

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: Выделение и идентификация клебсиелл в патологическом материале
по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

Выполнил: Лохматова Анастасия Андреевна

Руководитель: Нестеренко Наталья Васильевна

Рецензент: Волкова Ирина Геннадьевна

зав. клинико-диагностической лаборатории НУЗ «Узловая больница на станции Саянская
ОАО «РЖД»

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

Красноярск 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ИЗУЧЕНИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛЕБСИЕЛЛ	6
1.1. Физиология и морфология клебсиелл	6
1.2. Культивирование и культуральные свойства	7
1.3. Ферментативные свойства.....	7
1.4. Токсинообразование.....	7
1.5. Антигенная структура.....	8
1.6. Резистентность	8
1.7. Источник инфекции и пути заражения	8
1.8. Патогенез.....	9
1.9. Иммунитет.....	10
1.10. Профилактика и лечение.....	10
1.11. Клиническая картина.....	11
1.12. Лабораторная диагностика.....	12
ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	14
2.1. Выделение и идентификация исследуемого биологического материала	14
2.2. Анализ статистических данных НУЗ «Узловая больница на станции Саянская ОАО «РЖД» за период с 2015 – 2017 года.....	17
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	21
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	22

ВВЕДЕНИЕ

Клебсиелла – это род капсульных грамотрицательных палочек семейства Enterobacteriaceae, специфических возбудителей различных инфекционных заболеваний, относящийся к категории условно-патогенной микрофлоры.

В 1875 году были обнаружены овальные «кокки» в бронхиальном секрете легких, немецким исследователем Клебсом и получили название клебсиелла.

В 1882 году немецкий микробиолог Фридлендер, выделил из экссудата пневмонийного очага больного, типичного микроорганизма и определил их свойства, и дал название *K. Pneumoniae*.

Типовым видом клебсиелл является *K. pneumoniae*, которая играет значимую роль в патологии. На основании анализа ДНК вид *K. pneumoniae* была разделена на 3 подвида.

Актуальность: Каждый человек восприимчив к заражению клебсиеллой. Однако в группе риска находятся груднички, новорожденные, а также пожилые с иммунодефицитом. Кроме того, болезнь часто встречается у лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, сахарным диабетом и онкологией. Сюда можно отнести и тех людей, которым недавно проводились операционные манипуляции. Бактерия клебсиелла может проявить себя где угодно – в кишечнике, в пищеварительных органах, в верхних дыхательных путях, мочеполовой системе. Обнаруживается она на коже людей, в моче, мокроте, а также на слизистой оболочке верхних дыхательных путей.

Они спокойно живут внутри человека и на его теле, при этом нет от них никакого вреда. Активное размножение клебсиелл начинается в случае, если организм ослабевает из-за какого-нибудь серьезного заболевания. Возрастающая резистентность *Klebsiella pneumoniae* к антибиотикам представляет собой

наиболее серьезную проблему антибактериальной терапии, вызванных данным возбудителем

Предмет исследования: больной человек

Объект исследования: мокрота

Цель: Выделение и идентификация клебсиелл из патологического материала.

Задачи:

1. Изучить морфологию и физиологию свойства клебсиелл.
2. Провести исследования для выделения и идентификации клебсиелл в патологическом материале.
3. Оценить лабораторные показатели клебсиелл.
4. Провести анализ статистических данных в НУЗ «Узловая больница на станции Саянская ОАО «РЖД».

Методы исследования:

Изучение и анализ научно-исследовательской и учебной литературы, нормативно-правовой документации, микробиологические и серологические исследования, статистическая обработка результатов

Базы: НУЗ «Узловая больница на станции Саянская ОАО «РЖД»

Материалом для написания дипломной работы послужила учебная литература, изучение статей и работ авторов Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А.

и других, а так же электронные ресурсы и статьи.

Структурно дипломная работа состоит из: введения, двух глав и заключения. В введении отображена актуальность данной проблемы, также цели и задачи исследования.

Глава 1 посвящена теоретическим аспектам, в которых содержится план проведения исследования: этиология, клиническая картина, патогенез и лабораторная диагностика заболевания.

В 2 главе представлена практическая часть исследования, в которой содержатся план проведения исследований, характеристика методов исследовательской работы, обоснование выбранного метода, основные этапы исследования, обработка и анализ результатов исследовательской работы. В заключение сформированные основные выводы по работе, раскрывающие задачи.

ГЛАВА 1. ИЗУЧЕНИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛЕБСИЕЛЛ

1.1. Физиология и морфология клебсиелл

Таксономия.

