

Эта часть работы выложена в ознакомительных целях. Если вы хотите получить работу полностью, то приобретите ее воспользовавшись формой заказа на странице с готовой работой:

<https://stuservis.ru/vkr/101789>

Тип работы: ВКР (Выпускная квалификационная работа)

Предмет: Микробиология

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНТЕРОКОККОВ 7

1.1 Общая характеристика бактерий рода *Enterococcus* 7

1.2 Факторы патогенности энтерококков 9

ГЛАВА 2. ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROCOCCUS* 14

2.1 Питательные среды для выделения и идентификации бактерий рода *Enterococcus* 14

2.2 Забор и транспортировка биологического материала для идентификации бактерий рода *Enterococcus* 16

2.3 Подготовка и исследование биологического материала для идентификации бактерий рода *Enterococcus* 17

2.4 Методы идентификации энтерококков в санитарной микробиологии 20

2.5 Полимеразная цепная реакция для идентификации бактерий рода *Enterococcus* 23

2.6 Методы определения лекарственной чувствительности бактерий рода *Enterococcus* 25

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 31

ВЫВОДЫ 33

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 34

слаборозовый цвет, а колонии подвижных энтерококков в зависимости от индивидуальных особенностей штамма вырастают окрашенными или бесцветными. По этой схеме можно делать посевы всех, стерильно взятых, биологических жидкостей. Если необходимо исследовать до подвида, то можно обратиться к общей схеме, согласно приложению 1.

1. Выделение энтерококков из мочи.

1 мл мочи центрифугируют при 3000 об/мин, 30 минут. Осадок наносят на чашку со средой ЕФ и ведут инкубацию 18-24 часа при 37°C. Если на чашке есть колонии, то есть энтерококк *E. faecalis*.

4. Бактериологическое исследование на кишечный дисбактериоз.

1 г фекалий разводят в 9 мл физиологического раствора, из полученной взвеси готовят десятикратные титры вплоть до 1:100000. Из двух последних разведений наносят по 0,1 мл на среду ЭДДС, после идет инкубация, 12 часов, 37°C. Количественно энтерококки определяются по числу колоний, умноженному на степень разведения и на 10. Расчет идет на 1 г фекалий.

5. Бактериологическое исследование при пищевых токсикоинфекциях.

Жидкие пищевые продукты нейтрализуют до pH 7,2-7,4 (если необходимо), твердые пищевые продукты отбирают по 20-25 грамм и добавляют примерно такое же количество 0,1% пептонной воды. Далее готовятся десятикратные разведения 0,1% пептонной водой до 10⁻⁷. Каждое разведение наносят на среду ЭДДС. Инкубируют при 37°C, 18-24 часа. Далее оценивают количество энтерококков аналогично пункту 5. Опционально использование среды ЕФ.

6. Выделение энтерококков с различных предметов, материала и оборудования больниц.

Готовят смывы объемом 0,2 мл, засевают на среду ЖЩА. параллельно засевают такой же объем в среду накопления (сахарный бульон, 6,5% хлористого натрия). Инкубация 24 часа, 37°C. Если есть колонии, то идентификацию проводят согласно общей схеме, в соответствии с приложением 1 [2, 12, 18, 19, 20].

2.4 Методы идентификации энтерококков в санитарной микробиологии

Так же идентификацию энтерококков проводят не только в области здравоохранения, но и в области контроля качества продуктов питания (мясная и молочная отрасли), поэтому есть отдельные методики идентификации энтерококков, утвержденные Роспотребнадзором.

Для исследования энтерококков в интересующих объектах используют посевы на твердые или жидкие питательные среды. Прямой посев на селективные питательные среды с последующим подсчетом выросших колоний следует проводить при исследовании продуктов с относительно высоким содержанием

энтерококков (сырое молоко, творог и творожные изделия). Результаты на плотных питательных средах учитывают через 24—48 ч инкубации при 37°C.

При небольшом обсеменении продуктов энтерококками (молоко после пастеризатора, пастеризованное молоко) рекомендуется проводить посев в жидкую среду накопления. Этот посев подразумевает под собой два этапа: посев в среду накопления и подтверждающий тест.

Методика определения с использованием твердых питательных сред. Готовятся десятикратные разведения исследуемого продукта в соответствии со стандартным методом.

В качестве питательных сред необходимо использовать среду Пейкера (Packer) или молочную среду с полимиксином по Г. П. Калине.

