

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)
ГБПОУ РС(Я) «ЯКУТСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»**

Допущена к защите
Зам.директора по УР

 Иванова М.Н.



**ВИНОКУРОВА АКУЛИНА КОНСТАНТИНОВНА
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СТАФИЛОКОККА
И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ**

Выпускная квалификационная работа
по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

Студент отделения «Лабораторная диагностика»

Винокурова А.К.

Гр. ФЛ 31

Руководитель – преподаватель микробиологии

Габышева Л.Ю.

Якутск – 2018 г

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА I. ХАРАКТЕРИСТИКА, РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ К АНТИБИОТИКАМ.....	5
1.1 Общая характеристика стафилококка.....	5
1.2. Резистентность и устойчивость стафилококка к антибиотикам.	11
ГЛАВА II. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СТАФИЛОКОККА И УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ.....	17
2.1. Исследование лабораторных методов диагностики стафилококка и устойчивости к антибиотикам.....	17
2.2. Анализ статистических данных лабораторных исследований стафилококковых инфекций за 2015-2017 гг.	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	30
ВЫВОДЫ.....	30
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	31

ВВЕДЕНИЕ

Золотистые стафилококки (*Staphylococcus aureus*) – грамположительные условно-патогенные бактерии рода *Staphylococcus*, являющиеся наиболее частой причиной стафилококковых, в частности внутрибольничных, инфекций. Золотистые стафилококки в норме могут располагаться на коже, слизистой оболочке носа и реже в гортани, влагалище, кишечнике. Они встречаются у 30 % здоровых людей.

Если у человека слабая иммунная система или нарушен нормальный состав микрофлоры, то при повреждении кожи (слизистых оболочек) золотистый стафилококк может приводить к разнообразным местным и системным инфекционно-воспалительным поражениям:

1. кожи (карбункулам, импетиго, фолликулиту),
2. молочных желез (маститы),
3. дыхательных путей и ЛОР-органов (тонзиллиту, гаймориту, отиту, фарингиту, ларинготрахеиту, пневмонии),
4. мочевыводящих путей (уретриту, циститу, пиелонефриту),
5. пищеварительной системы (энтероколиту, аппендициту, перитониту, парапроктиту, холециститы),
6. костно-суставной системы (остеомиелиту, артриту).

В отдельных случаях возможна генерализация инфекции с развитием септикопиемии. Производимый золотистым стафилококком энтеротоксин вызывает пищевые отравления и синдром токсического шока. Основные источники инфекции: здоровые (носители) и больные люди, домашние и сельскохозяйственные животные, а также пища, содержащая возбудитель инфекции (чаще всего это сахаросодержащие молочные продукты). Инфицирование может происходить контактным и воздушно-пылевым путем. Возможно аутоинфицирование.

Для идентификации золотистого стафилококка проводится посев клинического материала на питательные среды, где при наличии *S. aureus* через 18-24 часа наблюдается рост колоний золотистого цвета. Существуют отдельные разновидности (штаммы) золотистых стафилококков, устойчивые к действию ряда антибиотиков. Наибольшее значение в развитии внутрибольничных инфекций имеют метициллин-резистентные золотистые стафилококки (MRSA), которые способны производить особый пенициллин-связывающий белок, обеспечивающий их устойчивость к большинству антибиотиков из группы пенициллина. Поэтому наряду с идентификацией возбудителя целесообразно провести определение его чувствительности к антибиотикам для подбора эффективной антибактериальной терапии.

Актуальность состоит в том, что в наше время в медицине широко используются антибиотики. Но в процессе их использования, обнаружилось возникновение устойчивости к антибиотикам у бактерий. И чем дольше человечество лечится антибиотиками, тем быстрее бактерии приспосабливаются к новым препаратам, так как отбираются не только сами гены устойчивости, но и механизмы их быстрого приобретения патогенными бактериями. Наука начала исследовать причины данного явления и выявила несколько механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам.

Так как, стафилококк является активной инфекцией, вызванной грамположительными микроорганизмами, которая возрастает во всем мире.

Цель исследования: изучение микробиологической диагностики стафилококка на устойчивость к антибиотикам.

Задачи:

1. Изучить общую характеристику стафилококковых инфекций.
2. Рассмотреть методы для проведения исследования на чувствительность стафилококка к антибактериальным препаратам..
3. Определить устойчивость бактерий стафилококка к антибактериальным препаратам.

ГЛАВА I. ХАРАКТЕРИСТИКА, РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ СТАФИЛОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ К АНТИБИОТИКАМ

1.1 Общая характеристика стафилококка.

Стафилококки обычно встречаются в виде скоплений, напоминающих виноградную гроздь. Форма - шаровидная, диаметр 0,5 – 1,5 мкм, в мазках располагаются в виде гроздьев винограда (что определяется характером деления кокков в трех взаимно перпендикулярных плоскостях), по Граму окрашиваются положительно. Золотистые стафилококки образуют капсулу полисахаридной природы. Отдельные кокки, приметно 1 мкм в диаметре, имеют тенденцию объединяться в скопления, поскольку их деление происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и дочерние клетки сохраняют своеобразное пространственное групповое взаиморасположение. При специальных условиях они могут располагаться поодиночке, попарно, или в виде коротких цепочек. Они грамположительны, неподвижны, не образуют спор и активно растут практически на всех искусственных средах, обычно образуя непрозрачные, гладкие, блестящие колонии.

Поскольку стафилококки продуцируют каталазу, перекись водорода, образующаяся как метаболит при аэробных условиях, для них нетоксична, и, большей частью, они лучше растут в присутствии кислорода. Однако они легко переносят отсутствие кислорода, а некоторые из них даже являются строгими анаэробами. Они лучше растут при температуре 25 – 35°C, но могут расти и при 8° и при температуре выше 48°C.

При культивировании на кровяном агаре в аэробных условиях образуют пигменты – от золотистого до лимонно-желтого и белого цвета. Золотистый пигмент дал название одному из видов стафилококка – *Staphylococcus aureus*. Однако, при этом, некоторые штаммы золотистого стафилококка могут продуцировать и белый пигмент.

Стафилококки устойчивее других бактерий к действию жара, света, высушивания, экстремальных температур и химических агентов. Они выдерживают 60°C в течение часа, а отдельные штаммы даже 80°C в течение 30 минут, хотя большинство вегетативных форм бактерий погибают при воздействии 60°C в течение 30 минут.

