

Шуляк Б.Ф.

Традиционные и новые подходы к лабораторной диагностике сальмонеллеза

ж. «Справочник заведующего КДЛ», 2009, № 12, 21—26

Сальмонеллез — одна из наиболее распространенных и опасных токсикоинфекций человека, сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Его возбудитель, *S. enterica*, обитает преимущественно в кишечнике, но, выделяясь с фекалиями, он контаминирует почву и объекты внешней среды, через которые может передаваться восприимчивым животным и человеку. Однако чаще заражение сальмонеллами происходит при непосредственном контакте с источником инфекции или потреблении в пищу продуктов питания, контаминированных *S. enterica*.

Согласно современной классификации [Popoff M.Y. Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars. WHO CCRR on Salmonella. Pasteur Inst., Paris, France, 2001], *S. enterica* делится на 6 подвигов *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* и *indica*, которые дифференцируют по биохимической активности и обозначают цифрами I, II, IIIa, IIIb, IV и VI соответственно. В подавляющем большинстве случаев сальмонеллезной инфекции от людей изолируют серовары подвида *enterica*.

Сальмонеллы весьма изменчивы как по липополисахаридному (O), так и по жгутиковому (H) антигенам. Изучение такой вариабельности позволило Ф. Кауффманну и П. Уайту предложить в 1930-х годах систему классификации сальмонелл, которой мы пользуемся по сей день. В настоящее время с ее помощью идентифицировано свыше 2500 сероваров *S. enterica*, обозначаемых антигенными формулами. В них указывают подтип (римская цифра), а затем последовательно цифровые обозначения O- (арабскими цифрами), первой (латинскими буквами) и второй (арабскими цифрами или латинскими буквами) фаз H-антигенов сальмонелл. Помимо схемы Кауффмана-Уайта типирование сальмонелл проводят посредством биохимического анализа, определения чувствительности к бактериофагам и к антибиотикам. В последние годы с той же целью начали применять методы генетического анализа (ОТ-ПЦР, идентификацию плазмид и др.). Молекулярные методы точнее фенотипических и позволяют быстрее получить результат.

Серовары *S. enterica* имеют различные широту распространения и патогенность, что сказывается на частоте их изоляции от больных людей. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют серовары *agona*, *anatum*, *choleraesuis*, *derby*, *dublin*, *enteritidis*, *heidelberg*, *infantis*, *newport*, *london*, *panama*, *typhimurium*.¹

Непатогномичность симптоматики сальмонеллеза диктует необходимость подтверждения предположительного клинического диагноза результатами лабораторных исследований взятого у пациента патологического материала.

Изоляция возбудителя. Для постановки окончательного диагноза в лабораторию направляют пробы фекалий и рвотных масс, ректальные мазки, а также кровь и сыворотку крови. При наличии возможности одновременно отсылают остатки пищи, которую пациент ел накануне болезни, а также смывы использованной им посуды.

Вероятность изоляции сальмонелл во многом определяется правильностью взятия проб и своевременностью их доставки в диагностическую лабораторию. Сальмонеллы лучше переносят щелочную среду, чем кислую; поэтому целесообразно защелачивать пробы фекалий и рвотных масс стерильным 10%-м раствором соды. При обнаружении в фекалиях крови, слизи и гноя их необходимо включить в пробу. Готовые зонды-тампоны с головками из небактерицидных хлопка, вискозы или дакрона обеспечивают большую сохранность сальмонелл в мазках, чем использование с той же целью самодельных

¹ Названия сероваров расположены в алфавитном порядке; в соответствии с эпидемиологическим значением на первом месте должен быть поставлен *typhimurium*, а за ним следовать *enteritidis*.

тампонов из обычной ваты. При невозможности посева в течение 3...4 ч фекалии в обязательном порядке помещают в консервирующую (глицериновую смесь, раствор фосфатов) или транспортную (Стюарта, Кери Блейр, Эймса и др.) среды (их можно приобрести в готовом для применения виде в пробирках).

Транспортируя материал в лабораторию, не следует забывать о том, что сальмонеллы являются опасными инфекционными агентами. Это диктует необходимость более тщательной упаковки взятого материала в специальные контейнеры и пакеты (желательно типа «вирл-пэк» с замком). Применение термосумок не только позволяет сохранить возбудителя в пробах, но также предотвращает его рассеивание во внешней среде при транспортировке; кроме того, материалы, из которых изготовлены термосумки и аккумуляторы холода, легко дезинфицировать.