Расплавленные и охлажденные до 45-48°C питательные среды заливаются тонким слоем (примерно 1 см) в чашки Петри. После застывания чашки со средой могут быть использованы для посевов или хранятся в холодильнике при температуре +4°C в течение 7-10 дней. Из исследуемых разведений в зависимости от цели исследования (при определении энтерококков как санитарнопоказательных высеваются 1-4 разведения продукта; при пищевых отравлениях - 4-7 разведения) берутся по 0,1 мл и высеваются на подсушенную поверхность питательной среды Пейкера или Г. П. Калины. Высеянный материал тщательно втирается шпателем в поверхность питательной среды, но без нарушения целостности ее рельефа. Посевы инкубируются в термостате при температуре 37°C в течение 48 ч [2, 8, 10, 20].

Типичные колонии энтерококков обладают округлой формой, ровными краями, блестящей поверхностью, диаметром 1,5-2 мм и фиолетовой окраской на коричнево-красном фоне среды Пейкера или красной с зоной протеолиза на светло-голубом фоне среды Г. П. Калины. Подсчитываются все типичные колонии, и число их пересчитывается на 1 г или 1 мл продукта. 3-5 колоний отсеиваются на скошенный агар для дальнейшей идентификации. Посевы культивируются при температуре 37°C в течение 24 ч [2, 8].

Из колоний, которые выросли на скошенном агаре, готовятся мазки и окрашиваются по Граму.

Одновременно определяется их каталазная активность. Для этого на очищенное обезжиренное стекло наносят каплю 1%-ного водного раствора пероксида водорода и в нем растирают петлю культуры. Если при этом отсутствует выделение пузырьков газа, значит, реакция отрицательная. Грамположительные каталазоотрицательные диплококки изучаются по шести тестам Шермана:

- температурные границы роста от 10 до 45°C;
- рост при 6,5% NaCl;
- рост при pH 9,6;
- рост в желчи или 40%-ном желчном бульоне;
- рост в молоке с 0,1%-ным метиленовым голубым;
- терморезистентность (выдерживают при температуре 60°C в течение 30 мин) [2, 10, 20].

Для ускоренной дифференциации культуры можно высевать только на бульон, который содержит 40% желчи и имеет pH 9,6. Одновременно для рядовой дифференциации культуры высеваются на среды, которые содержат теллурит калия, 2,3,5-ТТХ, кровь, молоко, сорбит, маннит и раффинозу.

Определение с использованием жидких питательных сред. Готовятся десятикратные разведения в соответствии со стандартным методом. В роли питательных сред применяются щелочно-полимиксиновая среда (ЩЭС), желчно-нитратная среда, среда Эндо с кристаллическим фиолетовым и полимиксином.

При небольшом обсеменении молочных продуктов энтерококками 1 мл продукта и соответствующих разведений засеваются в пробирки со средой ЩЭС. Посевы инкубируются при температуре 37°C в течение 24-48 ч. Из каждой засеянной пробирки петлей пересеваются образцы на чашки Петри с подсушенной желчно-цитратной средой или средой Эндо с кристаллическим фиолетовым и полимиксином. Посевы выдерживаются при температуре 37°C в течение 24 ч.

Типичные колонии энтерококков на желчно-цитратной среде круглые, с ровными краями, диаметром 1,5-2,0 мм, розово-красного цвета, а на среде Эндо с кристаллическим фиолетовым и полимиксином - ярко-красного. При присутствии типичных колоний энтерококков на чашках Петри определяется титр, в котором были найдены энтерококки в исследуемом продукте [2, 20].

Для более быстрой дифференциации *E. faecalis* можно использовать сорбитный агар. К 1 л мясопептонного агара добавляют 10 г сорбита и 600 мг индикатора конго-красного, которые предварительно растворены в 5-7 мл дистиллированной воды (для лучшего растворения можно нагреть компоненты, но не доводя раствор до кипения, оптимальная температура около 55°C), хорошо перемешиваются и разливаются в чашки Петри. Среда будет иметь интенсивно-красную окраску.

Наличие энтерококков в посевном материале следует учитывать через 16-18 ч роста при температуре 37°C. Точечные колонии *S. faecalis* и его вариантов будут обладать черной окраской, появляясь на поверхности

бесцветной вокруг них среды. *E. faecium* и *E. faecium* var. *durans*, которые не ферментируют сорбит, будут образовывать точечные колонии без изменения цвета среды.