Благодаря своей устойчивости к высушиванию стафилококки могут переноситься с частицами пыли, могут недели и месяцы сохраняться в высохшем гное или мокроте. Другой особенностью стафилококков является их устойчивость в солевой среде (не погибают при концентрации NaCl до 15%). В связи с этим способны сохраняться в консервированных продуктах (пресервах). В продуктах питания, сохраняемых путем соления, стафилококки могут расти и продуцировать энтеротоксин.

Эти микробы устойчивы к действию фенола и большинству других дезинфектантов, чувствительны к основным красителям. Имеют тенденцию к формированию резистентности к сульфаниламидам и антибиотикам. Около 80% штаммов *Staphylococcus aureus* резистентны к пенициллину.

Род *Staphylococcus* представлен тремя видами:

1. *Staphylococcus aureus*;
2. *Staphylococcus epidermidis*;
3. *Staphylococcus saprophyticus*.

Виды различаются преимущественно по биохимическим свойствам и вырабатываемым ферментам. *Staphylococcus aureus* ферментирует, манит в анаэробных условиях и продуцирует коагулазу, тогда как два других вида лишены этих свойств.

Staphylococcus saprophyticus – первично - сапрофитический. Он является потенциально - патогенным, обладает ограниченной инвазивностью. Способен вызывать инфекцию мочевого тракта.

Существует так же классификация по патогенности:

Безусловно - патогенные: вызывают гемолиз на кровяном агаре и некроз кожной ткани кролика при внутрикожном введении через 1-2 часа.

Условно - патогенные: вызывают коагуляцию цитрата плазмы через 6 часов и при внутрикожном введении кроликам вызывает незначительное воспалительный процесс (гиперемия, инфильтрация).

Сапрофиты: не вызывают гемолиза на кровяном агаре и коагуляцию цитрата плазмы, при внутрикожном введении кроликам поражений практически не вызывают.

Патогенность

Некоторые стафилококки непатогенны, другие (*S.aureus*) вызывают тяжелые инфекции. *S.epidermidis*, хотя иногда и вызывает легкие, ограниченные поражения, в общем, относится к непатогенным, за исключением некоторых необычных медицинских ситуаций, например, при введении в организм человека с лечебной целью технических устройств, чужеродных для тканей организма. Обычно *S.epidermidis* является частой причиной эндокардита, развивающегося при протезировании сердечных клапанов и инфекций, осложняющих ортопедическое протезирование или нейрохирургическое шунтирование.

Хорошо известны стафилококковые инфекции кожи и поверхностных тканей тела, такие как пиодермии, фурункулы, абсцессы, карбункулы, паронихии, импетиго (*impetigo contagiosa*) и инфекционные осложнения хирургических ран. Клиника инфекции кожных покровов зависит от возраста больного. Например, «синдром ошпаренной кожи» наблюдается у маленьких детей.

Стафилококки также способны вызывать заболевания целых систем и поражаться могут практически все органы и ткани. Они могут быть одной из причин пневмонии, гнойного плеврита, эндокардита, менингита, абсцесса мозга, послеродовой лихорадки, флебита, цистита и пиелонефрита. Стафилококковая пневмония является фатальным осложнением эпидемического гриппа. Стафилококки являются наиболее распространенной причиной остеомиелита. Стафилококковые заболевания часто возникают в больницах, особенно у пациентов, уже серьезно больных. Например,

стафилококковая пневмония – это суперинфекция, угрожающая больным, принимавшим большие дозы антибиотиков.

Стафилококковая септицемия наблюдается в двух формах. Первая – это глубокая молниеносная токсемия, через несколько дней приводящая к смерти. Другая, более частая форма, длится дольше, сопровождается развитием метастазирующих абсцессов в разных частях тела, но не является необратимой.

Стафилококковая септицемия может быть первичной, но чаще это результат вторичного проникновения в кровотоки микроорганизмов из местного очага инфекции. Часто процесс начинается как тривиальное воспаление волосяного фолликула. Микроб может поступать в кровоток из инфицированной раны, из очага пневмонии, или из инфицированного внутривенного катетера. Катетер внутри вены не должен оставаться дольше 3-4 дней из-за риска возникновения серьезной инфекции. Поверхностные гнойники, фурункулы вокруг носа и губ легко осложняются септицемией, поэтому лучше избегать их травмирования.

Так называемый «опасный треугольник» – это треугольный участок лица от углов рта, верхней губы и до верхней части носа. Из этой области возможно распространение инфекции непосредственно в полость черепа, что может быть опасным для жизни. Такое осложнение связано с особенностями анатомического строения этой части тела: отсутствие надежных механических барьеров, вены, не имеющие клапанов, которые бы затрудняли обратный ток крови, наличие мускулатуры, постоянно находящейся в движении.

Даже при таких манипуляциях как прокалывание ушей (в косметических целях), проводимых без соблюдения необходимой стерильности, есть опасность развития вторичной стафилококковой инфекции, которая из открытой ранки может проникать в кровоток и иногда приводить к развитию сепсиса.

Стафилококки могут быть причиной энтерита и энтероколита, осложняющего антибиотико - терапию. Они являются наиболее частой причиной пищевого отравления, так как в пище может накапливаться в большом количестве токсины.

Стафилококки могут вызывать иногда гнойно-воспалительные процессы у коров и лошадей. В случае развития мастита микроб может попасть в молоко. Могут возникнуть гнойничковые поражения кожи рук доярок. Возможно заражение других животных в стаде.

Госпитальная стафилококковая инфекция

Человек тесно связан с повсеместно распространенными стафилококками (убиквитарный микроорганизм), и поэтому стафилококковая инфекция представляет угрозу в любом месте и в любое время. Пример тому – госпитальная инфекция, уже на протяжении многих лет являющаяся серьезной проблемой для больниц во всем мире.

С этой проблемой связан ряд вопросов, требующих обсуждения. Прежде всего, стафилококковая госпитальная инфекция – это осложнение широкого применения антибиотиков. Эти важнейшие антимикробные препараты очень широко и свободно назначаются, но их действие преимущественно бактериостатическое, а не бактерицидное. Стафилококки наделены хорошей приспособляемостью и среди них возникают устойчивые к антибиотикам штаммы. Во-вторых, особенности медицинского страхования и медицинской службы способствуют раннему выявлению болезни и ранней госпитализации большего числа больных. В-третьих, расширение объема и числа хирургических вмешательств. Сложная хирургическая техника позволяет оставлять ткани открытыми дольше. В-четвертых, отдельные виды терапии могут вызывать угнетение иммунной системы (иммунодепрессию). Например, трансплантация тканей и органов на фоне назначения средств, подавляющих отторжение. В этих случаях подавляется резистентность к инфекции.