Семейство: Enterobacteriaceae

Род: Klebsiella

Вид:

1. K. Pneumoniae
2. K. rhinoscleromatis (палочка Фриша - Волковича)
3. K. ozaenae (палочка Абеля - Лавенберга)

Клебсиелла пневмония вызывает заболевание, такие как пневмония, острый бронхит.

Морфология. Клебсиелла пневмония (лат. *Klebsiella pneumonia*) – грамотрицательные эллипсоидные бактерии, имеют форму коротких толстых палочек, размером 0,6-6,0х0,3-1,5 мкм с закругленными концами. Они абсолютно не подвижны, защищены от различных раздражающих факторов и возможных перепадов температур специальной плотной оболочкой. Образуют капсулу. Спор и жгутиков не имеют, но есть фимбрии (микроволоски), которые обеспечивают высокую адгезивную способность к клеткам эпителия. Имеют выраженную капсулу, которую образуют как в организме, так и на питательных средах. Обычно видна толстая полисахаридная капсула. Бескапсульные формы могут быть получены при воздействии на бактерии низкой температуры, сыворотки, желчи, фагов, антибиотиков и при мутациях. В мазках располагаются одиночно, попарно или короткими цепочками.

1.2. Культивирование и культуральные свойства

Клебсиелла – факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, обладающие дыхательным и бродильным типам метаболизма. Хорошо растут на простых питательных средах при температуре 35 - 37 °С, рН среды – 7,2.

На мясо – пептоном агаре образуют мутные куполообразные слизистые колонии. На кровяной агар круглые, сероватые колонии. На бульоне интенсивное помутнение. Могут диссоциировать на R и S-формы. Способны расти на среде Симмонса, то есть использовать цитрат натрия в качестве единственного источника углерода.

1.3. Ферментативные свойства

Клебсиелла оксидазоотрицательная. Индол не выделяют. По реакции Фогеса - Проскауэра положительны. Как правило, по лизиндекарбоксилазе положительные, по ориитиндекарбоксилазе и агрининдигидролазе отрицательные. Некоторые виды уреазоположительные. Сероводород не образуют. Способны расти в присутствии KCN (цианид калия). Желатин не разжижают. Большинство видов сбраживает все обычно тестируемые углеводы (глюкоза, мальтоза, лактоза, сахароза, фруктоза, крахмал, клетчатка) за исключением дульцитол и эритритол с образованием кислоты и газа. Встречаются штаммы, не образующие газ.

1.4. Токсинообразование

Обладают эндотоксином. Вирулентность клебсиелла пневмонии обусловлена их адгезией, связанной с капсульным полисахаридом, пиями (ворсинки) и белком наружной мембраны, последующим размножением и колонизацией энтероцитов.

Капсула также защищает бактерии от действия фагоцитирующих клеток. При разрушении бактериальных клеток освобождается эндотоксин (липополисахарид - ЛПС) вызывающий инфекционно - токсическую реакцию. Кроме того, клебсиеллы пневмонии секретируют термостабильный энтеротоксин.

1.5. Антигенная структура

Клебсиеллы содержат капсульные К- и соматические О-антигены. Серологическое типирование клебсиелл основано на определении К-антигенов. Группоспецифический антиген обнаружен почти у всех штаммов клебсиелл.

1.6. Резистентность

Резистентность клебсиелл достаточно высокая: при комнатной температуре они сохраняются месяцами, устойчивы во внешней среде, длительно сохраняются в воде, на предметах, в молочных продуктах могут размножаться в холодильнике, при нагревании до 65 °С погибают в течении часа. Благодаря плотной оболочке бациллам не страшны ультрафиолет и дезинфицирующие средства, они чувствительны к различным дезинфицирующим веществам: раствора хлорамина, фенола и др. Поэтому они длительное время могут существовать в пыльной среде, воде, почве и даже на пищевых продуктах.

1.7. Источник инфекции и пути заражения

При экзогенной инфекции источником является больной человек и здоровый носитель. При поражении кишечника, *klebsiella pneumoniae* выделяется с калом,

при поражении органов дыхания – с откашливаемой мокротой, выделениями из носа, при поражении органов мочевого выведения – с мочой.

Наиболее частые пути передачи – пищевой, воздушно-капельный и контактно-бытовой. Факторами передачи чаще всего являются пищевые продукты (особенно мясные и молочные), вода, воздух. Контактнo-бытовой (грязные руки, предметы обихода). В детских учреждениях и больницах, инфекция часто передается через белье, инструментарий, игрушки.