Так же существуют коммерческие наборы для выделения и идентификации энтерококков, например, «Селективная плотная питательная среда для выделения энтерококков, готовая к использованию, Энтерококковый (азидный) агар», изготавливаемая Центральной Фабрикой Готовых Сред. Эта среда предназначена для выделения и количественного определения бактерий рода *Enterococcus* из исследуемого материала при проведении микробиологической диагностики *in vitro* с целью поддержки диагностики инфекционных заболеваний, а также выявления источников инфекции. Входящий в состав среды пептон обеспечивает высокие питательные свойства среды. Дрожжевой экстракт служит источником витаминов, декстроза - углеводов. Азид натрия служит селективным агентом, угнетая рост грамотрицательных микроорганизмов. В качестве индикатора используется трифенилтетразольхлорид, который переходит в нерастворимую форму и окрашивает колонии энтерококка в розово-красный цвет [8, 10, 20].

2.5 Полимеразная цепная реакция для идентификации бактерий рода *Enterococcus*

Наиболее специфичным и современным методом идентификации энтерококков в частности, и любого микроорганизма в целом, является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для энтерококков часто выбирают видоспецифический ген, кодирующий синтез супероксиддисмутазы. Для каждого вида энтерококков можно подобрать праймеры, согласно таблице 2, которые будут специфичны и продукты ПЦР с их участием можно будет идентифицировать на гель-электрофореze с 1-2% агарозным гелем 1 [5, 8].

Таблица 2 - Праймеры для ПЦР-детекции 23 видов энтерококков.

Штамм Праймер Последовательность (5'-3') Размер продукта (п.н.)

E. asini ATCC 700915 AS1 GCATCATGACAAGCATCACGC 365

AS2 GGCTTTTTGCSTTCAGATAAA

E. avium ATCC 14025 AV1 GCTGCGATTGAAAAATATCCG 368

AV2 AAGCCAATGATCGGTGTTTT

E. casseliflavus ATCC 25788 CA1 TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC 288

CA2 GCTAGTTTACCGTCTTTAACG

E. cecorum ATCC 43198 CE1 AAACATCATAAACCTATTTA 371

CE2 AATGGTGAATCTTGGTTCGCA

E. columbae ATCC 51263 CO1 GAATTTGGTACCAAGACAGTT 284

CO2 GCTAATTTACCGTTATCGACT

E. dispar ATCC 51266 DI1 GAACTAGCAGAAAAAGTGTG 284

DI2 GATAATTTACCGTTATTTACC

E. durans ATCC 19432 DU1 CCTACTGATATTAAGACAGCG 295

DU2 TAATCCTAAGATAGGTGTTTG

E. faecalis ATCC 19433 FL1 ACTTATGTGACTAACTTAACC 360

FL2 TAATGGTGAATCTTGGTTTGG

E. faecium ATCC19434 FM1 GAAAAACAATAGAAGAATTAT 215

FM2 TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA

E. flavescens ATCC 49996 FV1 GAATTAGGTGAAAAAAAGTT 284

FV2 GCTAGTTTACCGTCTTTAACG

E. gallinarum ATCC 49673 GA1 TTA CTGCTGATTTTGATTCTG 173

GA2 TGAATCTTCTTTGAAATCAG

E. gilvus ATCC BAA-350 GI1 CTGGCTGGGCTTGGCTAGTGA 98

GI2 ATAATCGGTGTTTTACCGTCT

E. hirae ATCC 8043 HI1 CTTTCTGATATGGATGCTGTC 187

HI2 TAAATCTTCTTAAATGTTG

E. malodoratus ATCC 43197 MA1 GTAACGAACTGAATGAAGTG 134

MA2 TTGATCGCACCTGTTGGTTTT

E. mundtii ATCC 43186 MU1 CAGACATGGATGCTATTCCATCT 98

MU2 GCCATGATTTCCAGAAGAAT

E. pallens ATCC BAA-351 PA1 TGGCACCAAATGCTGGCGGAA 160

PA2 TGGTGTAGAAGTAATTTCAAG

E. porcinus/villorum ATCC 700913 PO1 TGGTTTCTGATATGGATGCGA 280

PO2 GTAATCGCTAATTTCTCTCCA

E. pseudoavium ATCC 49372 PV1 TCTGTTGAGGATTTAGTTGCA 173
PV2 CCGAAAGCTTCGTCATGGCG
E. raffinosus ATCC 49427 RF1 GTCACGAACTTGAATGAAGTT 287
RF2 AATGGGCTATCTTGATTCGCG
E. saccharolyticus ATCC 43076 SA1 AACACCATAACACTTATGTG 371
SA2 GTAGAAGTCACTTCTAATAAC
E. seriolicida ATCC 49156 SE1 ACACAATGTTCTGGGAATGGC 100
SE2 AAGTCGTCAAATGAACCAAAA
E. solitarius ATCC 49428 SO1 AACACCATAACACTTATGTGACG 371
SO2 AATGGAGAATCTTGGTTTGGCGTC
E. sulfureus ATCC 49903 SU1 TCAGTGGAAGACTTAATCGCA 173
SU2 CCAAATGTATCTTCGATCGCT

Также стоит упомянуть метод электронной микроскопии, с помощью которого можно идентифицировать энтерококки, но его использование нецелесообразно из-за сложности и дороговизны [5].

