

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 стафилококковых инфекций

по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

Выполнил: Гамазкова Татьяна Сергеевна ()

Руководитель: Тюльпанова Ольга Юрьевна ()

Рецензент: Попов Виталий Галактионович ()
Исполняющий обязанности Зав. КСЛ в КБКВД

Работа допущена к защите ЦМК «Лабораторных и
санитарно-гигиенических дисциплин»

Протокол № 9 от «28» мая 2018 г

Красноярск 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Общая характеристика и диагностика стафилококка (STAPHYLOCOCCUS)	6
1.1 Идентификация S. Aureus.....	12
1.2 Идентификация S. epidermidis и S. Saprophyticus.....	18
Заболевания вызванные стафилококком эпидермальным (S. epidermitis)..	22
ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ИССЛЕДУЕМОГО БИОМАТЕРИАЛА В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ НА НОСИТЕЛЬСТВО СТАФИЛОКОККА.	23
2.1. Анализ статистических данных «Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства» за период с 2014 – 2016 годы.....	23
2.2 Анализ профиля биоматериала, поступающего в бактериологическую лабораторию в течении дня.....	25
Поступивший биологический материал был в дальнейшем исследован и зарегистрирован в базу КГБУЗ ККОМД.	25
2.3 Исследование биологического материала (мазок из зева).	25
2.4 Чувствительность выявленного стафилококка к антибиотикам.....	29
2.5 Исследование биологического материала (моча).....	31
2.6 Выявление вида стафилококка.	32
2.7 Чувствительность Эпидермального стафилококка (S. epidermidis) к антибиотикам.....	33
Вывод.....	34

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	35
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	36

ВВЕДЕНИЕ

По данным государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году» в медицинских организациях случаев ИСМП (Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи) выявлено на 7,7 % больше, чем в 2015 году (24 771 и 23 006 сл. соответственно).

В структуре ИСМП на первое ранговое место впервые вышли внутрибольничные пневмонии (в 2015 г. первое место принадлежало послеоперационным инфекциям), которые составили 24,1 % от общего числа зарегистрированных случаев ИСМП (2015 г. – 21,3 %). На втором месте – послеоперационные инфекции – 22,7 % (2015 г. – 24,7 %), 15,5 % приходится на гнойно-септические инфекции (ГСИ) новорождённых (2015 г. – 15,9 %) и 11,7 % приходится на ГСИ родильниц (2015 г. – 13,6 %).

В последние годы все большее значение приобретают внутриутробные инфекции новорождённых (ВУИ), при этом многократное превышение числа случаев ВУИ над количеством случаев ГСИ (гнойно-септические инфекции) новорождённых свидетельствует о возможном сокрытии случаев внутрибольничной инфекции у новорождённых под диагнозом «внутриутробная инфекция». Соотношение числа внутрибольничных ГСИ новорождённых и ВУИ в 2006 году в целом по Российской Федерации составляло 1:4,1, а в 2016 году – 1:8,5. В разрезе субъектов Российской Федерации в 2016 году отмечается значительный разброс значений данного показателя. [1]

Цель работы: Провести анализ профиля исследуемого биоматериала и диагностику внутрибольничных стафилококковых инфекций у новорождённых и рожениц «Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства».

Для реализации цели были определены следующие задачи:

1. Изучить характеристику, патогенез и клинику стафилококковых инфекций.
2. Провести статистический анализ профиля исследуемого биоматериала в бактериологической лаборатории «Краевого клинического центра охраны материнства и детства»..
3. Провести идентификацию возбудителя из бактериологического материала.
4. Провести исследование на чувствительность выделенного микроорганизма к антибиотикам.

Объекты исследования: новорождённые и роженицы

Предметы исследования: мазки из зева, моча, кровь

Методы исследования:

1. изучение и анализ научно-исследовательской и учебной литературы;
2. бактериологические;
3. изучение статистических отчетов лечебно-профилактической организации.

ГЛАВА 1. Общая характеристика и диагностика стафилококка (STAPHYLOCOCCUS)

Систематика. В соответствии с рекомендациями "Краткого определителя бактерий Берги" 1980 г., род *Staphylococcus* относится к семейству *Micrococaceae*, в которое входят также роды *Micrococcus* и *Planococcus*. Общими чертами представителей этого семейства являются: 1) морфология микробных клеток - все они грамположительные микроорганизмы сферической формы, делящиеся более чем в одной плоскости, 2) наличие фермента каталазы.

Согласно решению Международного подкомитета по таксономии стафилококков и микрококков (Варшава, 1975 г.) род *Staphylococcus* состоит из 3 видов: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. Представители двух последних видов относятся, к так называемым, коагулазоотрицательным стафилококкам, которые долгое время считались непатогенными. Сейчас эту точку зрения следует считать опровергнутой. Доказано, что *S. epidermidis* может вызывать такие заболевания как эндокардит, сепсис, конъюнктивит, инфекцию ран и мочевыводящих путей, а *S. saprophyticus* - острый уретрит и цистит. [13]

Морфология. Стафилококки (от греч. *Staphyle*- виноградная гроздь) имеют вид круглых шаров диаметром 0,5-1,5 мкм. Размножаясь, образуют скопления в виде грозди винограда. Такая форма является результатом деления микробов в различных плоскостях. Однако в гное встречаются единичные и парные кокки. Стафилококки не подвижны, не имеют спор, при специальных условиях культивирования образуют микрокапсулу, грамположительны.

Культивирование. Стафилококки - факультативные анаэробы, однако лучше растут в присутствии кислорода. Растут и размножаются на обычных

питательных средах, хорошо растут на средах с кровью, оптимальные условия - температура 37° С, рН 7,2-7,4.

Элективными средами являются желточно-солевой агар и солевой агар. На МПА колонии стафилококка выпуклые, круглые, непрозрачные, блестящие, размером 2-4 мм с ровными краями. При росте стафилококки образуют пигмент: золотистый, лимонно-желтый или белый. Лучшее образование пигмента происходит на молочной среде при комнатной температуре и рассеянном свете. Стафилококковый пигмент не растворяется в воде, растворяется в ацетоне, эфире, спирте и т. д. При росте некоторых штаммов стафилококка на агаре с кровью вокруг колонии образуется зона гемолиза. Рост на бульоне характеризуется равномерным помутнением и осадком на дне.