1.8. Патогенез

Клебсиелла может вызывать внутрибольничные инфекции. Клебсиеллезы развиваются большей частью, как вторичная инфекция у лиц с пониженной сопротивляемостью, у новорожденных и грудного возраста детей в силу несовершенства иммунной системы, у пожилых лиц с возрастным иммунодефицитом, у лиц с приобретенным иммунодефицитом (хронические заболевания, сахарный диабет, онкология, болезни крови, пациенты после пересадки органов и тканей), и у лиц страдающие хроническим алкоголизмом.

K. pneumoniae вызванной для пневмонии, характерны образование множественных очагов в дольках легкого с последующим их сливанием и ослизнением пораженной ткани, содержащей большое количество клебсиеллы.

В тонкой и толстой кишке обнаруживаются катаральное, катарально-геморрагическое, реже фибринозно-гнойное воспаление и даже язвенные поражения.

Бактерии из верхних дыхательных путей и кишечника проникают в различные органы и кровь, и вызывают гнойно - воспалительные процессы, сепсис, менингит. Чаще всего они развиваются у новорожденных детей и у взрослых с ослабленной иммунной системой.

1.9. Иммуитет

Клебсиелла вызывают гуморальный и клеточный иммунный ответ. Заболевание вызывает накопление антител к клебсиеллам, но они не обладают выраженными протективными свойствами. В выздоровлении основная роль принадлежит фагоцитозу, который активируется специфическими опсонинами. Гуморальный иммунный ответ защитной активностью не обладает. В защите от инфекции главная роль принадлежит фагоцитозу, опсонизированному специфическими антителами клебсиелл. При хронических формах клебсиеллезов, при которых микроб расположен внутриклеточно, развивается ГЗТ (гиперчувствительность замедленного типа). Послеинфекционный иммунитет непродолжителен и развивается только в отношении одного определенного возбудителя (серовара).

1.10. Профилактика и лечение

Профилактика: Соблюдение санитарно-гигиенического режима в родильных домах, больницах, детских учреждениях. Своевременное выявление больных и их носителей.

Специфических профилактических мероприятий, то есть вакцины против клебсиеллы в настоящее время не разработано.

Лечение: Затруднено в связи с высокой устойчивостью клебсиелл к антибиотикам. Наиболее эффективное применение в лечении используют антибиотики гентамицин, канамицин, иногда ампициллин.

Для лечения клебсиелл часто используют поливалентный очищенный бактериофаг, который представляет собой жидкий раствор, имеющий много

способов применения. Эффективность бактериофага сравнима только с сильнодействующими антибиотиками.

Лечение клебсиеллы у грудничков и беременных женщин должно проводиться комплексно: антибиотиками, бактериофагами и пробиотиками.

Курс приема подобных лекарственных препаратов должен длиться не менее 10 дней, а оптимальный курс лечения составляет 14-21 день.

1.11. Клиническая картина

Инкубационный период индивидуален для каждого человека и зависит от сопротивляемости иммунной системы. Инкубационный период с момента заражения до начала проявления заболевания может составлять от нескольких часов до 6 суток. В зависимости от того, какой тип патологического агента проник в человеческий организм, будет отличаться клиническая картина клебсиеллезной инфекции. Например, для пневмонии характерно острое начало и появление таких первых признаков заражения:

1. лихорадка и озноб;
2. Недомогание, повышенное потоотделение;
3. першение и покраснение горла.

По мере прогрессирования недуга будут проявляться следующие симптомы:

1. боли в груди во время глубокого вдоха;
2. сухой кашель, постепенно трансформирующийся во влажный - при этом отмечается выделение вязкой, гнойной и зловонной мокроты;
3. хрипы при вдохе и выдохе.

Клебсиелла у новорождённых и малышей грудного возраста имеет свои особенности протекания и приводит к появлению таких симптомов:

1. возрастание температуры до 38 градусов и выше;

2. влажные хрипы в процессе дыхания, сильный кашель со слизью;
3. слабость и вялость младенцев;
4. отказ от еды;
5. частое срыгивание;
6. обезвоживание;

Клебсиеллезная инфекция в подавляющем большинстве ситуаций продолжается до 12 суток.

1.12. Лабораторная диагностика

Для выявления патогенной микрофлоры необходимо пройти комплексное обследование, выполнить ряд лабораторных исследований. Поскольку специфические симптомы отсутствуют, определить наличие клебсиеллеза и условно-патогенной флоры весьма проблематично путем сбора данных анамнеза. Специалисту для постановки окончательного диагноза предстоит исследовать такие биологические жидкости, как мокрота, секционный материал, моча, желчь, кровь и даже спинномозговая жидкость.

Диагностика клебсиеллезов заключается в последовательном проведении бактериоскопического, бактериологического, серологического метода.