Эпидемиология

Стафилококки в норме обитают на коже человека, а так же на слизистой ротовой полости, глотки и носа. Они могут находиться здесь постоянно, пока однажды не преодолеют кожный или слизистый барьер и не вызовут развитие болезни. В другом случае они проникают через неповрежденную кожу в волосяные фолликулы и протоки сальных желез.

В норме способность стафилококка к инвазии и резистентность хозяина хорошо сбалансированы, поэтому инфекция не развивается, пока не создастся ситуация, когда встречаются высоковирулентный микроб или макроорганизм со сниженной резистентностью.

Как правило, развивается локальный процесс – абсцесс или фурункул, без распространения инфекции. Но в части случаев микроб выходит за пределы локальной инфекции, попадает в кровоток и поражает разные ткани и органы тела.

Механизм передачи инфекции преимущественно контактный. Например, через руки персонала в больнице. Персонал подвергается риску стать носителями, в этом случае стафилококк может длительно находиться у них на слизистой носа. Носители могут стать источниками инфекции.

Бактериологическая диагностика

При гнойных процессах возбудителями могут быть разные микроорганизмы: все пиогенные кокки, кроме того — бактерии синезеленого гноя, микобактерии и другие. Поэтому главный и точный метод — бактериологическая диагностика, то есть выделение чистой культуры и идентификация стафилококка.

Схема бактериологической диагностики гнойного процесса:

- 1) взятие материала — гной (стерильными тампоном или шприцем);
- 2) ориентировочная микроскопия гноя (мазок готовим, окраска по Граму). В поле зрения видны лейкоциты и явление фагоцитоза;
- 3) посев гноя на ЖСА по методу Дригальского;
- 4) изучение колоний:
 - а) изучить культуральные свойства

- б) оценить чистоту колоний
- 5) пересев чистой культуры на МПА;
- б) изучение свойств выделенной чистой культуры.

Бактериологическая диагностика сепсиса — выделение культуры из крови. Это называется выделение гемокультуры.

1.2. Резистентность и устойчивость стафилококка к антибиотикам.

Одной из важнейших проблем современной медицины является неудержимое распространение устойчивости *Staphylococcus aureus* к антибиотикам.

Бензилпенициллин появился в 1941 г., а спустя 4 года уже были описаны устойчивые к бензилпенициллину штаммы. В 50-х гг. появились другие антибиотики (хлорамфеникол, тетрациклины, макролиды, аминогликозиды), и вновь очень быстро возникли штаммы, устойчивые к каждому из этих препаратов.

Устойчивость *Staphylococcus aureus* к пенициллинам обусловлена образованием бета-лактамаз стафилококков - ферментов, разрушающих бета-лактамное кольцо пенициллинов .

Механизм действия бета-лактамных антибиотиков сводится к инаktivации пенициллинсвязывающих белков (транспептидаз, катализирующих последние стадии образования пептидогликана). Чувствительные к метициллину штаммы *Staphylococcus aureus* вырабатывают четыре пенициллинсвязывающих белка , три из которых необходимы для размножения бактерии. Все четыре белка инаktivируются бета-лактамными антибиотиками .

Бета-лактамазы стафилококков проявляют в основном пенициллиназную активность, в отличие от бета-лактамаз грамотрицательных бактерий , обладающих преимущественно цефалоспориновой активностью. Синтез бета-лактамаз запускается индукторами, в роли которых выступают сами бета-лактамные антибиотики .

Сейчас эти ферменты вырабатывает подавляющее большинство штаммов *Staphylococcus aureus*.

В 1960 г. вошел в практику метициллин, первый полусинтетический пенициллин, устойчивый к бета-лактамазам. Однако буквально на следующий год появились и метициллиноустойчивые штаммы *Staphylococcus aureus*. В последующие годы процент метициллиноустойчивых штаммов неуклонно рос, чему способствовало беспорядочное применение антибиотика. Сейчас в большинстве больниц США эта цифра составляет 5-10%, но в некоторых крупных больницах превышает 40%. Среди внебольничных штаммов *Staphylococcus aureus* метициллиноустойчивые встречаются редко. Исключение составляют группы риска, в частности инъекционные наркоманы, среди которых распространено носительство метициллиноустойчивых штаммов.

Чувствительность к метициллину точнее всего определяется методом диффузии в агаре. Классический вариант метициллиноустойчивости кодируется так называемым локусом метициллиноустойчивости (*mec*) - фрагментом ДНК длиной 30000-50000 нуклеотидов со свойствами транспозона. Этот локус имеется у метициллиноустойчивых штаммов и отсутствует у чувствительных. Расположенный в локусе ген *mecA* кодирует разновидность пенициллинсвязывающего белка (обозначаемую РВР2' или РВР2а), который обладает меньшим сродством к бета-лактамам антибиотикам и способен замещать основные пенициллинсвязывающие белки при их инактивации.

Метициллиноустойчивые штаммы *Staphylococcus aureus* устойчивы ко всем бета-лактамам антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам), а часто и к большинству других антибиотиков. Последнее связано с тем, что они обладают крупной плазмидой, содержащей множественные локусы устойчивости. До сих пор эти штаммы оставались чувствительными к ванкомицину, но ситуация может очень скоро

измениться. В эксперименте уже продемонстрирован перенос устойчивости к гликопептидам от *Enterococcus faecalis* к *Staphylococcus aureus*.

Штаммам с так называемой пограничной метициллиноустойчивостью (фенотип BORSA) свойственна гиперпродукция бета-лактамаз. Гена *mecA* у них нет. Концентрации оксациллина, которые используются для выявления метициллиноустойчивости, оказывают на них бактерицидное действие. При заболеваниях, вызванных такими штаммами, высокие дозы полусинтетических пенициллинов, по-видимому, эффективны.

Факторы риска для приобретения резистентных инфекций.

В настоящее время отмечают два пути приобретения MRSA у людей: больничные инфекции («госпиталь-ассоциированные», HA-MRSA) и внебольничные («общество-ассоциированные», CA-MRSA). Данные инфекции относятся к разным штаммам, имеют разные молекулярные маркеры и типы гена *mec*. В таблице 1. приведены сравнительные данные, выделенные у людей в Якутске.