Ферментативные и антигенные свойства. Стафилококки вырабатывают сахаролитические и протеолитические ферменты. Сахаролитические ферменты расщепляют ряд сахаров: лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, глицерин и другие с образованием кислоты.

Протеолитические свойства стафилококка выражаются в способности растворять казеин, разжижать желатин (медленно), расщеплять другие белковые субстраты. [12]

Стафилококки продуцируют ферменты патогенности: 1) коагулазу (сворачивает плазму крови); 2) гиалуронидазу (фактор распространения); 3) лецитиназу (растворяет лецитин оболочки клеток); 4) фибринолизин (лизует фибрин); 5) ДНКазу (деполимеризует ДНК); 6) фосфатазу и др.

Наличие плазмокоагулазы позволяет дифференцировать золотистый стафилококк от стафилококков других видов. Многие стафилококки вырабатывают пенициллиназу, разрушающую пенициллин.

Стафилококки вырабатывают экзотоксины. К их числу относятся гемолизины четырех типов, из которых наибольшее значение имеет α -токсин. Он обладает следующими свойствами: гемолитическим - вызывает гемолиз эритроцитов, дермонекротическим - при внутрикожном введении

вызывает некроз, летальным - при внутривенном введении приводит к гибели чувствительных к нему животных.

Кроме гемолизинов стафилококки образуют лейкоцидин, убивающий лейкоциты, энтеротоксины шести типов, вызывающие пищевые отравления, эксфолиатины двух типов, приводящие к отслаиванию эпидермиса у новорожденных детей.

Стафилококки имеют протеиновый антиген А, общий для всех золотистых стафилококков, и полисахаридные антигены: А, Б, С.

Стафилококки выделяют бактериоцины (стафилоцины), которые обладают антагонистическим действием по отношению к микроорганизмам данного рода.

Среди золотистых (реже эпидермальных) стафилококков различают около 40 фаговаров. Определение чувствительности выделенных из различных объектов стафилококковых культур к типовым фагам имеет важное эпидемиологическое значение (при установлении источника и путей передачи возбудителя).

Стафилококки довольно устойчивы, поэтому они обнаруживаются в воздухе, почве, воде, на предметах обихода. При температуре 100 °С они погибают моментально, при температуре 70 °С - через 10-15 мин. Они хорошо переносят низкие температуры. При замораживании сохраняют жизнеспособность в течение нескольких лет. Хорошо переносят высушивание. Прямой солнечный свет убивает их только через несколько часов. Обычные растворы дезинфицирующих веществ (например, сулема в разведении 1:1000) убивают их через 15-20 мин. При обезвреживании выделений, содержащих гной, белок, мокроту, не следует применять фенол. Это дезинфицирующее вещество вызывает коагуляцию белков, что предохраняет микроорганизмы от гибели. Стафилококки чувствительны к бриллиантовому зеленому. К стафилококку чувствительны крупный и мелкий рогатый скот, лошади, свиньи, куры. Из экспериментальных животных - кролики, белые мыши и котята. [11]

Патогенез. Стафилококки проникают через кожу и слизистые оболочки. Преимущественное значение при стафилококковых заболеваниях имеет золотистый стафилококк (*S.aureus*). Менее выражена роль в патологии человека *S.epidermidisi* *S.saprophyticus*. *S.saprophyticus*. Патогенез обуславливается свойствами возбудителя-ферментами, экзотоксинами, веществами бактериальной клетки и состоянием иммунной системы макроорганизма. Чаще поражается кожа и подкожная клетчатка- возникают пиодермиты, фурункулы, панариции. Нередко стафилококки обуславливают вторичные заболевания, например пневмонию при гриппе. Они также вызывают раневые инфекции. Особенно велика роль стафилококков в акушерской практике, так как новорожденные очень чувствительны к ним. В течении стафилококковых заболеваний имеет значение развитие аллергии, поэтому заболевание характеризуется рецидивами. Особое место среди стафилококковых заболеваний занимают пищевые интоксикации. Клинически они протекают как токсикозы, сопровождаются рвотой, поносом, головной болью и другими явлениями.

Источники инфекций. Больной человек и бактерионоситель.

Пути передачи. Контактно-бытовой, воздушно-капельный, воздушно-пылевой, пищевой.

При стафилококке наблюдаются заболевания такие как: Пиодермия, фурункулы, карбункулы, панариции, абсцессы; воспалительные процессы различных органов и тканей; ангины, циститы, остеомиелиты, холециститы, маститы; сепсис и септикопиемия; пищевые токсикоинфекции и многие другие. Описано около 120 нозологических форм стафилококковой этиологии. [10]

Диагностика Целью первичной идентификации является установление принадлежности выделенной культуры к семейству *Micrococaceae* и роду *Staphylococcus*. Для установления принадлежности культур к семейству микрококков (*Micrococaceae*) используют тест на каталазу. Отмечают способность представителей семейства микрококков, имеющих фермент

каталазу, расщеплять перекись водорода, образуя воду и газообразный кислород.

В отличие от микрококков, представители родственного семейства стрептококков каталазы не имеют.

Установление принадлежности культуры к роду *Staphylococcus*.

На этом этапе исследования применяются методы, позволяющие дифференцировать стафилококки от микрококков. К их числу относятся культуральный, бактериоскопический и биохимический методы, из которых последний является главным.

Культуральный метод.

Основным отличием стафилококков от микрококков является окраска колоний на плотной среде. Для стафилококков характерны золотистые (от палевых до ярко-золотистых) или белые колонии (рис. 1). У микрококков колонии окрашены, как правило, в желтый (с различными оттенками - от желто-зеленого до оранжевого) или розовый (вплоть до красного) цвета. Дополнительным тестом может служить характер роста на плотной кровяной (5% дефибринированной крови барана или кролика) среде. [9]

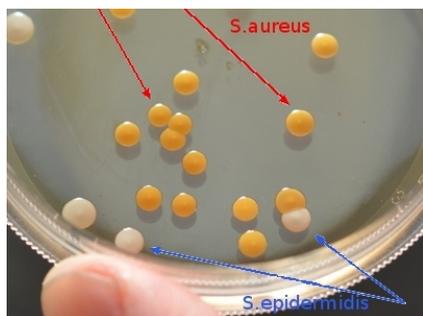


Рисунок 1. Колонии стафилококка

подавляющее большинство штаммов *S. aureus* и некоторые штаммы *S. epidermidis* растворяют эритроциты, образуя прозрачную зону гемолиза вокруг колоний. Микрококки гемолитическими свойствами не обладают.