1. Бактериоскопия— изучение под микроскопом мазков, окрашенных по Грамму. Клебсиеллы — грамотрицательные палочки, расположенные в мазке одиночно, попарно и в виде цепочек.
2. Микробиологический метод - состоит из 4 дней исследования, в которых заключается следующее: посев исследуемого материала на питательные среды, такие как мясо - пептонный агар, Эндо и Плоскирева. Выявлении и идентификация возбудителя заболевания, а также определении его фаготипа и

чувствительности к антибиотикам. А так же проводят капсульную агглютинацию на стекле с живой культурой.

3. Серодиагностика – выявление в крови больного антител к клебсиеллам.

Для этого используют реакцию агглютинации на стекле. На предметное стекло наносят диагностические протиклебсиллезные капсульные сыворотки, а также каплю 0,9% раствора хлорида натрия (контроль). У каплей сывороток и изотонического раствора растирают полную петлю исследуемой культуры, смешивают их, добиваясь тщательной гомогенизации. При положительном результате образуется агглютинат в виде грубых нитей или тяжей. В контрольной капле агглютинации не должно быть.

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

2.1. Выделение и идентификация исследуемого биологического материала

Способ сбора материала: Мокроту в стерильную баночку собирают натошак, после того как больной почистит зубы и прополощет ротовую полость.

Основные методы исследования: микробиологический и серологический.

Первый день исследования

Делают посев на чашки Петри с МПА, средой Эндо и Плоскирева, кровяной агар. После проведения посева, инкубируют чашки Петри в термостате 24 часа при температуре 37°C.

Второй день исследования

Изучают культуральные свойства.

При наличии ГР (-) палочек отбирают слизистые колонии и пересевают их на скошенный агар и среду Ворфель – Фергюсона (для выявления чистой культуры) и на комбинированную среду Рассела для определения ферментативных свойств и подвижности.

Третий день исследования

При росте неподвижной культуры, ферментирующей лактозу, глюкозу, мочевины, не образующей индола и сероводорода, делают посев на среды с цитратом и малонатом, и мазки для наличия капсулы. Производят постановку системы индикаторные бумажки (СИБ), для этого мы берем лизиндекарбоксилаза, орнитиндекарбоксилаза, фенилаланиндезаминаза, Р-я Фогес–Проскауэра, уреазы (гидролиз мочевины), инозит, сорбит.

При наличии капсулы ставят реакцию агглютинации на стекле с агглютинирующими К-сыворотками.

Четвертый день исследования

Оценив биохимические свойства, можно сделать вывод, что *klebsiella pneumoniae* по ферментативным свойствам идентифицирована к определенным реакциям, таким как: цитрат Na, малонат Na, реакция Фогес – Проскауэра, уреазы, инозита, сорбита. Данные реакции представлены в таблице, при положительной пробе изменяется цвет среды в пробирке.

Таблица 1– Ферментативные свойства *klebsiella pneumoniae*

Название реакции	Оценка реакции	Результат
Цитрат Na	+	
Малонат Na	+	
лизиндекарбоксилаза	+	
орнитиндекарбоксилаза	-	

фенилаланиндезаминаза	-	
Р-я Фогес - Проскауэра	+	
Уреаза (гидролиз мочевины)	+	
Инозит	+	
Сорбит	+	

2.2. Анализ статистических данных НУЗ «Узловая больница на станции Саянская ОАО «РЖД» за период с 2015 – 2017 года.

Изучены и проанализированы учебно-методические пособия, сбор материала, статистические данные обследуемых пациентов.

Статистическим отделом НУЗ «Узловая больница на станции Саянская ОАО «РЖД», были предоставлены следующие данные: население 8000 тыс. человек, период 2015 - 2017 гг., на основании этих данных была изучена динамика выявленных больных.