Результативность бактериологического исследования повышает применение для первичных посевов обогатительных и селективных сред. В тех случаях, когда титр сальмонелл в тестируемом материале низок (при бессимптомном сальмонеллоносительстве, длительной транспортировке, многократном размораживании, пересыхании или перегреве материала, предназначенного для исследований) рекомендуется предварительно помещать пробы в забуференную пептонную воду в соотношении 1:2...1:10. Смесь инкубируют 15...20 ч при 37 °С. Это ведет к восстановлению жизнеспособности не только *S. enterica*, но и других видов бактерий, что крайне нежелательно. Поэтому при отсутствии необходимости данный этап пропускают, сразу же делая первичный посев поступивших в лабораторию проб на жидкую или полужидкую обогатительную среду (Раппапорта-Вассалиадиса, тетраэтилатный, селенитовый или селенит-цистеиновый бульоны и др.). Обогатительные среды пригодны для выращивания разных сероваров *S. enterica* в неодинаковой степени. Например, селенит токсичен для *S. choleraesuis*, бриллиантовый зеленый — для *S. dublin*. В связи с этим имеет смысл одновременно делать первичный посев, по меньшей мере, на 2 среды. С одной стороны это ведет к лишним затратам расходных материалов и труда, но в конечном итоге экономит время, поскольку позволяет избежать повторного проведения данного этапа бактериологического исследования, который занимает от 6 до 24 ч. Иногда культивирование на обогатительных средах проводят при повышенной температуре (41,5...43 °С), стремясь сократить его продолжительность и предотвратить рост термочувствительных контаминантов. Однако не следует забывать о том, что некоторые серовары сальмонелл (особенно *S. dublin*) не растут в таком температурном режиме. Далее следует пересев на плотные селективные среды (желче-солевую лактозную, Эделя-Кампельмахера дезоксихолатную цитратную, лизиновою с железом, висмут-сульфитную и другие агаровые среды) — они препятствуют размножению посторонней микрофлоры, но обеспечивают рост сальмонелл. Продолжительность инкубации посевов на таких средах составляет 18...72 ч при 37 °С.

Чувствительность бактериологического анализа высока (около 10^5 бакт/мл), но он трудоемок и на его проведение расходуется от 4 до 7 дн. Значительно быстрее удается обнаружить сальмонелл в биологических материалах с помощью автоматических анализаторов, однако их наличие в лаборатории не означает, что следует совсем забыть о перечисленных выше этапах традиционного подхода к изоляции сальмонелл.

Также предложен ряд методов выявления генома возбудителя — ДНК- и РНК-зондирование, ПЦР и др. Их чувствительность сопоставима и даже выше, чем у бактериологического анализа, но последний остается «золотым стандартом» диагностики сальмонеллеза.

Завершая обсуждение вопросов бактериологического исследования, отметим, что у пациентов с острым течением сальмонеллеза может возникать бактериемия. Обычно она носит кратковременный характер. Поэтому возбудителя удается удалить из крови, взятой только на начальной стадии болезни. Пробы крови в кратчайшие сроки после взятия разводят стерильным физиологическим раствором в 10 раз и высевают на селективную

среду (предпочтение отдают МПБ с 10...20 % бычьей желчи). Можно исследовать также сгусток крови (после его измельчения). После 18...24-часовой инкубации при 37 °С из бульона делают высев на чашки Петри с плотными дифференциальными средами (несмотря на это, посев на МПБ продолжают инкубировать). На третий день исследования просматривают посевы на дифференциальных средах и отбирают подозрительные колонии, изучение которых проводят так, как описано ниже (см. Идентификацию сальмонелл). При отсутствии характерного роста повторяют высев из жидкой среды.

Серологическая диагностика сальмонеллеза основана на выявлении у пациентов сероконверсии. С этой целью преимущественно применяют реакцию непрямой геммагглютинации. В ней исследуют парные пробы сыворотки крови, полученные с интервалом в 5...10 дн. В качестве антигенов пользуются комплексным и групповыми сальмонеллезными эритроцитарными диагностическими. Минимальный диагностический титр антител в данном тесте составляет 1:200.

Идентификация сальмонелл. Традиционно изоляты сальмонелл идентифицируют по комплексу признаков: морфологии бактериальных клеток и их колоний, подвижности и тинкториальным свойствам.

Клетки *S. enterica* — мелкие (2...5 x 0,7...1,5 мкм), прямые палочки с закругленными краями. При росте на питательных средах они становятся крупнее, чем в патологическом материале. Измельчение сальмонелл отмечают также при их нахождении в бедных по питательным веществам субстратах. Контакт с антибиотиками отражается на их форме — в одних случаях палочки становятся кокковидными, а в других приобретают нитевидную морфологию. В большинстве случаев они имеют 4...5 перитрихально расположенных жгутиков, обеспечивающих бактериям подвижность. Только у отдельных сероваров (например, *S. gallinarum*) нет жгутиков.

Сальмонеллы — грамотрицательные бактерии, хорошо усваивающие анилиновые красители. Спор и капсул не образуют.

На плотных средах *S. enterica* формируют небольшие (обычно диаметром 2...4 мм, серовар *S. abortus ovis* — 1 мм). В типичных случаях они гладкие, блестящие, гомогенные. На бесцветных средах колонии сальмонелл голубоватые, на агаре Эндо — розовые, на среде Плоскирева — мутные, на энтеритном агаре Гектоена — черные, синие или синезеленые с черным центром, на ксилозо-лизин-дезоксихолатном агаре — розовые (иногда с черным центром), на среде Вильсона-Блера — черные с металлическим блеском или зеленые. Обычно такая морфология колоний позволяет быстро идентифицировать сальмонелл.