Бактериоскопический метод.

В мазках, окрашенных по Граму, стафилококки располагаются по одиночке, парами или в виде скоплений (гроздей) неправильной формы.

Для микрококков, помимо указанных вариантов, характерно также образование тетрад и пакетов. Размеры микробных клеток у микрококков, как правило, больше (диаметр 0,5 - 3,5 мкм), чем у стафилококков (диаметр 0,5 - 1,5 мкм).

Определение ферментации глюкозы в анаэробных условиях.

Стафилококки являются факультативными анаэробами, микрококки-облигатными аэробами. В связи с этим стафилококки способны расти и ферментировать глюкозу в анаэробных условиях, микрококки лишены этой способности.

Принцип. При ферментации глюкозы в анаэробных условиях образуется молочная кислота, в связи с чем среда закисляется и рН ее снижается. Закисление среды выявляется по изменению окраски индикатора, добавленного в среду.

Ингредиенты. Полужидкие среды (0,3% агар), содержащие 1% глюкозы - это готовая среда с индикатором ВР или среда Хью-Лейфсона с индикатором бромтимоловым синим. Последняя среда является более чувствительной, т.к. изменение ее окраски происходит при более высоких значениях рН, поэтому она позволяет выявить ферментацию глюкозы слабо активными штаммами вида *S. saprophyticus*. В связи с этим, если какой-либо штамм дал отрицательный результат на среде ВР, его следует повторно исследовать на среде Хью-Лейфсона.

Готовую среду разливают по 5 мл в пробирки и подвергают дробной стерилизации. Непосредственно перед посевом пробирки со средой помещают на 15 минут в кипящую водяную баню для удаления кислорода, а затем быстро охлаждают в ледяной бане.

Ход исследования.

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма с помощью бактериологической петли сеют в столбик среды уколом до дна пробирки, а затем на поверхность агара наливают 1,5 мл стерильного вазелинового масла для создания анаэробных условий. Посев инкубируют при 37 °С в течение 5

суток, ежедневно регистрируя результаты. Реакция считается положительной, если происходит желтое окрашивание столбика среды, занимающее не менее 2/3 его высоты.

Длительные сроки учета реакции представляют известные неудобства, поэтому на практике дальнейшую идентификацию стафилококков проводят, обычно не дожидаясь результатов анаэробной ферментации глюкозы. В этой связи результаты указанного теста как бы дополняют результаты других тестов, полученных на следующих этапах идентификации.

Видовая идентификация стафилококков

Первым этапом исследования является дифференциация штаммов *S. aureus* от представителей двух коагулазотрицательных видов стафилококка. Если установлено, что штамм не относится к виду *S. aureus* проводят его идентификацию для выяснения принадлежности культуры к видам *S. epidermidis* или *S. saprophyticus*. [8]

1.1 Идентификация *S. Aureus*

Ориентировочные данные о принадлежности культуры к виду можно получить при изучении характера колоний, выросших после посева исходного материала на селективную среду стафилококков - молочно-желточный солевой агар (МЖСА).

Лецитиназная активность

Принцип. Хлористый натрий является селективным фактором, т.к. подавляет рост большинства представителей другой микрофлоры, главным образом, грамотрицательной. Одним из компонентов яичного желтка является лецитовителлин.

Лецитовителлин является субстратом для фермента лецитовителлазы (лецитиназы), относящегося к группе липаз и продуцируемого некоторыми стафилококками. При расщеплении лецитовителлина вокруг

лецитиназоположительной колонии на поверхности среды образуется радужный венчик. Добавление в среду молока путем сложных химических процессов стимулирует образование стафилококками золотистого или лимонно-желтого пигмента, относящегося к группе каротиноидов.

Ингредиенты. Основой среды является 1,8% питательный агар, содержащий 7,5 г NaCl на 100 мл среды. К 200 мл растопленного и охлажденного до 50 °С агара добавляют молочно-желточную смесь, которую готовят следующим образом: во флаконе с 20 мл стерильного снятого молока эмульгируют (со стеклянными бусами) 2 мл яичного желтка. После добавления смеси в агар среду тщательно перемешивают и разливают примерно по 20 мл в чашки Петри. Готовая среда содержит ~ 10% молока и 1% яичного желтка.

Ход исследования.

Для выявления лецитиназы достаточно инкубации посева в течение 18-24 часов при 37 °С. Выявление пигмента у колоний в ряде случаев требует дополнительной инкубации в течение 18 - 24 часов при комнатной температуре.

О наличии лецитиназы свидетельствует, как уже было отмечено, образование вокруг колонии радужного венчика. Наличие пигмента легко определяется на глаз. Как правило, штаммы *S. aureus*, обладают лецитиназой и пигментом, а культуры двух других видов лишены их. Возможны, однако, исключения: некоторые штаммы *S. aureus* не имеют пигмента или лецитиназы, а ряд штаммов *S. epidermidis* обладает лецитиназной активностью. [7]

Окончательная идентификация *S. aureus* требует постановки еще 2 тестов. На первом этапе определяют наличие у штаммов плазмокоагулазы. Если после этого штамм идентифицировать не удастся, дополнительно определяют один из двух следующих признаков: наличие ДНК-азы (что предпочтительнее) или способность ферментировать маннит в анаэробных условиях. Схема идентификации представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема идентификации S.Aureus

№	Наличие				Ферментация маннитаванаэр. Услов.	Принадлежность штамма к виду S. AUREUS
	Пигмента	Лецитиназы	Коагулазы	ДНК-азы		
		3	4	5	6	7
		+	+			Да
		+	+			Да
		-	+			Да
		-	+			?
а		-	+	+		Да
б		-	+	-		Нет
в		-	+		+	Да
г		-	+		-	Нет
		-	-			Нет
		+	-			Нет
		-	-			Нет
		+	-			?
а		+	-	+		Да
б		+	-	-		Нет
		+	-		+	Да