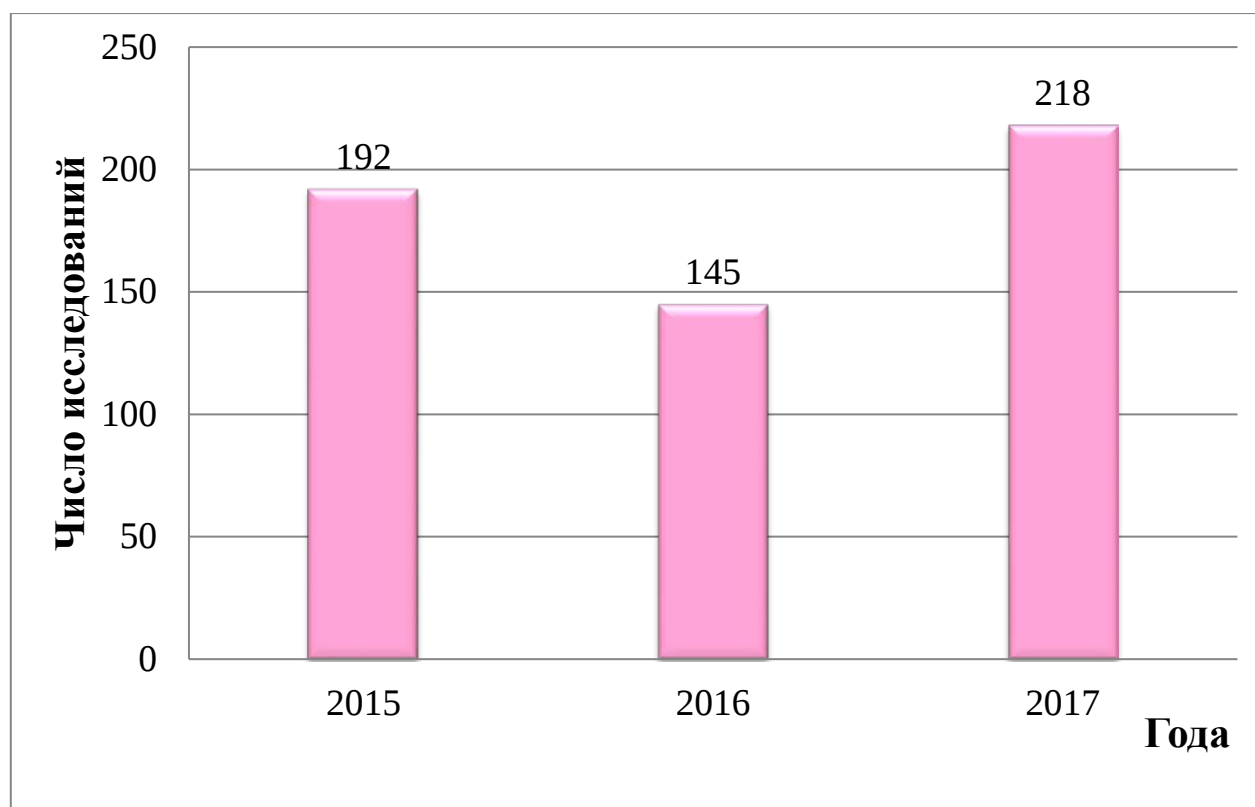


Рисунок 1 – Абсолютное число проведенных микробиологических исследований на клебсиелл в НУЗ «Узловая больница на станции Саянская ОАО «РЖД» за 2015 – 2017 год по ст. Саянская.

Согласно статистическим данным, рост выявленных больных в 2017 году, был значительно выше, чем рост в 2015 и 2016 г. г.

Рассмотрев 2017 год по периодам, можно сделать вывод, что часто заболевают люди в весенний период, так как после зимнего периода организм ослаблен.

