 100 тысяч населения Нанайского района). В 2011 году активизировались очаги дизентерии в районах края (показатель заболеваемости 6,14 на 100 тысяч населения). В 2012 г. также отмечались спорадические и групповые случаи заболеваний в 9 сельских поселениях Хабаровского края, в г.Хабаровске, в г. Бикине (7,23 на 100 тысяч населения Хабаровского края).

Так, в этот период длительный и массивный очаг дизентерии Зонне - с октября 2012 г. по сентябрь 2014 г. наблюдался в г. Бикине в детском доме – интернате для умственно отсталых детей (ДДИ) (показатель заболеваемости 95,95 на 100 тысяч населения Бикинского района). В ходе детального изучения культур, выделенных в период вспышки, выявлено важное отличительное свойство штаммов: все они были маннитнегативными. Эта особенность характеризует штаммы как атипичные.

Аналогичные культуры были выделены также при спорадических случаях, из семейных и школьных очагов дизентерии в г. Хабаровске. На территории Дальнего Востока, маннитнегативные возбудители не регистрировались в течение 40 лет наблюдения [1].

Как показал наш опыт работы, а также результаты решения контрольных бактериологических задач в учреждениях Роспотребнадзора Дальневосточного Федерального Округа (ДФО), идентификация таких культур представляет определённые трудности.

Цель работы Разработать алгоритм идентификации маннитнегативных шигелл Зонне.

Материалы и методы

Первичное выделение культур было выполнено на базе бактериологических лабораторий ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае», МУЗ «Детская инфекционная клиническая больница» им.А.К.Пiotровича, КГБУ «Бикинская центральная районная больница».

Выделение и идентификацию шигелл проводили общепринятыми методами.

Углублённое изучение культур проведено в бактериологической лаборатории ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора.

Всего была выделена 161 культура шигелл Зонне от 103 больных дизентерией и контактных лиц, в том числе от 81 больного из эпидемического очага в ДДИ г.Бикина и 22-х больных из спорадических и групповых очагов дизентерии в г.Хабаровске.

Для разработки алгоритма использованы материалы нормативных документов, справочных пособий, руководств и собственных наблюдений [2,3,4,5,6].

Результаты и обсуждения

Установление факта циркуляции «атипичного возбудителя» не преследует цель соблюдать микробиологические классификационные тонкости. В данном случае маннитнегативный признак является маркером «завозного» штамма и сигналом целенаправленного поиска необычного источника инфекции.

В этой связи наш опыт работы с атипичными штаммами отражён в предложенном нами алгоритме идентификации маннитнегативных шигелл Зонне.

Основным нормативным документом по методам идентификации шигелл являются «Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями», Москва, 1984г. [3]. В них представлены типичные свойства возбудителей. Более детальная характеристика биологических свойств шигелл, в том числе отклонения от типичных признаков, изложены в монографиях, руководствах, справочных пособиях, изданных в 1985-2009 г.г. [4,5,6].

Следует отметить, что предыдущий нормативный документ [2] уже содержал информацию о возможных отклонениях от типичных характеристик, но в ныне действующие МУ эти важные характеристики не вошли.

Восполняя этот пробел, мы представили эту информацию (таблица 1).

Таблица 1

Отклонения от признаков закономерно присущих шигеллам

(Цит.: Рук-во «Энтеробактерии», 1985г. [6])

Закономерность	Отклонения
маннит – гр.А	маннит + гр.А <i>S.dysenteriae</i> 3-7 (отдельные наблюдения)
маннит + гр.В,С,Д	маннит – гр. Д <i>S.sonnei</i> гр.В <i>S.flexneri</i> 2а, 4а гр.С <i>S.boydii</i> 6,9,10,14,15
газ – все шигеллы	газ + <i>S.boydii</i> 13,14
ацетат – все шигеллы	ацетат + <i>S.flexneri</i> 4а, 4а маннит -
ксилоза – <i>S.flexneri</i>	ксилоза + <i>S.flexneri</i> 4а маннит -

Таблица начинается с описания отклонений в характеристике шигелл по отношению к манниту. Как известно, способность утилизировать маннит, наряду с антигенными характеристиками, положена в основу классификации шигелл, подразделяющихся на маннитнегативную группу (шигеллы группы А) и маннитпозитивную (группы В,С,Д). Из таблицы 1 следует, что в группе законных маннитнегативных шигелл встречаются маннитположительные варианты (по отдельным наблюдениям). И, напротив, в группе маннитположительных шигелл встречаются маннитнегативные варианты.

Приведены и другие отклонения в характеристиках, закономерно присущих тому или иному виду, подвиду, серотипу.

В случае выделения атипичных (по отношению к манниту) культур, подозрительных на шигеллы, алгоритм диагностики должен включать следующие этапы:

1. Подтвердить наличие атипичного признака путём повторного испытания отличающегося штамма на субстрате (манните) в сопровождении контролей (заведомо «+» и «-» штаммы).

2. При получении неясного результата повторного тестирования штамма по маннит-признаку на среде «полужидкий маннит с индикатором воднорозоловым (ВР)» - повторить исследование на среде «полужидкий маннит с индикатором бромтимоловым синим», но надёжней приготовить жидкий маннит с индикатором бромтимоловым синим в условиях лаборатории, используя в качестве субстрата химически чистый маннит (таблица 2).