Характеристика	HA-MRSA	CA-MRSA
Клинические проявления	- области хирургического вмешательства - инвазивные инфекции (пневмонии, инфекции в кровеносной системе)	- кожные инфекции - редко инвазивные - рецидивирующие
Эпидемиология	- пожилые люди - связь с медицинскими учреждениями	- молодые люди - спортсмены - исправительные учреждения - казармы
Резистентность к антибиотикам	Множественная резистентность	Резистентность к β -лактамам

Таблица 1.

У мелких домашних животных чаще возникает MRSP ввиду того, что данный микроб более характерен для кожи животных. Наиболее часто данная инфекция выявлялась в послеоперационных ранах и при пиодерме, реже при отитах, инфекциях мочевыводящих путей и артритах. Зарегистрировано несколько случаев инфекций у людей, связанных с MRSP, полученных от животных. Особенно могут быть подвержены пожилые люди и дети, а также люди при различных иммунодефицитных состояниях (ВИЧ, химиотерапия,

иммуносупрессивное лечение, и т. д.). Меры по предотвращению распространения резистентных инфекций. Даже без признаков инфекций животное или человек может быть носителем резистентного штамма, таким образом представляя опасность для окружающих. В случае возникновения инфекции, связанной с этим штаммом, лечение может быть затруднительным ввиду устойчивости к препаратам.

При выявлении резистентного штамма у животного принимаются меры, сходные с таковыми при других инфекционных заболеваниях. Соблюдается гигиена владельцами и, обязательно, персоналом клиники, наблюдающей пациента. Используются антисептики для рук, одноразовые перчатки, одноразовые полотенца, помещение обрабатывается дезинфицирующими растворами, поверхности смотровых столов или стационарные клетки при возможности подвергаются фламбированию. В случае MRSA владельцам рекомендуется провериться на носительство штамма, взяв посев в медицинской лаборатории. Основные места носительства стафилококков у людей – ноздри, у собак – ноздри, глотка и анус. В клиниках рекомендуется периодически брать смывы с поверхностей на бак посев, чтобы контролировать появление резистентных инфекций и качество дезинфекции. Особое внимание уделяется деколонизации, т. е. устранению носительства резистентного штамма. Интенсивно используются антисептики – шампуни с 4% хлоргексидином у собак, назальные мази с мупироцином для собак и людей, хотя, конечно, полной деколонизации далеко не всегда удается достичь. Для профилактики появления резистентных инфекций созданы руководства, в основном направленные на ограничение использования антибиотиков.

Вывод таков, что возникающие трудности с лечением резистентной инфекции делают эту проблему объектом особого внимания во всем мире и в медицине, и в ветеринарии. Устойчивые штаммы могут передаваться от человека к животному и наоборот. Бактерии способны обмениваться с другими штаммами и даже с другими видами бактерий генетической

информацией, включая гены, несущие мутации. Необходимо серьезно относиться к бактериальной резистентности, которая все чаще встречается у мелких домашних животных, причем далеко не последнюю роль в этом играет назначение и применение антибиотиков.

Выбор антибиотиков при лечении стафилококковых инфекций

К бензилпенициллину большинство штаммов Золотистого стафилококка устойчивы, однако пенициллины и цефалоспорины, нечувствительные к действию β -лактамаз, при стафилококковых инфекциях используют. При тяжелых инфекциях методом выбора считается в/в введение нафциллина и оксациллина. Бензилпенициллин остается препаратом выбора при инфекциях, вызванных чувствительными к нему штаммами. Эффективны и комбинированные препараты, состоящие из пенициллинов и ингибиторов β -лактамаз, но их целесообразнее использовать при смешанных инфекциях. При аллергии к пенициллинам обычно назначают цефалоспорины. Однако делать это нужно осторожно, особенно если аллергические реакции на пенициллины были немедленного типа. Предпочтительно использовать цефалоспорины первого поколения (например, цефазолин) – они достаточно активны, имеют нужный спектр действия и относительно дешевы. Лучший из препаратов резерва для в/в введения – ванкомицин. Диклоксациллин и цефалексин, назначаемые внутрь, рекомендуются для лечения легких инфекций, а также для длительного лечения. Можно использовать и другие препараты, если инфекция вызвана чувствительным к ним штаммом.

В большинстве случаев использование двух и более препаратов, к каждому из которых *Staphylococcus aureus* чувствителен, не дает никаких преимуществ. Аминогликозиды и β -лактамы проявляют синергизм *in vitro* и ускоряют исчезновение возбудителя из крови при инфекционном эндокардите. Лечение бактериемии часто начинают с комбинации именно этих препаратов (в первые 5–7 сут), и мы считаем это правильным. Более длительное применение токсичных аминогликозидов не

оправдано. Комбинация рифампицина с β -лактамым антибиотиком (или с ванкомицином) бывает высокоэффективна при инфекциях, устойчивых к другим схемам антимикробной терапии, в частности – при наличии в очаге инородного тела или лишенных кровоснабжения тканей. Однако при использовании такой комбинации возможно усиление токсичности и, теоретически, ослабление бактерицидной активности обоих препаратов. Поэтому рифампицин применяют только как препарат резерва – в особо тяжелых случаях, когда невозможно дренировать очаг инфекции. Для монотерапии препарат непригоден, так как к нему быстро развивается устойчивость.

ГЛАВА II. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СТАФИЛОКОККА И УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

2.1. Исследование лабораторных методов диагностики стафилококка и устойчивости к антибиотикам

Основной метод — бактериологический; разработаны и внедрены серологические реакции. В случае необходимости (при интоксикациях) прибегают к биологической пробе. Материалом для бактериологического исследования служат кровь, гной, слизь из зева, носа, отделяемое ран, мокрота (при стафилококковой пневмонии), испражнения (при стафилококковом колите), в случае пищевых интоксикаций — рвотные массы, испражнения, промывные воды желудка, подозрительные продукты.

Материал засевают на кровяной агар (гемолиз), на молочно-солевой (молочно-желточно-солевой) агар (угнетается рост посторонних бактерий за счет NaCl, лучше выявляются пигмент и лецитиназа). Выделенную культуру идентифицируют по видовым признакам, определяют у нее наличие основных признаков и факторов патогенности (золотистый пигмент, сбраживание маннита, гемолиз, плазмокоагулаза), обязательно проверяют чувствительность к антибиотикам, в случае необходимости проводят фаготипирование. Из числа серологических реакций для диагностики гнойно-септических заболеваний применяют РПГА и ИФМ, в частности для определения антител к тейхоевой кислоте или к видоспецифическим антигенам.