2.6 Методы определения лекарственной чувствительности бактерий рода Enterococcus

Бактерии рода Enterococcus являются условно-патогенными микроорганизмами для человека и обладают высокой антибиотикорезистентностью к широкому спектру лекарственных препаратов, в том числе и к антибиотикам нового поколения [4, 6, 15].

В настоящее время существуют несколько современных методов определения резистентности бактерий рода Enterococcus к антимикробным препаратам:

1. Диско-диффузионный метод
2. Метод серийных разведений
3. Определение антибиотикочувствительности на панелях
4. Метод E-теста.

Диско-диффузионный метод основан на способности антибактериальных препаратов проникать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост посеянных на агаре бактерий. Для определения чувствительности этим методом используют только стандартизированные качественные диски. После наложения дисков и инкубации культуры, рассматривают зоны подавления роста бактерий вокруг дисков. Чем больше зона подавления, тем меньше резистентность бактерий к этому антибиотику. Для проведения исследования сначала делается разведение культуры – готовится инокулюм (стандартный суспензия исследуемой культуры с концентрацией $1,5 \cdot 10$ КОЕ/мл. Для этого стерильным тампоном берется мазок с чашки Петри с выросшей культурой микроорганизма и разводится в 5 мл изотонического раствора. Приемлемым результатом для энтерококков является мутность в пределах 0,5 ед по Мак Фарланду. Далее разведенная культура пересеивают на кровяной агар несколькими способами:

1. Раствор культуры наносится небольшой каплей, а затем шпателем или стерильным тампоном растирается на всю чашку Петри;
2. Большая капля раствора культуры наносится на чашку Петри, затем покачивающими движениями равномерно распределяется по всей чашке. Остатки можно удалить пипеткой.

Затем засеянная среда подсушивается на воздухе и после этого на поверхность среды проводится нанесение дисков с определенным набором антибиотиков. Далее чашку Петри с антибиотиками термостатируют в течении 1-3 суток в термостате и по истечении этого срока рассматривают результат. Если энтерококк чувствителен к антибиотику, то вокруг определенного диска образуется зона подавленного роста, то есть будет наблюдаться отсутствие роста бактерий.

Результаты исследования, представленные на рисунках 6,7,8 были предоставлены лаборантом отдела клинической микробиологии ГБУЗ «Диагностический центр (центр лабораторных исследований) ДЗМ» Для определения лекарственной чувствительности энтерококковых бактерий можно использовать, например, использован набор антибиотиков фирмы БИО РАД. В данный набор входят: ампициллин, ципрофлоксацин, гентамицин, левофлоксацин, линезолид и ванкомицин, согласно рисунку 6.

Рисунок 6 – наименование антибиотиков набора БИО РАД

Перед нанесением дисков с антибиотиками чашку Петри визуально делят на 6 секторов, затем с помощью диспенсера антибиотика наносят на поверхность питательной среды, в соответствии с рисунком 7.

Рисунок 7 – нанесение антибиотиков на чашку Петри

На рисунке 8 представлен результат определения лекарственной чувствительности к антибактериальным препаратам бактерий *E. Faecalis*.

Рисунок 8 – Результат определения антибиотикорезистентности диско-диффузным методом

Согласно рисунку 8, *E. faecalis* проявил наибольшую чувствительность к ампицилину (1), ванкомицину (5) и линезолиду (6). К ципрофлоксацину, гентамицину и левофлоксацину *E. faecalis* проявил резистентность [4, 6, 10, 12, 19].

Метод Е-теста (эпсилонметрический метод) так же, как и диско-диффузионный метод, основан на подавлении роста бактерий. На тест-полоску нанесены последовательные разведения антибиотика от меньшего к большему. Процедура проведения теста проста: тест-полоска с реагентом кладется на поверхность засеянного агара. После инкубации результат

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Приказ Министерства Здравоохранения СССР от 22 апреля 1985 г.

№ 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

2. Методические указания № 2500-81 от 4 декабря 1981 г. «Методические рекомендации по выделению и идентификации энтерококков», утвержденные Министерством здравоохранения СССР.

3. Gao, W. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen / Gao W., Howden B.P., Stinear T.P. // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2018. - 41. - P.76-82.