В						
Г		+	-		-	нет

При наличии положительного результата в реакции плазмокоагуляции хотя бы в одном из двух предварительных тестов (пигмент, лецитиназа) исследуемый штамм может быть отнесен к виду *S. aureus* (варианты 1-3). Отсутствие плазмокоагулазы и хотя бы одного из первых двух признаков дает основание считать, что штамм не принадлежит к *S. aureus* (варианты 5-7). Расхождения между результатами реакции плазмокоагуляции, с одной стороны, и двух предварительных тестов-с другой (варианты 4 и 8), требуют постановки одного из двух дополнительных тестов (ДНК-аза или ферментация маннита в анаэробных условиях). В случае совпадения результатов дополнительного теста с результатами реакции плазмокоагуляции штамм считается либо относящимся к виду *S. aureus* (при положительных результатах, варианты 4а и 4в), либо не относящимся к нему (при отрицательных результатах, варианты 8б и 8г). При расхождении результатов реакции плазмокоагуляции и дополнительного теста вопрос решается с учетом большинства положительных (принадлежность к виду *S. aureus*, варианты 8а и 8в) или отрицательных (принадлежность к другим видам, варианты 4б и 4г) результатов. Проводить идентификацию *S. aureus* лишь на основании результата одного теста не рекомендуется.

Реакция плазмокоагуляции.

Принцип. Под действием фермента плазмокоагулазы активируется естественная система свертывания крови (плазминогенпротромбин).

Реактивы. Плазма кроличья, сухая, цитратная для реакции плазмокоагуляции, готовая.

При отсутствии сухой кроличьей, лиофилизированной плазмы готовят свежую плазму.

Ход исследования.

В пробирку вносят 1 петлю суточной агаровой культуры исследуемого штамма, которую суспендируют в плазме. Штатив с пробирками помещают в термостат при 37 °С и регистрируют результаты реакции через 1, 2, 4 и 18 часов инкубации.

Оценка результатов.

Появление на дне пробирки студнеобразного сгустка любого размера считается положительным результатом реакции. Положительным результатом следует считать наличие плазмокоагуляции впервые 4 часа инкубации.

Отсутствие свертывания плазмы в течение 18 часов расценивается как отрицательный результат.

В качестве контроля рекомендуется ставить реакцию с заведомо коагулирующим и некоагулирующим штаммами, а также оставлять одну пробирку с плазмой незасеянной.

Определение ДНК-азы.

Принцип. Под действием ДНК-азы (дезоксирибонуклеазы) добавленная в плотную среду высокополимерная ДНК распадается на низкополимерные фрагменты. При этом мутная среда, содержащая высокополимерную ДНК, становится прозрачной.

Реактивы. Сухая высокополимерная ДНК; 2 моль/л раствор едкого натра

(NaOH), 3 моль/л раствор соляной кислоты (HCl), стерильный 10 процентный раствор хлористого кальция (CaCl₂). 50 мг, 100 мг или 200 мг высокополимерной ДНК растворяют в 3-5 мл дистиллированной воды, подщелоченной 4-5 каплями 2 моль/л NaOH. К 100 мл расплавленного 1,8% мясопептонного агара (рН 8,6) добавляют приготовленный раствор ДНК и прогревают среду 20 минут в кипящей бане.

Затем в слегка охлажденный агар вносят 0,5 мл стерильного 10% раствора CaCl₂, среду тщательно перемешивают и разливают тонким слоем в

чашки Петри (по 10 – 12 мл на чашку), в зависимости от взятой дозы. Содержание ДНК в готовой среде составляет 0,5;1,0 или 2,0 мг/мл.

Ход исследования.

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма засевают коротким (1-1,5 см) штрихом на поверхность подсушенного агара. На одну чашку можно посеять до 16 штаммов. После 18-24 часовой инкубации при 37°С поверхность агара заливают небольшим количеством (5-7 мл) 3 моль/л раствора HCl. Через 2-3 минуты кислоту сливают и регистрируют результаты.

Оценка результатов.

Появление вокруг культуры прозрачной зоны (деполимеризация ДНК), которая в 4 и более раз превосходит по ширине зону микробного роста (ширина последней должна превышать 2-3мм), свидетельствует о положительной реакции на ДНК-азу. Меньшая зона деполимеризации ДНК расценивается как сомнительная реакция и учету не подлежит.

Определение ферментации маннита в анаэробных условиях.

Определение проводят аналогичным путем, но в качестве субстрата используют 1% раствор маннита.

Фаготипирование штаммов *S. Aureus*.

Для внутривидового дифференцирования *S. aureus* применяется метод фаготипирования, позволяющий получить фаговую метку большинства штаммов и с большей долей вероятности решить вопрос об идентичности или различии сопоставляемых культур, что очень важно для выявления источников и путей распространения стафилококковой инфекции.

Принцип. Штаммы *S. aureus* обладают избирательной чувствительностью к литическому действию ряда стафилококковых бактериофагов, составляющих Международный набор типовых фагов. Чувствительность исследуемого штамма к одному или нескольким типовым фагам определяет фаготип штамма, т.е. его фаговую метку. [3]

Заболевания при Золотистом стафилококке (*S. aureus*).

Эксфолиативный дерматит (болезнь Риттера), или «синдром ошпаренной кожи» характеризуется образованием больших пузырей, по виду напоминающих ожоги, затем кожа слущивается и формируются незащищенные раны (Рис. 2)

Абсцесс – поражение глубоких слоев кожи с видимым покраснением и уплотнением. Формируется полость, содержащая гной (Рис. 2)

Ринит – покраснение слизистой с обильным гнойным отделяемым из носа. При проникновении инфекции ниже развивается ангина.



Рисунок 2. Эксфолиативный дерматит (болезнь Риттера) и Абсцесс

1.2 Идентификация *S. epidermidis* и *S. Saprophyticus*.

Те штаммы, которые после исследований, описанных в предыдущем разделе, признаны не относящимися к *S. aureus*, подвергаются дальнейшей идентификации для установления их видовой принадлежности. Дифференциацию *S. epidermidis* от *S. saprophyticus* рекомендуется проводить в 3 тестах: определение 1) устойчивости к новобиоцину, 2) фосфатазы, 3) способности окислять маннит. Упрощенная схема идентификации указанных видов представлена в таблице 2.