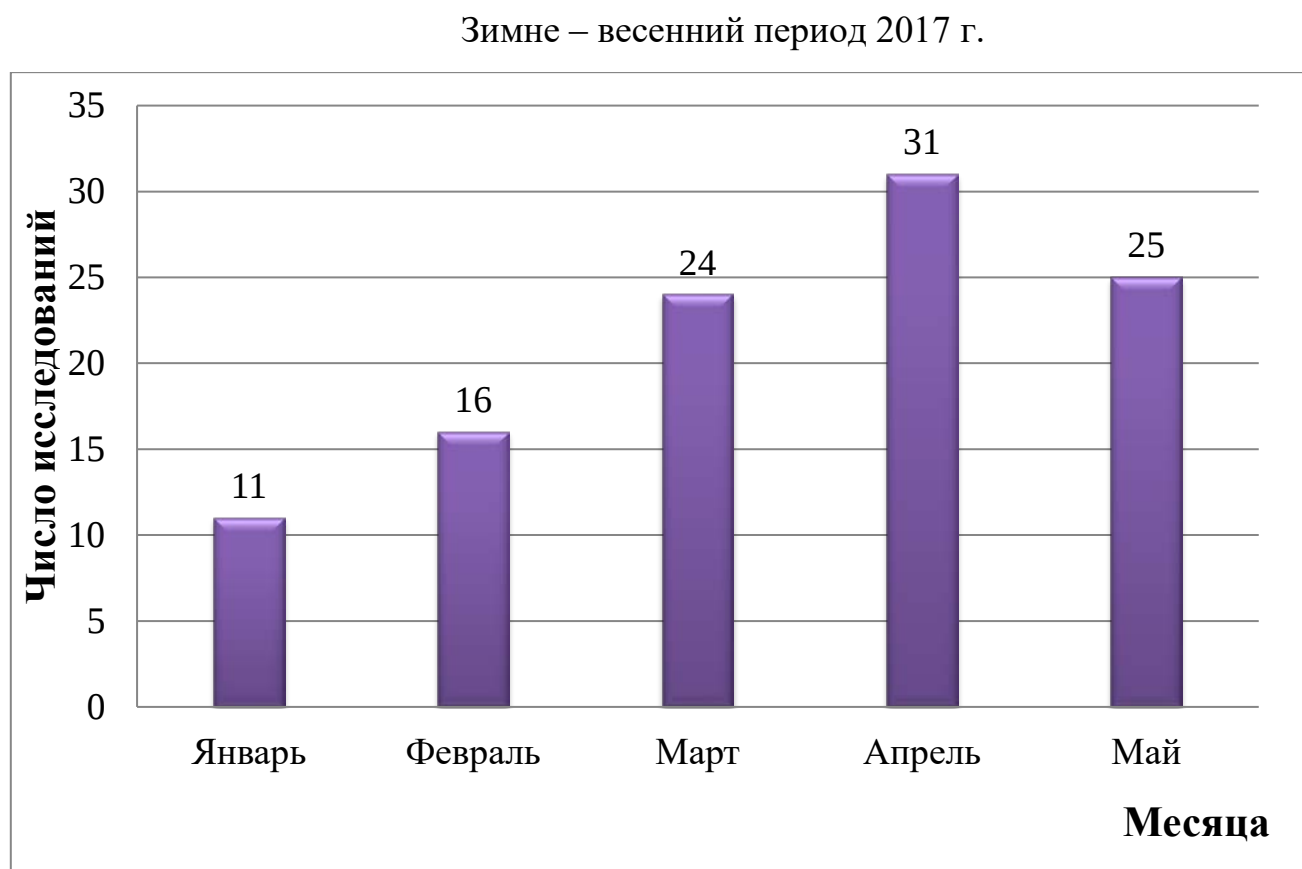


Рисунок 2 – Абсолютное число проведенных микробиологических исследований на клебсиеллы пневмония за зимне-весенний период.

На данном графике представлены статистические данные за период зимне – весенний, где мы наблюдаем, что в апреле месяца был увеличен рост клебсиеллы пневмония.

Осенне – летний период 2017 г.