4. Golob, M. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat / Golob M., Pate M., Kušar D., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2019; 2019:2815279.

5. Park, J. Development of a Rapid Identification Method for the Differentiation of *Enterococcus* Species Using a Species-Specific Multiplex PCR Based on Comparative Genomics/ Park J., Jin G.D., Pak J.I., Won J., Kim E.B. // *Curr. Microbiol.* 2017; 74(4):476-483.

6. Raza, T. Vancomycin resistant *Enterococci*: A brief review / Raza T., Ullah S.R., Mehmood K., Andleeb S. // *J Pak Med Assoc.* 2018; 68(5):768-772.

7. Бухарин О.В., Валышева И.В. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков// О.В. Бухарин, И.В. Валышева, О.Л. Карташова, М.В. Сычева. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015. - №3.

8. Гармашева, И.Л. Идентификация и таксономия энтерококков / И.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко // *Мікробіол. журн.* - 2015. - Т. 72. - № 5. - С. 49-58.

9. Зайцева, Е.А. Роль факторов патогенности *Enterococcus faecalis* в развитии пиелонефрита у детей // Зайцева Е.А., Крукович Е.В. Мельникова Е.А., Лучанинова В.Н., Коменкова Т.С., Вайсера Н.С. ТМЖ. 2017. №2.

10. Короткевич, Ю.В. Анализ резистентности к антибиотикам энтеробактерий и энтерококков, выделяемых из пищевых продуктов/ Короткевич Ю.В. // *Вопросы питания.* 2016. №2.

11. Красная, Ю.В. Значение бактерий рода *Enterococcus* в жизнедеятельности человека/ Красная Ю.В., Нестеров А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. // *Современные проблемы науки и образования.* - 2014. - № 6.

12. Любимова, А.В. Эпидемиология ванкомицин-резистентных энтерококков в отделениях различного профиля / Любимова А.В., Шаляпина Н.А., Колоджиева В.В., Ряховских С.А., Дмитриева О.В., Бродина Т.В., Шишмаков А.А. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* - 2016. - №4. - С.89

13. Миронова, А.В. Факторы вирулентности энтерококков/ Миронова А.В., Коршукова О.А. // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* - 2015. - №2. - С. 12-16

14. Оганян, К.А. Энтерококки и их роль в перинатальной патологии / Оганян К.А., Аржанова О.Н., Зацюрская С.Л., Савичева А.М. // *Ж. акушерство и женские болезни.* - 2015. - №5.

15. Светоч, Э.А. Антибиотикорезистентность культур *Enterococcus* spp., выделенных от промышленной птицы в 2013–2016 гг. В хозяйствах Российской Федерации, и детекция у них генов резистентности к ванкомицину // Светоч Э.А., Теймуразов М.Г., Тазина О.И., Абаимова А.А., Лев А.И., Асташкин Е.И., Леонова Е.С., Карцев Н.Н., Детушев К.В., Ерусланов Б.В., Дятлов И.А., Фурсова Н.К. Альманах клинической медицины. - 2017. - №2.

16. Сычева, М.В. Антибиотикорезистентность бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из организма человека в норме и при патологии / Сычева М. В., Карташова О. Л., Щепитова Н. Е., Сафронов А. А. // *Антибиотики и химиотерапия.* - 2016. - №7-8.

17. Сычева, М.В. Биологические свойства энтерококков различного происхождения / Сычева М.В.,

Карташова О.Л. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2015. №4.

18. Фёдорова, А.В. Использование селективной хромогенной среды для детекции ванкомицинорезистентных энтерококков / Фёдорова А.В., Клясова Г.А. // КМАХ. - 2018. - №1.

19. Щепитова, Н.Е. Антибиотикорезистентность фекальных изолятов энтерококков / Щепитова Н.Е., Сычёва М.В. // БОНЦ УрО РАН- 2019.- №2.

20. Щепитова, Н.Е. Скрининг штаммов энтерококков с целью разработки на их основе препаратов-пробиотиков / Н.Е. Щепитова, М.В. Сычёва, О.Л. Карташова // Вестник ОГУ. -2018. - №13. - С.188.

21. Щуплова, Е.А. Антигемоглибиновая активность энтерококков / Щуплова Е. А., Герцен Н. В., Фадеев С. Б., Вальшев А. В. // Вестник ОГУ. - 2016. - №13. - С.174.

Эта часть работы выложена в ознакомительных целях. Если вы хотите получить работу полностью, то приобретите ее воспользовавшись формой заказа на странице с готовой работой:

<https://stuservis.ru/vkr/101789>