Для определения энтеротоксигенности стафилококков используют три метода:

- 1) серологический — с помощью специфических антитоксических сывороток в реакции преципитации в геле обнаруживают энтеротоксин и устанавливают его тип;

2) биологический — внутривенное введение фильтрата бульонной культуры стафилококка кошкам в дозе 2—3 мл на 1 кг веса. Токсины вызывают у кошек рвоту и понос;

3) непрямой бактериологический метод — выделение из подозрительного продукта чистой культуры стафилококка и определение у него факторов патогенности (образование энтеротоксина коррелирует с наличием других факторов патогенности, в частности РНК-азы).

Бактериологический метод:

1. материал для исследования: слизь из зева.
2. Взятие материала.
3. Посев на МПА.
4. Инкубация в термостате 37 градусов 24-48 часов.
5. Изучение колоний:
6. Выведение чистой культуры, микроскопия.
7. Постановка биохимических тестов: плазмокоагулаза, лецитиназа, среды Гисса, манноза, галактоза, чувствительность к антибиотикам.

Для выявления патогенных стафилококков делают посевы в жидкую накопительную среду, содержащую 10–15% хлористого натрия. После 24–48-часового термостатирования проводят посев на МПА и идентифицируют патогенные стафилококки. Дифференциацию патогенных и сапрофитных стафилококков проводят по способности вызывать коагуляцию плазмы и по чувствительности к бактериофагам.

В настоящее время выделено около 40 различных фаготипов стафилококков. Фаготипизирование имеет большое значение для дифференциации стафилококков и определения источников загрязнения продуктов. При дифференциации патогенных и сапрофитных стафилококков учитывают

также пигменто-образование, ферментацию маннита и гемолитические свойства. В качестве селективно-дифференциальных сред используют молочно-солевой и кровяно-солевой агар. Чистую культуру стафилококков из фекалий, рвотных масс получают на среде Чепмена, которая содержит 7% хлористого натрия, кристалл-виолет, лактозу или на желточно-солевом агаре (ЖСА) с 10% поваренной соли в 10–20% желточной взвеси. Большая концентрация хлористого натрия подавляет развитие посторонней микрофлоры, но не препятствует росту стафилококков.

Этапы выделения чистой культуры:

Этапы выделения чистой культуры аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов.

Этапы	Методы
1. Изолированные колонии.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Забор исследуемого материала. 2. Посев на плотную или жидкую питательную среду.
2. Изучение посевов.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Изучают культуральные свойства. 2. Отмечают подозрительные колонии. 3. Делают мазки и окрашивают по Граму. 4. Пересевают на МПА для выделения чистой культуры.
3. Изучение свойств чистой культуры	Изучают рост на скошенном агаре, делают мазок и окрашивают по Граму. Идентифицируют по ферментативным, биохимическим и др. свойствам.

4. Определение вида микроорганизма	На основании свойств делают вывод о принадлежности культуры к определенному виду.
------------------------------------	---

Чувствительность к антибиотикам.

У многих штаммов золотистого стафилококка развилась устойчивость к воздействию антибиотиков. Если носитель (зараженный) принимает антибиотики, он убивают только штаммы, которые не являются устойчивыми, оставив в основном устойчивые к антибиотикам штаммы, которые могут снова размножиться.

Метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (MRSA): Штаммы бактерий, устойчивые к бета-лактамым антибиотикам называются метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (MRSA).

Метод дисков. Бумажные диски, пропитанные определенными антибиотиками, помещают на газон исследуемой бактериальной культуры в чашке Петри. По-севы инкубируют в течение 16-24 часов, после чего учитывают результаты опыта по образованию зон задержки роста бактерий.

По диаметру зон задержки роста ориентировочно судят о степени чувствительности бактерий к антибиотикам (рис. 1). Зона задержки роста до 15 мм указывает на слабую, до 25 мм - на среднюю и свыше 25 мм - на высокую чувствительность. Более точные результаты получают при использовании метода серийных разведений.

Рис.1 Зоны задержки роста при дисковом методе определения чувствительности к антибиотикам



Метод серийных разведений. Этот метод позволяет определить минимальную задерживающую концентрацию антибиотика для данного микроорганизма (МЗК) как на жидких, так и на плотных питательных средах.

МПБ разливают по 2 мл в серию пробирок. Готовят основной раствор антибиотика, для чего берут навеску антибиотика и растворяют в дистиллированной воде из расчета 1 мг антибиотика на мл растворителя.

Левомецетин предварительно растворяют в 96° этиловом спирте из расчета 0,25 мл спирта на 1 мг антибиотика; после полного растворения добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы раствор содержал в 1 мл 1 мг антибиотика.

Тетрациклин и окситетрациклин растворяют в сантинормальном растворе соляной кислоты из расчета 1 мл на 1 мг антибиотика.

Эритромицин сначала растворяют в чистом метиловом спирте из расчета 1 мл на 10 мг эритромицина. После растворения добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы получить раствор, содержащий в 1 мл 1 мг антибиотика.

Исходный раствор антибиотика в количестве 2 мл вносят в первую пробирку с МПБ, перемешивают и получают определенную его концентрацию.

Из первой пробирки 2 мл разведенного антибиотика переносят во вторую пробирку и после перемешивания переносят 2 мл в третью пробирку и т.д. до предпоследней, откуда 2 мл выливают. Последняя пробирка является контролем, в ней нет антибиотика и она свидетельствует о пригодности среды для роста культуры.

После разведения антибиотика во все пробирки вносят по 0,1 мл испытуемой бульонной культуры. Для этого используют 3-4-часовые или 18-часовые культуры, разведенные МПБ в 50 раз.