Для штаммов *S. epidermidis* характерны: чувствительность к новобиоцину, наличие фосфатазы, неспособность окислять маннит, для штаммов *S. saprophyticus* - противоположные свойства. Поскольку не все стафилококки по своим характеристикам укладываются в указанную схему, такие штаммы следует обозначать *Staphylococcus spp.*

Определение устойчивости к новобиоцину.

Принцип. Антибиотик новобиоцин в избранной концентрации подавляет рост штаммов *S. epidermidis*, но не влияет на рост естественно устойчивых к нему штаммов *S. saprophyticus*.

Ингредиенты. Из стерильного водного раствора новобиоцина (10мг в 10мл дистиллированной воды) берут 0,5мл и вносят в пробирку с 3мл стерильного физиологического раствора. Содержимое пробирки переносят во флакон с 250мл расплавленного и охлажденного до 50 °С 1,8% питательного агара, перемешивают и разливают среду в чашки Петри. Конечная концентрация новобиоцина в среде составляет 2 мкг/мл.

Ход исследования.

Одну каплю суточной бульонной культуры исследуемого штамма засевают с помощью петли на поверхность агара (на одну чашку можно сеять не менее 25 штаммов). Посевы инкубируют 24 часа при 37 °С, регистрируют результаты. Рост штамма в виде крупной бляшки свидетельствует об его устойчивости к новобиоцину. Полное отсутствие роста или наличие небольшого числа отдельных мелких колоний дает основание считать штамм чувствительным к новобиоцину.

Тест на фосфатазу.

Определение фосфатазы можно проводить двумя методами, дающими совпадающие результаты, с использованием двух разных реактивов (в зависимости от наличия одного из них).

Принцип. Фермент фосфатаза отщепляет фосфатную группу от фосфорорганического соединения. Образующийся в результате продукт

реакции либо уже является окрашенным, либо приобретает окраску при добавлении соответствующего реактива.

Реактивы. Динатриевая соль пара-нитрофенилфосфата (1-й метод); фенолфталеинфосфат натрия, 25% раствор аммиака (2-й метод).

Ход исследования.

1-й метод. 50 мг пара-нитрофенилфосфата (динатриевая соль) растворяют в 3 мл стерильной дистиллированной воды. Указанный раствор добавляют к 100 мл расплавленного и охлажденного 1,8% питательного агара, перемешивают и разливают в чашки Петри. Конечная концентрация реактива в среде составляет 0,05%. Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов с помощью петли сеют на среду (не более 16 штаммов на одну чашку). Учет результатов проводят после 18 - 24-часовой инкубации при 37 °С. Реакция считается положительной, если в толще среды вокруг выросшей колонии видна зона интенсивного желтого окрашивания.

2-й метод. Фенолфталеинфосфат натрия добавляют к агару в концентрации 0,01%. Посев и инкубация осуществляется так же, как и в предыдущем методе. По окончании инкубации на крышку чашки Петри наливают 5-6 капель 25% раствора аммиака, выдерживают чашку в перевернутом состоянии 5-10 минут, подвергая выросшую культуру воздействию паров аммиака, после чего регистрируют результаты. О положительной реакции свидетельствует появление розового окрашивания макроколоний. [6]

Определение окисления маннита

Принцип. При окислении маннита в аэробных условиях, образуется уксусная кислота, которая закисляет среду, что выявляется с помощью индикатора.

Ингредиенты. Для постановки опыта рекомендуется плотная (1,8% агара) среда с индикатором ВР и среда Хью-Лейфсона, содержащие 1% маннита. Среду разливают в чашки Петри.

Ход исследования.

Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов сеют на среду бляшками (не более 16 штаммов на одну чашку). Посевы инкубируют при 37°C, результаты регистрируют через 1 сутки. Появление желтого окрашивания вокруг макроколонии свидетельствует о положительной реакции (таблица 2). [2]

Таблица 2 - схема идентификации *S. Epidermidis* и *S. saprophyticus*

	Устойчивость к новобиоцину	Фосфотаза	Окисление манита
<i>S. epidermidis</i>	-	+	-
<i>S. saprophyticus</i>	+	-	+

Заболелания вызванные стафилококком эпидермальным (*S. epidermitis*).

1. Инфекции кровеносной системы у лиц, у которых длительно стоят венозный катетер или у лиц со сниженным иммунитетом.
2. Эндокардиты и инфекции клапанов сердца (как натуральных, так и искусственных), чаще возникают у лиц с дефектом клапанного аппарата.
3. Воспаление мочеполовой системы, особенно у лиц с, использующих уретральный катетер.
4. Инфекции при использовании катетера при перитонеальном диализе.
5. Инфекции в искусственных суставах (Рис. 3)
6. Инфекции сосудистых трансплантантов.
7. Инфекции у новорожденных (Рис. 3)
8. Очень редко может быть причиной сепсиса у госпитализированных пациентов.



Рисунок 3. Инфекции в искусственных суставах и инфекции у новорожденных

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ИССЛЕДУЕМОГО БИОМАТЕРИАЛА В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ НА НОСИТЕЛЬСТВО СТАФИЛОКОККА.

2.1. Анализ статистических данных «Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства» за период с 2014 – 2016 годы.

Исследование проводилось на базе «Красноярского краевого клинического центра охраны материнства и детства» клинко-диагностической лаборатории в отделе бактериологических исследований.

Статистические данные внутрибольничных исследований биоматериала за 3 года представлены в таблицах № 3, 4, 5. [5]

Таблица 3 - Общая статистика обнаруженного стафилококка за 2014-2016 гг.

Год	Кол-во анализов	Кол-во положительны х результатов	Род стафилококк (Staphilococcus)	Род стафилококк (Staphilococcus) %
2014г	4935	351	43	12,2
2015 г	4286	168	21	12,5
2016 г	4340	205	26	12,6
Итого	13561	724	90	12,4

Вывод: На род стафилококка приходится 12,4% из общего числа исследуемых микроорганизмов.

Таблица 4 - Статистические данные исследования мочи на носительство стафилококка за 2014-2016 гг.

Год	Кол-во анализов	Кол-во положительных	Кол-во выделенных культур стафилококка	Кол-во выделенных культур стафилококка, %
2014 г	4935	855	67	7,8
2015 г	4286	564	21	3,7
2016 г	4340	727	26	3,6
Итого	13561	2146	114	5,0

Вывод: На стафилококковые инфекции в среднем приходится 5,0% из общего числа исследований проб мочи.