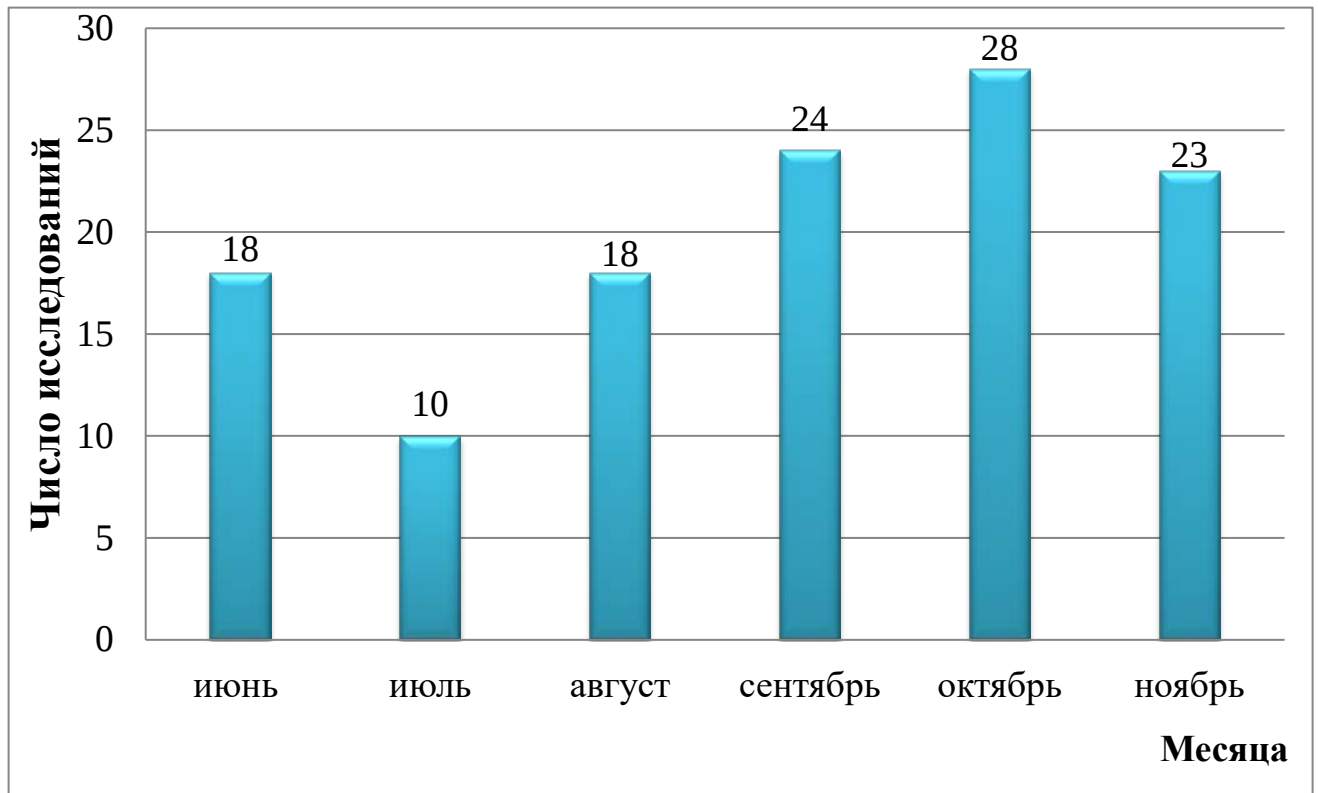


Рисунок 3 – Абсолютное число проведенных микробиологических исследований на клебсиеллы пневмония за осенне – летний период.

На данном графике представлены статистические данные за осенне – летний период, где наблюдается рост клебсиеллы пневмония в октябре месяца.

Частота выделения клебсиелл у людей за 2017 г.

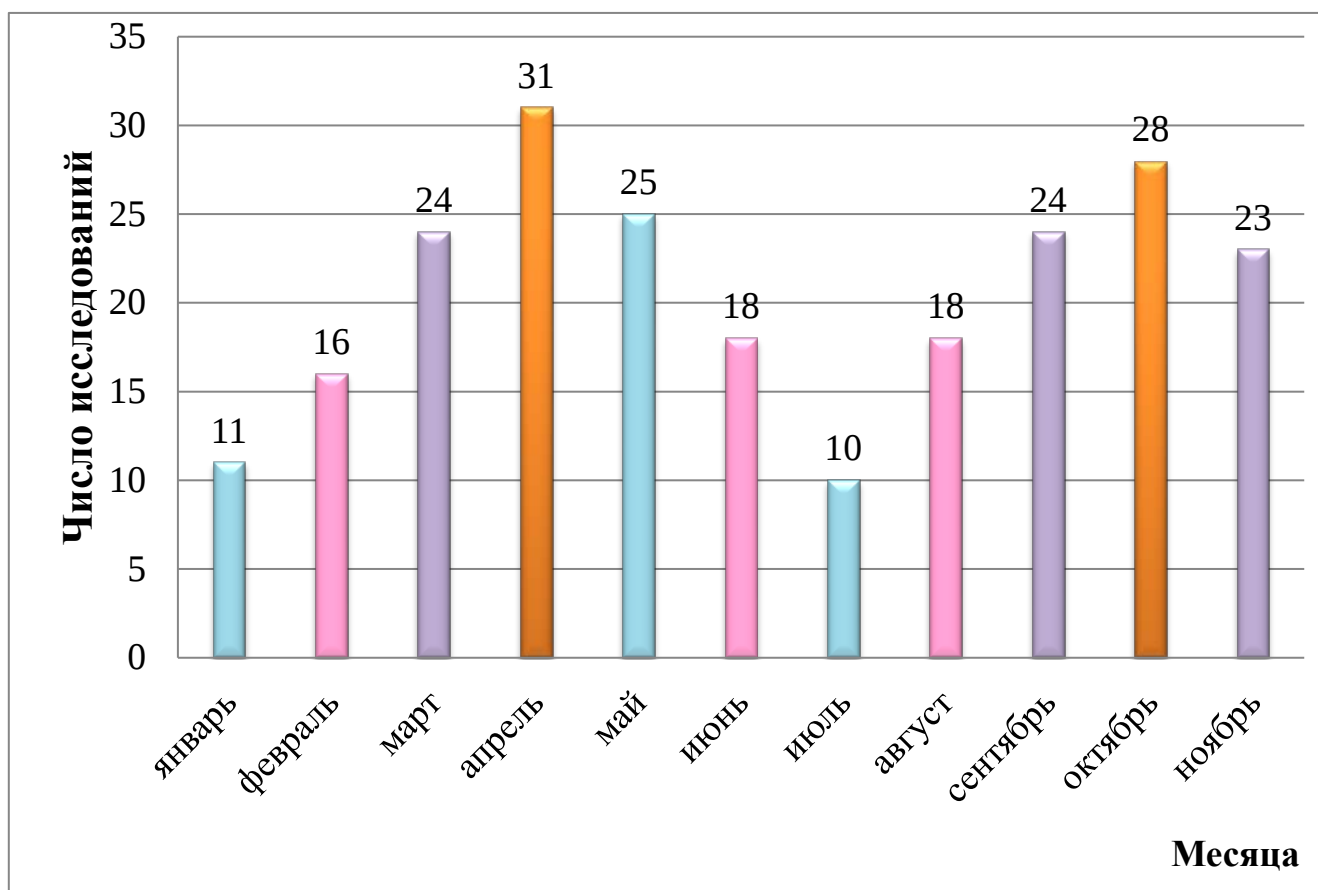


Рисунок 4 – Абсолютное число проведенных микробиологических исследований на клебсиеллы пневмония за 2017 год.