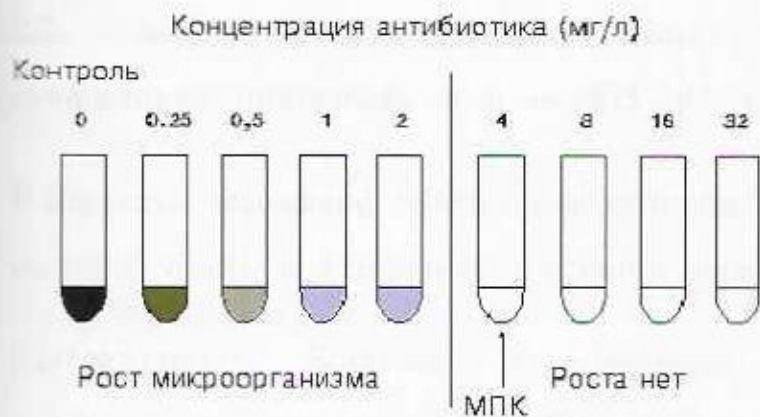
Пробирки помещают в термостат на 12-18 часов, но предварительные результаты можно учитывать через 6-8 часов.

По истечении необходимого срока инкубации определяют максимальное разведение антибиотика, которое еще подавляет рост культуры. Концентрация антибиотика в последней пробирке с видимой задержкой роста и представляет собой минимальную задерживающую концентрацию антибиотика (МЗК) или минимальной подавляющей концентрацией (МПК).

Штамм считается чувствительным к антибиотикам, если МЗК препарата для данного штамма соответствует концентрации этого препарата, создаваемой в организме. Измеряется МПК в мг/л или мкг/мл (рис. 2).

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) - наименьшая концентрация антибиотика (мг/л или мкг/мл), которая *in vitro* полностью подавляет видимый рост бактерий.

Рис.2 Определение значения МПК методом разведения в жидкой питательной среде.



Определение чувствительности микроорганизма с помощью E-теста проводится аналогично тестированию диско-диффузионным методом. Отличие состоит в том, что вместо диска с антибиотиком используют полоску E-теста, содержащую градиент концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (рис. 3). В месте пересечения эллипсоидной зоны подавления роста с полоской E-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Несомненным достоинством диффузионных методов является простота тестирования и доступность выполнения в любой бактериологической лаборатории. Однако с учетом высокой стоимости E-тестов для рутинной работы обычно используют диско-диффузионный метод.

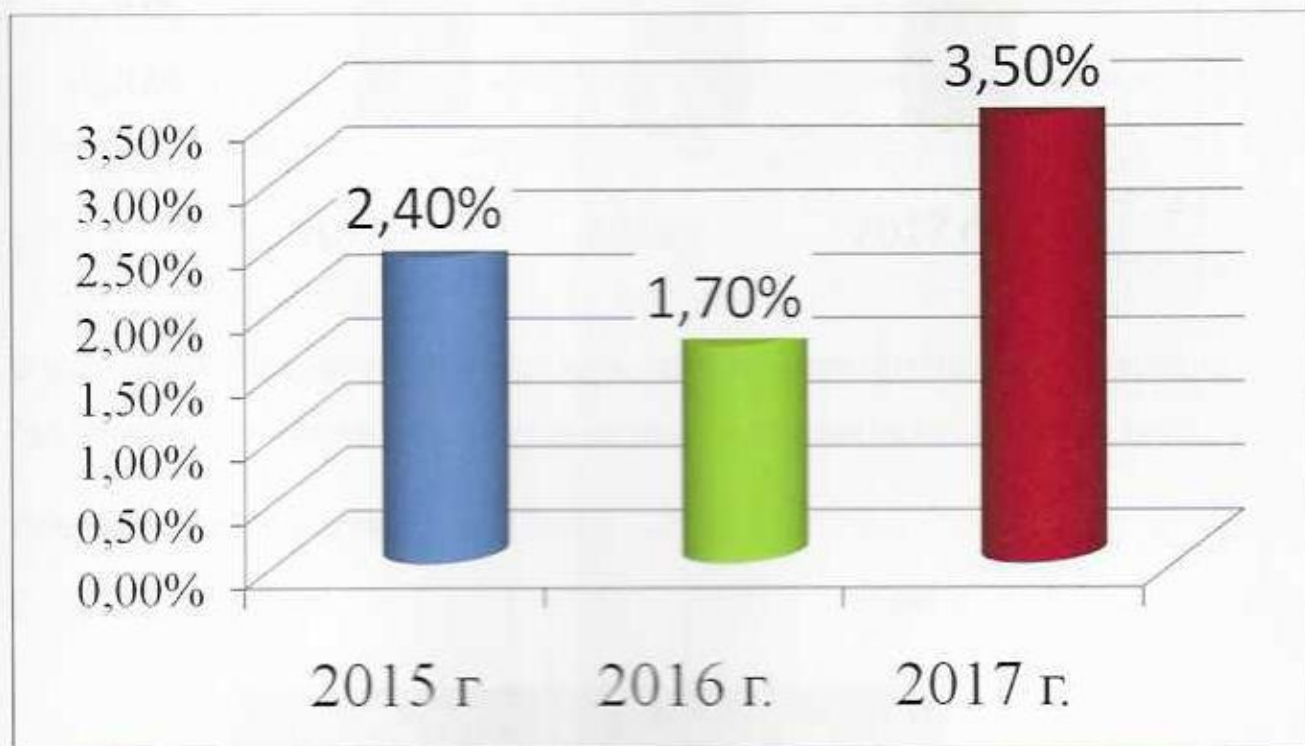
Рис.3 Определение чувствительности микроорганизмов с помощью E-тестов.



