

УДК 576.851.214

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СТРЕПТОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Диц Е.В.

ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия»,
Тюмень, e-mail: kozlov@tyumsma.ru

При изучении антибиотикограмм сопутствующей микрофлоры стрептококковых инфекций выявлен антибиотик, обладающий бактерицидным действием на сопутствующую микрофлору, но не снижающий репродуктивную активность стрептококков. На основании проведенных исследований предложен способ получения изолированных колоний стрептококков, заключающийся в следующем: для выделения аэробных стрептококков проводят посев исследуемого материала на 5% кровяной МПА, а затем на поверхность питательной среды с посевом наносят диски с гентамицином в количестве 8–9 штук. Через 18–20 часов роста бактерий при температуре 37°C на поверхности плотной питательной среды вокруг дисков с гентамицином наблюдается рост изолированных колоний стрептококков. Для выделения стрептококков, обладающих анаэробными свойствами, предварительно делали посев исследуемого материала на печеночный бульон Китта-Тароцци, а затем через 18–20 часов проводили пересев на 5% кровяной МПА для получения изолированных колоний стрептококков. Предложенный способ позволяет повысить процент выделения стрептококков из исследуемого материала, сократить время проведения микробиологических исследований по выделению изолированных колоний стрептококков.

Ключевые слова: стрептококки, диагностика, изолированные колонии

SOME ASPECTS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF STREPTOCOCCAL INFECTIONS

Dic E.V.

The Tyumen state medical academy, Tyumen, e-mail: kozlov@tyumsma.ru

When studying the antibiotikogramm accompanying microflora streptokokkovykh infections identified antibiotic, possessing bactericidal at accompanying microflora, but not reducing the reproductive activity of Streptococcus. On the basis of studies proposed by way of getting isolated colonies of Streptococcus: Streptococcus are to aerobic culture of material at 5% blood MPA, and then on the surface of breeding with seeding without disks and gentamycin in the number 8–9 PCs. Through 18–20 hours of growth of bacteria at a temperature of 37°C c at the surface of dense growth around disks and gentamycin nablúdetsâ growth isolated colonies of Streptococcus. To distinguish Streptococcus with anaerobic properties previously done seeding this material with liver broth Kitto-Tarocci, then after 18–20 hours had Pérez at 5% blood MPA to obtain isolated colonies of Streptococcus. The suggested method allows to increase the percentage allocation of Streptococcus from a researched material, reduce the microbiological research to provide isolated colonies of Streptococcus

Keywords: streptococcus, diagnostics, isolated colonies

Стрептококковые инфекции продолжают оставаться в числе наиболее острых проблем здравоохранения во всех странах мира. Бактерии рода *Streptococcus* классифицируют по антигенным свойствам (на основании имеющихся полисахаридов), выделяя серогруппы, изучают биохимические и гемолитические свойства. Наиболее патогенным для человека является *Streptococcus pyogenes* группы А, вызывающий у человека гнойно-воспалительные и инфекционно-аллергические заболевания. Диагностика стрептококковых инфекций включает использование бактериоскопического метода, определение стрептококковых антигенов в патологическом материале с помощью ИФА или латекс-агглютинации, бактериологического метода идентификации возбудителей инфекции и серологического метода по определению антител к стрептококкам группы А. В последнее время широко распространен метод ПЦР, позволяющий установить диагноз заболевания в 3 раза чаще по сравнению с классическими бактериологическими методами

исследований [1, 2, 4]. Эти данные свидетельствуют о необходимости совершенствования микробиологической диагностики стрептококковых инфекций. Стрептококки колонизируют кожные покровы, слизистые оболочки, носоглотку, желудочно-кишечный тракт и влагалище [5]. Для возбудителей инфекции характерна множественность механизмов и факторов передачи, но наиболее характерен воздушно-капельный механизм передачи. У школьников в холодный сезон года носительство стрептококков в носоглотке достигает 25% [6].

В большинстве случаев возникновение стрептококковых инфекций связано с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Причинами роста заболеваемости гнойно-воспалительными стрептококковыми инфекциями являются селекция и формирование госпитальных штаммов, обладающих высокой вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью, что требует совершенствования систем надзора и контроля за ИСМП [7].

Описан общепринятый способ получения чистой культуры стрептококков [6], который имеет следующие недостатки: изолированные колонии можно получить только на 3-й день микробиологического исследования, в процессе культивирования бактерий не удаляется посторонняя сопутствующая микрофлора слизистых оболочек зева и миндалин, на 2-й день пересева материала на кровяной мясопептонный агар (МПА) не всегда удается определить микробы, подозрительные на стрептококк, и поэтому приходится делать пересев на кровяной МПА бактерий, не относящихся к стрептококкам, что требует большего расхода питательных сред для выделения изолированной колонии стрептококков. Известно также, что гемолитические свойства стрептококков не являются диагностическим тестом для выявления патогенных стрептококков. Патогенные стрептококки под влиянием антибиотиков и факторов внешней среды могут утратить гемолитическую активность, что существенно затрудняет выделение стрептококков из исследуемого материала.