Таблица 5 - Статистические данные исследования крови на носительство стафилококка в период за 2014-2016 гг.

Год	Кол-во анализов	Кол-во положительных	Род стафилококк	Род стафилококк, %
2014 г	1247	209	14	6,7
2015 г	1333	223	22	9,9
2016 г	1426	165	63	38,2
Итого	4006	597	99	18,3

Вывод: На стафилококковые инфекции в среднем приходится 18,3% из общего числа исследований проб крови.

2.2 Анализ профиля биоматериала, поступающего в бактериологическую лабораторию в течении дня.

Мной была проведена статистика и подсчет количества биоматериала, поступающего в бактериологический отдел в течение 1 дня. Данные о профиле биоматериала за 10.05.18 г, поступившего в бактериологический отдел представлены в таблице 6:

Таблица 6 - Количество биологического материала, поступившего в бактериологический отдел в течение одного дня

Биологический материал	Количество
Моча	25
Кровь	10
Мазок из зева	7
Мокрота	5
Отделяемое ран	10
Отделяемое половых органов (мазок)	37
Ректальный мазок	10
Мазок с уха	5
Мазок с носа	3
Лаважная жидкость	3
Спинальная жидкость	5
Катетер	2
Всего	121

Поступивший биологический материал был в дальнейшем исследован и зарегистрирован в базу КГБУЗ ККОМД.

2.3 Исследование биологического материала (мазок из зева).

Согласно нормативным документам СОП (стандартная операционная процедура) лечебной организации КГБУЗ «Красноярского краевого

клинического центра охраны материнства и детства» клинико-диагностической лаборатории бактериологического отдела, мы провели исследования мочи и мазков из зева. [4]

Перед нами стояла задача, провести посев мазка из зева на питательную среду.

Питательная среда: ЖСА (желточно - солевой агар).

Посев осуществляли на $\frac{1}{2}$ чашки с желточно - соевым агаром, предварительно делая небольшую площадку поворачивая тампон со всех сторон, затем с помощью бактериологической петли произвели рассев для получения изолированных колоний (Рис. 4). После проведения посева, поместили чашку Петри с ЖСА в термостат на 37°C .

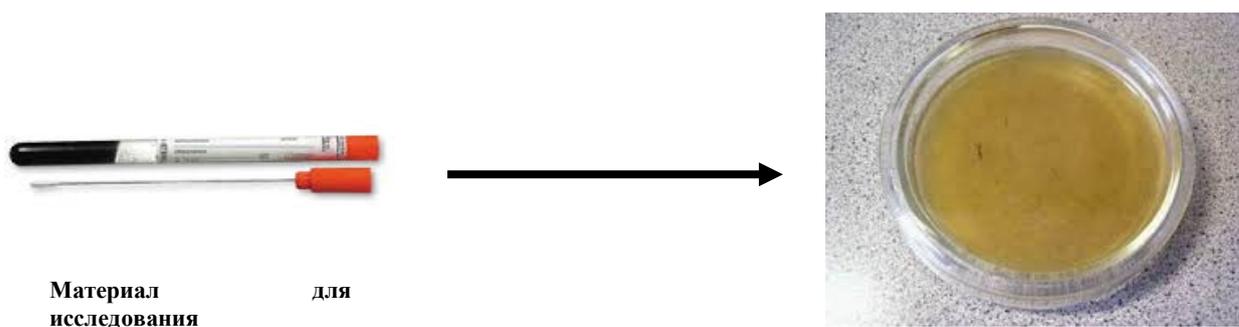


Рисунок 4. Посев биоматериала на ЖСА

На следующий день после инкубации в термостате, проведя исследования выросших колоний мы определили, что в нашем случае на питательной среде выросли колонии золотистые круглые выпуклые непрозрачные (Рис. 5).



Рисунок 5. Результат посева биоматериала на ЖСА

Затем перед нами стояла задача выявить вид стафилококка.

На чашках при помощи маркера или карандаша по стеклу отметили колонии и провели видовую идентификацию.

При росте смешанной культуры - провели рассев и дальнейшую идентификацию чистой культуры.

Для окончательного установления вида стафилококка 2-3 колонии пересеяли в пробирки со скошенным питательным агаром для получения чистых культур с последующим определением их дифференциальных признаков.

Выделенная культура обладает плазмокоагулирующей и лецитовителлазной активностью, следовательно делаем заключение о выделении S.aureus - без дополнительных исследований.

Плазмокоагулирующая активность является одним из основных признаков патогенности стафилококков (*Staphylococcus aureus*).

В микробиологической практике способность бактерий вызывать коагуляцию плазмы определяют визуально в течение 18 часов культивирования бактерий. Данный способ выявления фермента плазмокоагулазы у патогенных стафилококков выбран в качестве прототипа. Способ заключается в следующем: в две пробирки наливают по 0,5 мл плазмы, разбавленной 1:5 изотоническим раствором хлорида натрия, затем в каждую пробирку вносят по 1 петле 18-20-часовой культуры стафилококка. Одну пробирку (опытную) засевают исследуемой культурой бактерий, вторую (первый контроль) - заведомо патогенным, плазмокоагулирующим штаммом стафилококка. Засеянные пробирки выдерживают в течение 3 ч. Если за указанное время коагуляции плазмы в опытной пробирке не происходит, пробирки оставляют при комнатной температуре еще на 18 ч. Если и через это время свертывания плазмы не произойдет, исследуемая культура является коагулазоотрицательной (Рис. 6). Одновременно в термостат ставят несколько пробирок с плазмой (второй контроль), в которые не вносят бактерии. Если в одной из пробирок второго контроля наступает

коагуляция плазмы, обусловленная микробным загрязнением, результат опыта не учитывают.