Таблица 2

Характер роста маннитнегативных шигелл на различных маннит содержащих средах (изменение цвета среды) в сопровождении контролей

(Материалы ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора)

№ п/п	Среда	Исходный цвет среды	Контрольные штаммы		Маннит негативные штаммы
			E.coli «+»	Providencia «-»	
1.	Маннит полужидкий с индикатором ВР(воднорозоловым)	Серовато-розовый	Синий	Розовый	Серовато-розовый с голубизной (сомнительный результат)
2.	Маннит полужидкий с индикатором бромтимоловым синим	Сине-зелёный	Жёлтый	Сине-зелёный	Сине-зелёный с желтизной по ходу укола (сомнительный результат)
3.	Маннит жидкий с индикатором бромтимоловым синим	Сине-зелёный	Жёлтый	Сине-зелёный	Сине-зелёный (чёткий результат)

3. Подтвердить принадлежность выделенного штамма к роду шигелл, виду *S.sonnei*. Для чего провести изучение штамма по всем признакам, указанным в таблице 3, затем установить соответствие полученных характеристик штамма, особенно по опорным признакам (обозначены жирным шрифтом), характеристикам табличного варианта.

Таблица 3

Биохимические свойства бактерий *S. sonnei* (маннитнегативные варианты)

(Цит.: Рук-во «Энтеробактерии», 1985г.[6])

Тест, субстрат	Реакция	Тест, субстрат	Реакция
Рост на среде Эндо	лактоза - R и S формы	Фенилаланиндеаминаза	-
Окраска по Граму	г- палочки	Ацетат Na	-
Оксидаза	-	Цитрат Симмонса	-
OF тест	+/+	Лизин	-
Среда Клиглера	глюкоза + лактоза - H ₂ S-	Аргинин	-
Глюкоза	к	Орнитин	+
Лактоза	-	β-галактозидаза	+
Маннит	+/(+)	Малонат Na	-
Сахароза	-	Метил рот	+
Мальтоза	+	р.Фогес-Проскауэра	-
Адонит	-	Подвижность при 37°C	-
Инозит	-	Подвижность при 22°C	-
Индол	-	Проба с дизентерийным поливалентным бактериофагом	+
H ₂ S	-	Агглютинация диагностическими сыворотками к шигеллам Зонне	+
Мочевина	-		

4. Провести дифференциацию между выделенным атипичным штаммом бактерий и сходными по признаку маннитнегативности прочими бактериями (протеи, ацинетобактер, псевдомонады, плезиомонады) (таблица 4).

Таблица 4

Дифференциация маннитнегативных шигелл Зонне от сходных маннитнегативных бактерий
(Цит.: Меньшиков В.В., 2009 г.[4])

	<i>S.sonnei</i>	<i>Proteus</i>	НФБ		
			<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Plesiomonas</i>
Маннит	-	-	-	-	-
Оксидаза	-	-	-	+	+
ОФ на среде Хью-Лейфсона	F	F	O	O	F
Мочевина	-	+	-	-	-
Подвижность	-	+	-	+	+
Цитрат Симмонса	-	+	+	+	-
Индол	-	+ или -	-	-	+
Рост на среде Клигера	низ-жёлтый; верх-малино-вый	малино-вый, иногда почернение среды (H ₂ S)	малино-вый	малино-вый	низ-жёлтый; верх-малино-вый

5. При подтверждении принадлежности изучаемой культуры к роду шигелл, виду *S.sonnei* дополнительно провести межвидовую дифференциацию в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

Основные дифференциальные признаки в группе маннитнегативных шигелл
(Цит.: Поздеев В.К., 2007 г. [5])

Тест или субстрат	<i>S.dysenteriae</i> гр.А	<i>S.flexneri</i> 2a, 4a гр.В	<i>S.sonnei</i> гр.Д	<i>S.boydii</i> гр.С
Лактоза	-	-	(+)	-
Маннит	-	-	-	- отдельные серовары
Сорбит	х	х	-	-
Индол	-/+	-	-	+/-
Орнитин	-	-	+	+
				<i>S.boydii</i> 13
β-галактозидаза	-/+	-	+	-
Агглютинация в диагностич. сыворотке к шигеллам Зонне	-	-	+	-

По окончании изучения выдаётся результат: «Выделена *S.sonnei*, маннитнегативный вариант».

Заключение

Разработанный нами алгоритм идентификации атипичных шигелл может быть полезным методическим документом для бактериологической практики.

Литература

1. Бондаренко А.П., Каравянская Т.Н., Отт В.А., Зайцева Т.А., Прохорец Е.В., Присяжнюк Е.Н., Троценко О.Е., Подколзин А.Т., Бобова К.Ф., Тригорлова Т.Н., Бондарь О.Б. Заболеваемость дизентерией, обусловленной маннитнегативными вариантами шигелл Зонне// Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2013. - №22. – С.52-60.

2. Инструкция по микробиологической диагностике кишечных заболеваний, вызванных шигеллами, сальмонеллами и энтеропатогенными кишечными палочками. - МЗ СССР, 1966.
3. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями. Москва, 1984.
4. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 3 / Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Лабора, 2009.-880с.
5. Поздеев О.К., Фёдоров Р.В. Энтеробактерии.: Руководство для врачей. -М.: ГЭОТАР-Медиа. -2007.-720с.
6. Энтеробактерии: Руководство для врачей / Под ред. В.И. Покровского. – М., 1985.

Сведения об авторах

Бондаренко Альбина Павловна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией бактериальных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора. E-mail: adm@hniiem.ru