Для выявления подвижности сальмонелл их засевают уколом в полужидкий мясопептонный агар. Неподвижные бактерии растут стержнем по уколу, а подвижные дают более или менее равномерное помутнение среды (кроме того, те и другие заселяют поверхность субстрата).

Применение полужидких цветных сред с сахарами позволяет оценить не только подвижность бактерий, но и их биохимические свойства. Такую идентификацию сальмонелл осуществляют в пробирках, микропробирках (метод Сирокко) или пастеровских пипетках (метод Фельдмана). Капельные методы в еще большей степени миниатюризируют анализ, а углеводные бумажные диски вообще позволяют обойтись без пестрого ряда сред. В процессе биохимической идентификации первоначально отбирают колонии уреазонегативных бактерий, образующих сероводород и ферментирующих глюкозу, но индифферентно относящихся к сахарозе. Их пересевают на среду Гиса с маннитом и 1%-ю пептонную воду (для выявления образования индола).

Для предварительной биохимической экспресс-диагностики сальмонелл предложено большое количество способов. Метод Блинкина основан на использовании пробирок со скошенной агаровой средой (процедура ее скашивания облегчается при использовании специальных штативов с меняющимся углом наклона), содержащей 1% углеводов (лактозы, маннита, мальтозы, сахарозы, при необходимости других сахаров),

или многоатомные спирты. На дне пробирок оставляют пептонную воду для выявления газообразования. Киктенко и Федорова предложили наносить капли полужидких сахарных сред с индикатором по периметру чашки Петри (это делается так, чтобы капли не соприкасались). Исследуемую культуру вносят в каплю среды, а для выявления газообразования смесь покрывают покровными стеклышками. Для проведения такого теста можно воспользоваться чашками Петри, разделенными на сектора. Его модификация, предложенная Бронфенбреннером, предусматривает замену полужидких сред плотными (в них также включают углеводы и индикатор). Снайдер для определения биохимических свойств сальмонелл рекомендовал помещать сухие стерильные бумажные диски, пропитанные растворами углеводов и многоатомных спиртов, на поверхность плотной среды с индикатором, которую предварительно засеяли сплошным газоном тестируемой культуры. При проведении таких экспресс-методов биохимического анализа результаты учитывают после 12-часовой инкубации в термостате по изменению цвета индикатора (если использован феноловый красный, то среда желтеет). В настоящее время комплексные системы определения биохимической активности изолятов (например, АП) постепенно вытесняют менее точные и трудоемкие методы, описанные выше. Однако это отнюдь не означает, что последними нельзя пользоваться в лабораториях, неоснащенных автоматическими анализаторами.

Кульминационным моментом идентификации изолятов *S. enterica* служит определение их антигенных свойств. Сальмонеллы имеют мозаичную антигенную структуру, которую можно определить разными иммунологическими тестами: реакциями агглютинации на стекле (методом Кауффманна–Уайта), латексагглютинации, преципитации, иммунофлюоресценции и др. Из перечисленных тестов наиболее практичным оказалась реакция агглютинации, которой бактериологи пользуются для типирования сальмонелл на протяжении почти 80 лет. Ее традиционно проводят с помощью гипериммунных антисывороток. Вначале с помощью поливалентной сыворотки дифференцируют *S. enterica* от других возбудителей кишечных инфекций, затем применяют моновалентные О- и Н-антисыворотки, позволяющие окончательно определить антигенную формулу и соответственно принадлежность к тому или иному серовару изучаемого изолята сальмонелл. В настоящее время во многих зарубежных лабораториях при проведении данного теста вместо гипериммунных сывороток стали пользоваться моноклональными антителами (отечественные специалисты получают такую возможность в следующем году). Такой подход имеет ряд преимуществ. Прежде всего, в моноклональных диагностикумах отсутствуют посторонние антигены и факторы, влияющие на течение реакции агглютинации, что повышает ее специфичность. Доступны сальмонеллезные группоспецифические моноклональные антитела. Имеются моноклональные антитела к ряду антигенов сальмонелл (О3, О13, Н1, Нe, Нg, Нn), к которым ранее не удавалось получить гипериммунные сыворотки. Кроме того, с помощью моноклональных антител удается выявлять поверхностный Vi антиген, которым обладают серовары typhi и paratyphi, а также некоторые штаммы серовара dublin. Как следствие, при проведении реакции агглютинации с моноклональными антителами удается идентифицировать практически все известные серовары сальмонелл (в настоящее время их число превышает 2500).

Дополнительным способом идентификации сальмонелл служит фаготипирование (с помощью наборов Vi-бактериофагов) и определение чувствительности изолятов к антибиотикам.

Заключение

Традиционно применяемые в лабораторной практике и современные методы позволяют эффективно диагностировать сальмонеллез и идентифицировать его возбудителя. Лабораторными анализами не следует пренебрегать ни в одном случае, когда имеются анамнестические и/или клинические основания подозревать данную инфекцию, поскольку правильно поставленный диагноз — основа эффективного лечения пациентов и

профилактики ее распространения. Последнее обстоятельство особенно важно, поскольку бессимптомно инфицированные *S. enterica* люди и животные формируют резервуар сальмонелл.