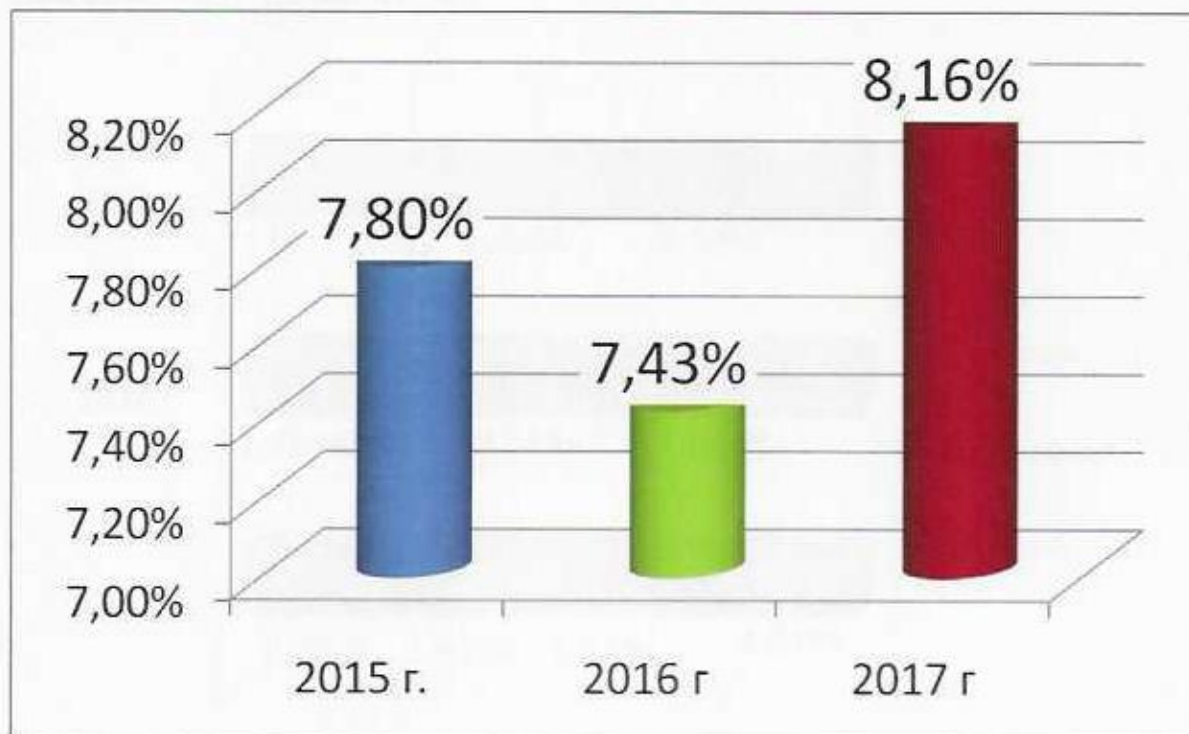
2.2. Анализ статистических данных лабораторных исследований стафилококковых инфекций за 2015-2017 гг.

В бактериологической лаборатории клиники МИ СВФУ мною были изучены годовые отчеты за 3 года и лабораторные журналы.

Высеваемость *S.aureus* из верхних дыхательных путей на стафилококконосительство за 2015-2017 гг.

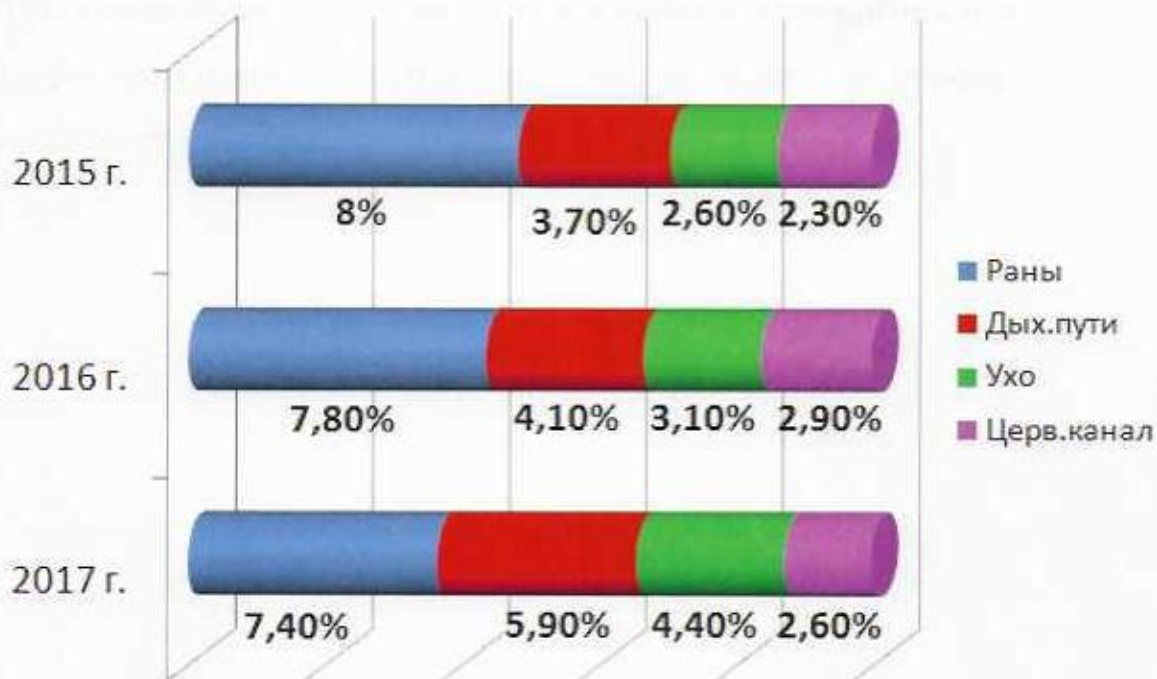


Частота идентификации S.aureus, выделенного из ран кожи за 2015-2017 гг.

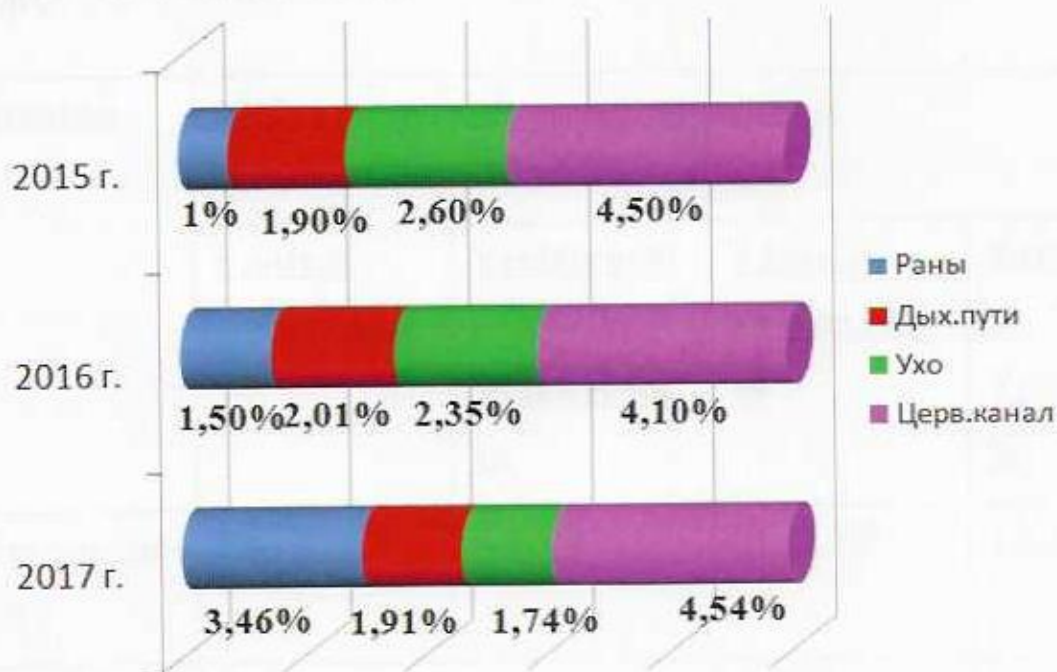


В результате анализа высеваемости различного патологического материала, был обнаружен чаще в отделяемом из ран, на втором месте из зева и носа.