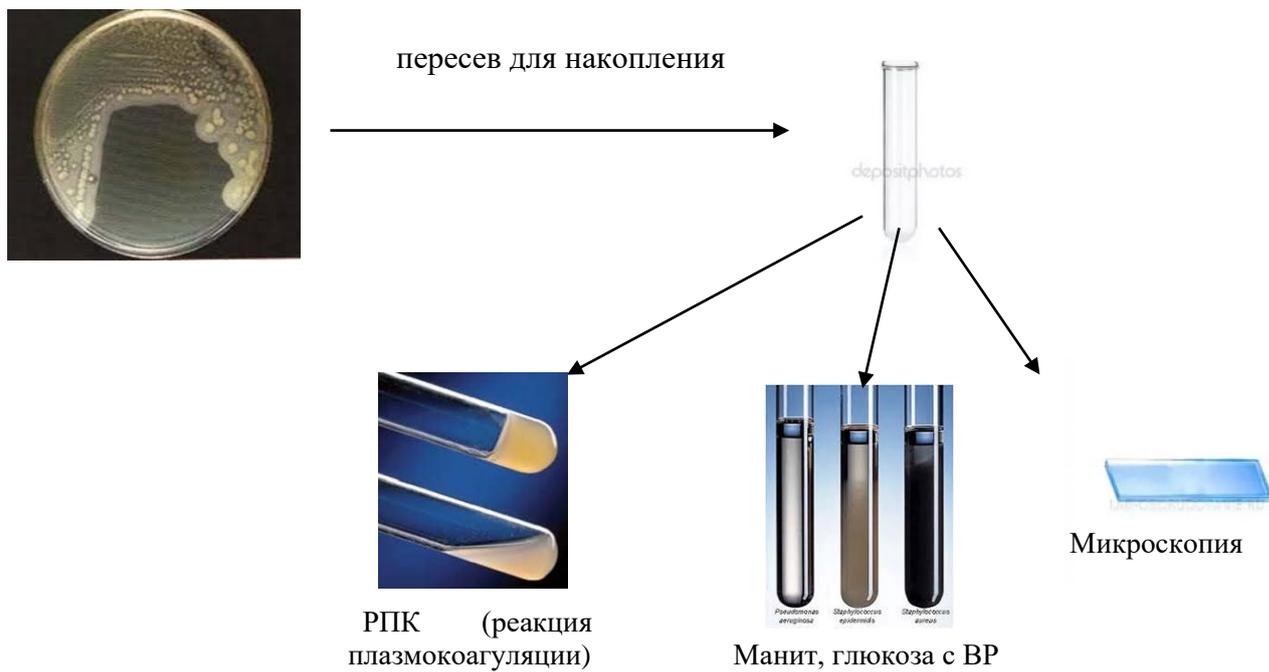


Рисунок 6. Выявление вида стафилококка

2.4 Чувствительность выявленного стафилококка к антибиотикам.

Чувствительность стафилококка к антибиотикам определяют Диско-диффузным методом.

Для постановки антибиотикограммы нам понадобилась среда ЖСА и антибиотики: Гентамицин; Ампицилин; Фузидин; Оксациллин; Клаксид; Арилин; Котрим.

Приготавливаем микробную взвесь. Для этого нужно взять стерильной петлёй любую колонию из чашки Петри и опустить её в пробирку с физиологическим раствором. Затем слегка взболтать.

Микробную взвесь пипеткой нанесли на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1-2 мл, равномерно распределили по поверхности покачиванием, после чего удалили избыток пипеткой. Приоткрытую чашку подсушили при комнатной температуре в течение 10 - 15 мин.

Не позднее, чем через 15 минут после высыхания микробной взвеси на поверхность питательной среды нанесли диски с антибиотиками. Аппликацию дисков провели с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15 - 20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с антибиотиками. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашку Петри поместили в термостат кверху дном и проинкубировала при температуре 35°C в течение 18 - 24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Увеличение интервала времени между нанесением дисков на поверхность среды и началом инкубации (а соответственно - началом роста исследуемой культуры микроорганизма) приводит к "преддиффузии" антибиотиков в агар и к увеличению диаметра зоны подавления роста.

На следующий день чашку поместили кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста измерили с точностью до 1 мм.

После постановки антибиотикограммы мы наблюдали такую картину.

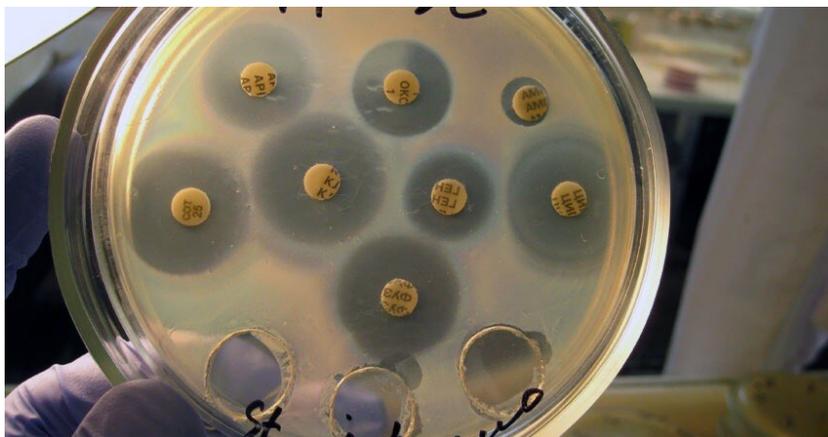


Рисунок 7. Результат постановки антибиотикограммы

Самая маленькая задержка зоны роста наблюдается с антибиотиками: Фузидин; Оксациллин; Клацид; Арилин; Котрим (Рис. 7).

Следовательно именно к этим антибиотикам не чувствителен наш выявленный золотистый стафилококк (*S. aureus*).

При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста. Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и едва заметный налет у края зоны. Исключение составляют случаи учета результатов определения чувствительности стафилококков к оксациллину, когда необходимо учитывать и самые мелкие колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления роста.

Крупные колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления роста, свидетельствуют о наличии посторонней микрофлоры или о гетерорезистентности популяции микроорганизмов, в этом случае

необходимо повторить идентификацию микроорганизма, формирующего эту колонию, и определение чувствительности этого штамма.

2.5 Исследование биологического материала (моча).

Так же мы решали проверить другой биологический материал (моча) на носительство стафилококка.

Питательная среда: кровяной агар.

В «Бактериологическом отделе» сеют биоматериал (моча) по методу Голда (Рис. 8).