На данном графике представлены статистические данные за 2017 год, здесь мы наблюдаем динамику роста, частоты выделения клебсиеллы пневмония.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучена морфология и физиология свойств клебсиелл.
2. Изучены методы диагностики выявления клебсиелл.
3. Проведена идентификация и выделение клебсиелл в патологическом материале на базе НУЗ «Узловая больница на станции Саянская ОАО «РЖД». Таким образом, проводя поэтапную идентификацию культуры бактериологическим и серологическим методами, была выделена энтеробактерию рода *K. pneumoniae*.
4. На основании статистических данных, пришла к выводу, что:
 - Статистические показатели выделения клебсиеллы пневмония за последние 3 года имеет выраженную тенденцию роста.
 - Наблюдается сезонный подъем заболеваемости клебсиеллой пневмонией в весенний и осенний период.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Н.А. Бакулина, Э.Л. Краева Микробиология, Москва «Медицина» 2002 г. С.125-127
2. Скала Л.З. «Практические аспекты современной клинической микробиологии» Москва, 2004 г. С.305
3. Лабинская А.С. «Микробиология с техникой микробиологических исследований» Москва, «Медицина» 2006 г. С.262-265
4. Гаврилович И. М., Азоматова А. Б., Хакешева Т. А., Об использовании бактериофагов для идентификации клебсиелл «Медицина» 2011 г. С. 139-140.
5. Ф. К. Черкес, Л.Б. Богоявленская, Н.А. Бельская «Микробиология». Под ред. Ф.К. Черкес, Москва «АльянС» 2014 г. С. 305 – 308
6. А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. «Микробиология» Москва, «Медицина» 2009г. С.405
7. Г. Г. Шлегель «Общая микробиология». Москва, «Медицина» 2010г. С. 208-210
8. Н. Г. Куранова, Г. А. Купатадзе «Микробиология». Москва, «Медицина» 2009 г. С. 325
9. В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин «Микробиология». Москва, «Медицина» 2010 г. С.209
10. Лабораторные и инструментальные исследования в диагностике: Справочник / Пер. с англ. В.Ю. Халатова; под.ред. В.Н. Титова. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004 г. С. 960
11. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Под ред. Е.А. Кост. - "Медицина", 2010 г. С. 383
12. Приказ № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в КДЛ ЛПУ» от 22.04.2012 г.

13. Заражение клебсиеллой : симптомы и лечение – [Электронный ресурс]
- Режим доступа: <http://biologylib.ru/books/item/f00/s00/z0000015/st027.shtml>
14. Клебсиеллы [Электронный ресурс] - Режим доступа:
<https://studfiles.net/preview/6206347/>
15. Клебсиелла пневмония характеристика болезни [Электронный ресурс]
- Режим доступа: <http://lifetab.ru/klebsiella-pnevmoniya-chto-eto-takoe-kakie-zabolevaniya-vyizyivaet-simptomyi-i-lechenie/>
16. Клебсиелла пневмония симптомы и его лечение [Электронный ресурс]
- Режим доступа: <https://prolegkie.com/pnevmoniya/vid/chto-predstavlyaet-soboj-klebsiella-pnevmoniya>
17. Клебсиелла пневмония, что это такое [Электронный ресурс] - Режим
доступа: <http://fb.ru/article/267320/klebsiella-pneumoniae---chto-eto-takoe-bakteriya-klebsiella-pneumoniae-opisanie>
18. Клебсиелла пневмония [Электронный ресурс] - Режим доступа:
<http://lifetab.ru/klebsiella-pnevmoniya-chto-eto-takoe-kakie-zabolevaniya-vyizyivaet-simptomyi-i-lechenie>
19. Вид клебсиелл [Электронный ресурс] - Режим доступа:
<http://simptomer.ru/bolezni/infektsii-parazity/2667-klebsiella-simptomy>
20. Клебсиелла в патологическом материале [Электронный ресурс] -
Режим доступа: <http://uhonos.ru/infekcii/klebsiella>