Высеваемость S.aureus



Высеваемость *S.epidermidis*



Таким образом, выше указанные материалы свидетельствуют о том, что при раневой инфекции стафилококки занимают одно из ведущих мест в структуре возбудителей, а частота выделения и резистентность к антибактериальным препаратам существенно зависит от профиля конкретного стационара.

Характеристика резистентности штаммов к АБП *S.aureus*, *S.epidermidis* в различном патологическом материале лаборатории Клиники МИ СВФУ.

<u>Материал</u>	<u>2015 г.</u>		<u>2016 г.</u>	
	<u>S.aureus</u> <u>Устойчивос</u> <u>ть</u>	<u>S.epidermidi</u> <u>s</u> <u>Устойчивос</u> <u>ть</u>	<u>S.aureus</u> <u>Устойчивос</u> <u>ть</u>	<u>S.epidermidi</u> <u>s</u> <u>Устойчивос</u> <u>ть</u>
<u>Дыхательные</u> <u>пути</u>	<u>62-19,7%</u>	<u>4-8,3%</u>	<u>91-11,7%</u>	<u>12-22,6%</u>
<u>Хирургическ</u> <u>ий материал</u>	<u>3-27,3%</u>	<u>2-12,5%</u>	<u>13-8,6%</u>	<u>16-12,0%</u>
<u>Итого</u>	<u>65</u>	<u>6</u>	<u>104</u>	<u>28</u>

Исследование проводилось на базе лаборатории ГБУ РС (Я) «РБ№2», были исследованы 3 образца. В результате проведения лабораторного исследования получили следующие данные

Анализ резистентных штаммов *S.aureus* дыхательных путей пациентов методом Диффузионных-дисков.



Пациент 1.

Пол: жен

Возраст: 42 года.

Препараты	Результат	Примечание
бензилпенициллина новокаиновая проба	16%	имеет чувствительность
Эритромицин	0%	имеет устойчивость
Левифлоксацин	1,01%	имеет чувствительность
Амикацин	2,00%	имеет устойчивость
Оксацилин	13,30%	имеет чувствительность

Пациент 2.

Пол: жен

Возраст: 28 года.

Препараты	Результат	Примечание
бензилпенициллина новокаиновая проба	53,17%	имеет чувствительность

Эритромицин	0%	имеет устойчивость
Левифлоксацин	1,80%	имеет чувствительность
Амикацин	0%	имеет устойчивость
Оксацилин	14,00%	имеет чувствительность

Пациент 3.

Пол: муж

Возраст: 23 года.

Препараты	Результат	Примечание
бензилпенициллина новокаиновая проба	71,40%	имеет чувствительность
Эритромицин	6,53%	имеет чувствительность
Левифлоксацин	2,74%	имеет чувствительность
Амикацин	4,50%	имеет чувствительность
Оксацилин	15,30%	имеет чувствительность

Исследование показала, что у пациентов под номером 1, 2 имеют чувствительность к антибактериальным препаратам Эритромицину и Амикацину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Стафилококковая инфекция по данным ВОЗ продолжает повсеместно распространяться с нарастающей динамикой. Уникальность данной патологии состоит в том, что она способна поражать все органы и системы в виде локализованных или генерализованных форм.

Стафилококки являются возбудителями значительной части внебольничных и нозокомиальных бактериемий, пневмоний, инфекций кожи и мягких тканей, костей и суставов.

В данной практической работе рассмотрены методы идентификации стафилококков по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам, имеющих диагностическое значение при бактериологическом посеве различного патологического материала на предмет носительства или колонизации *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* и определение лекарственной чувствительности выделенных штаммов к антибактериальным препаратам.

ВЫВОДЫ:

1. Стафилококковая инфекция – это группа заболеваний, вызванных золотистыми стафилококками, которые могут проявляться как легкими формами (воспаление кожи), так и тяжелыми процессами (пневмония, сепсис).
2. Применение диффузионного метода для определения устойчивости к антибактериальным препаратам является доступным и эффективным.
3. В результате исследования обнаружена устойчивость стафилококка к препаратам Эритромицина и Амикацина. Резистентность к антибактериальным препаратам свидетельствует о высокой резистентности *S.aureus*. к антибактериальным препаратам, и возможности развития более устойчивых штаммов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микробиология. Учебное пособие (2007), В.В. Лысак 2015г.
2. Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология. Москва: Издательство Московского университета, 2013
3. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии (2014), А.А. Воробьев, А.С. Быков
4. Держинская И. С. Методы выделения, исследования и определения антибиотической активности микроорганизмов, обладающих антагонистическими свойствами: Методические указания к практическим работам по дисциплине Антибиотики для студентов специальности 012400 «Микробиология» / АГТУ.– Астрахань, 2015.- 76 с.
5. Иванова Г.А. Про бактерии стафилококк // Здоровье, 2015.
6. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. В 2 ч. Ч. 2 / О. В. Прунтова, М. А. Мазиров ; Владим. гос.ун-т. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2014. – 108 с.
7. Жадченко Ю.В. Фенотипические характеристики популяции *S.aureus*, выделенных от различных категорий носителей / Л.В. Крамарь, Ю.О. Хлынина, Н.В. Родионова // Фундаментальные исследования. – 2014. - №4 (2). – С.295-298.
8. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология - М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2013г, стр154.
9. Федеральные клинические рекомендации. «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2018)»

10. Брокгауз Ф.А., Ефрон А.Е. Энциклопедический словарь. М.: Медицина, 2011.
11. Рациональная антимикробная фармакотерапия /под ред. В.П.Яковлева, С.В.Яковлева. М.2010.1001 с.
12. К.С.Камышева Микробиология, основы эпидемиологии и методы микробиологических исследований, с 100-108, с 172.