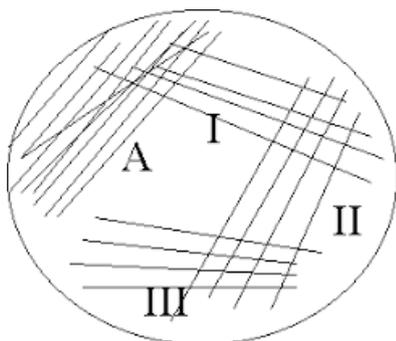


Рисунок 8. Посев по методу Голда

Метод секторных посевов позволяет не только определить степень бактериурии, но и выделить возбудителя заболевания в чистой культуре.

Платиновой петлей, диаметром 2 мм, емкостью 0,005 мл, я произвели посев мочи (30 - 40 штрихов) на сектор А чашку Петри с простым питательным агаром. После этого петлю прожгли и произвели 4 штриховых посева из сектора А в сектор I и аналогичным образом - из сектора I во II и из II в III. Чашку проинкубировали сутки при 37 °С.

2.6 Выявление вида стафилококка.

На следующий день после инкубации чашки Петри с биологическим материалом, мы заметили вот такой рост (Рис. 9).



Рисунок 9. Результат посева биоматериала на кровяной агар

S. Epidermidis хорошо растет на кровяном агаре. Оптимальная температура роста – 30-37 °С. Выросшие колонии небольшие.

Затем мы провели микроскопию окрашенного по Граму мазка из колонии на определение вида стафилококка. При микроскопии мы обнаружили грамположительные кокки (Рис. 10).

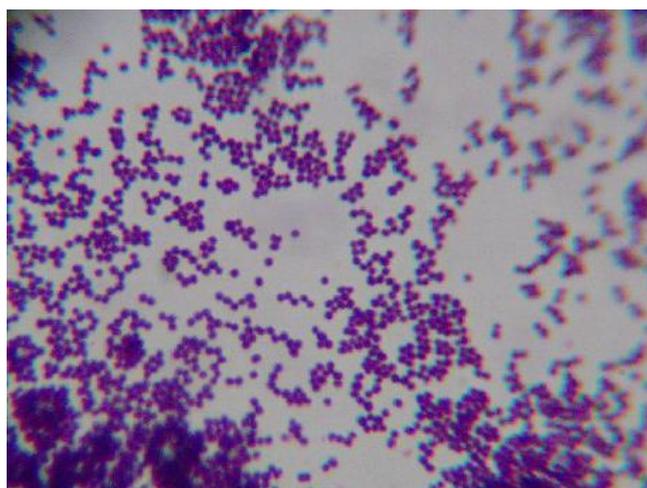


Рисунок 10. Стафилококк под микроскопом

2.7 Чувствительность Эпидермального стафилококка (*S. epidermidis*) к антибиотикам.

S. Epidermidis часто устойчивы к пеницилинам, амоксициллину и метициллину. Обычно устойчивые к антибиотикам *S. Epidermidis* находят в кишечнике, однако *S. Epidermidis*, живущий на коже, также может приобретать резистентность в результате выделения антибиотика вместе с потом.

Инфекции, вызванные *S. Epidermidis* требуют лечение эффективными антибиотиками. К таковым относятся ванкомицин, рифампицин и новые фторхинолоны (такие как гатифлоксацин, моксифлоксацин). Описаны случаи резистентности *S. Epidermidis* к ванкомицину, в таких случаях рекомендовано использовать такие антибиотики как линезолид.

Вывод

В ходе проведенных исследований я:

- Изучила характеристику, патогенез и клинику стафилококковых инфекций.
- Провела статистический анализ профиля исследуемого биоматериала в бактериологической лаборатории «Краевого клинического центра охраны материнства и детства».
- Провела идентификацию возбудителя из бактериологического материала.
- Провела исследование на чувствительность выделенного микроорганизма к антибиотикам.
- И выяснила что у новорожденных и рожениц чаще всего диагностируется эпидермальный и золотистый стафилококк.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень заболеваемости ИСМП (Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи) в 2016 году свидетельствует об отсутствии должного контроля за эпидемической ситуацией в стационарах, о неготовности медицинских организаций к проведению превентивных мер по предупреждению внутрибольничного заражения, формирования штаммов возбудителей с высокой вирулентностью и резистентностью к противомикробным средствам. Профилактика ИСМП требует строгого контроля за соблюдением требований санитарного законодательства по обеспечению инфекционной безопасности в МО.

Проведя микробиологические исследования рода стафилококка, я определила, что большая часть заболеваний связанных с этим микроорганизмом приходится на золотистый стафилококк (*S. aureus*).

Свидетельствуя государственным докладом Российской Федерации можно сказать, что за период 2014 – 2016 годы случаев гнойно – септических встречается больше чем внутриутробных инфекций.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году» – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017;
2. Министерство здравоохранения СССР Приказ № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» 1985 г.;
3. Мотавкина Н.С., Пьянова Р.Е. «Микробиологическая диагностика некоторых капельных инфекций и токсоплазмоза». Методическая разработка для студентов - ВГМУ, 2010 г.;
4. Мясоедова Е.И., КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства». Стандартная операционная процедура (СОП) «Бактериологическое исследование отделяемого из зева (носа) на носительство *Staphylococcus aureus*» - Красноярск, 2017 г.;
5. Мясоедова Е.И., «Статистические данные по исследованию стафилококковых инфекций» - Красноярск, 2014-2016 гг.;
6. А.М.Смирнова, А.А.Трояшкин, Е.М.Падерина: микробиология и профилактика стафилококковых инфекций - "Медицина", 2010;
7. А.М.Смирнова: вопросы иммунологии и микробиологии стафилококковых и стрептококковых инфекций - Ленинград, 2015;
8. Стафилококковые инфекции: российский сб. науч. тр. - С.-П., 2014;
9. Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А. «Микробиология» - Москва: Медицина, 2014 г.;
10. <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%82%D0%B0%D1%84%D0%B8%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%BA%D0%BA%D0%B8>
[Электронный ресурс];

11. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%97%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B8%D1%81%D1%82%D1%8B%D0%B9_%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%84%D0%B8%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%BA%D0%BA [Электронный ресурс];
12. https://medaboutme.ru/zdorove/publikacii/stati/sovety_vracha/epidermalnyy_stafilokokk_bolezni_i_lechenie/ [Электронный ресурс];
13. https://www.ayzdorov.ru/lechenie_stafilokokk_epider.php[Электронный ресурс];