Согласно Приказу Минздрава СССР от 22.04.1985 г. №535 «Об унификации микробиологических методов исследований, применяемых в клинично-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» изолированные колонии стрептококков получают по результатам посева исследуемого материала со слизистых оболочек носоглотки методом штриха с использованием тампона на чашки Петри с 5% кровяным МПА. Через 20 часов роста в условиях термостата при 37°C проводят учет выросших бактерий. Затем бактериологической петлей из разных точек питательной среды с ростом бактерий берут материал из колоний и делают пересев бактерий на сектора чашек Петри с 5% кровяным МПА методом штриха, а затем через 20 часов определяют наличие колоний стрептококка по культуральным свойствам. Основные недостатки предложенного способа: большой расход питательных сред, малая вероятность выделения стрептококков, что не позволяет установить роль стрептококков в возникновении внутрибольничной инфекции.

А.С. Лабинская [3] предложила способ получения изолированных колоний стрептококков по результатам выделения возбудителя со слизистых оболочек носоглотки при посевах на чашки Петри с 3% кровяным МПА с последующим изучением культуральных свойств и морфологических признаков стрептококков. Исследуемый материал вносили на чашки Петри с 3% кровяным МПА методом отпечатков, а затем шпателем распределяли микробные

клетки по всей поверхности питательной среды. Через 18–20 часов роста в условиях термостата при температуре 37°C учитывали рост колоний. Идентифицировали штаммы стрептококков серологической группы А, образующие колонии трех видов: мукоидные, шероховатые и гладкие. Предложенный способ не обеспечивает 100% выделение стрептококков из исследуемого материала, так как методом отпечатков тампоном удается произвести посев лишь небольшого количества бактерий, находящихся на поверхности слизистых оболочек носоглотки; не удаляется выделенная со слизистых оболочек носоглотки сопутствующая микрофлора, обладающая антагонистическими свойствами, а также удается идентифицировать только штаммы стрептококков серологической группы А, а патогенные для человека штаммы стрептококков серогруппы С и G не определяются. Использование предложенных питательных сред и культивирование в аэробных условиях не позволяет выделять стрептококки с анаэробным типом дыхания.

Итак, сложность лабораторной диагностики и эпидемиологические предпосылки циркуляции стрептококков в лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ) дают основания для совершенствования методов лабораторной диагностики стрептококковых инфекций.

Цель исследования – повышение эффективности выделения возбудителей стрептококковых инфекций из исследуемого материала при возникновении ИСМП.

Задача исследования. На основании изучения антибиотикограмм сопутствующей микрофлоры стрептококковым инфекциям выявить антибиотик, обладающий бактерицидным действием на сопутствующую микрофлору, но не влияющим на снижение репродуктивной активности стрептококков. Добавление данного антибиотика в питательную среду для роста стрептококков позволит разработать способ получения изолированных колоний стрептококков.

Материал и методы исследования

В период с 1997 по 2011 г. обследовано 5300 больных. В содержимом из зева выделена сопутствующая микрофлора стрептококковой инфекции. Для определения чувствительности выделенной сопутствующей микрофлоры к антибиотикам использовали диско-диффузионный метод. В опытах использовано 16–20 часовых культур бактерий. Концентрацию бактерий доводили по стандарту мутности до 0,5 ед. по McFarland на физиологическом растворе хлорида натрия (рН 7,2–7,4). Приготовленную взвесь вносили на чашки Петри с 5% кровяным МПА в количестве 0,2 мл и равномерно распределяли на поверхности питательной среды. Через 15 минут на поверхность питательной среды наносили диски с антибиотиками.

Посевы инкубировали при 37°C в течение 24 часов с последующим определением задержки роста бактерий вокруг дисков с антибиотиками. Использовали следующие диски с антибиотиками: стрептомицин, эритромицин, гентамицин, амикацин, линкомицин, бензилпенициллин, олеандомицин, цефаклор, цефуроксим, цефатоксим, цефалексин.

Для выделения стрептококков, обладающих анаэробными свойствами, проводили посев исследуемого материала на печеночный бульон Китта-Тароцци. Через 18–20 часов роста бактерий при 37°C проводили пересев взвеси бактерий со среды Китта-Тароцци на 5% кровяной МПА. На поверхность кровяного МПА

вносили 0,1 мл взвеси бактерий и шпателем равномерно распределяли их по поверхности плотной питательной среды. На поверхность посевов помещали диски с гентамицином в количестве 8–9 штук на чашку Петри и распределяли их на равном расстоянии друг от друга. Через 18–20 часов роста бактерий при температуре 37°C вокруг дисков с гентамицином отмечался рост изолированных колоний стрептококков, обладающих анаэробными свойствами.

Предложенный способ получения изолированных колоний стрептококков поясняется графическим материалом. На рисунке представлена схема получения изолированных колоний стрептококков.

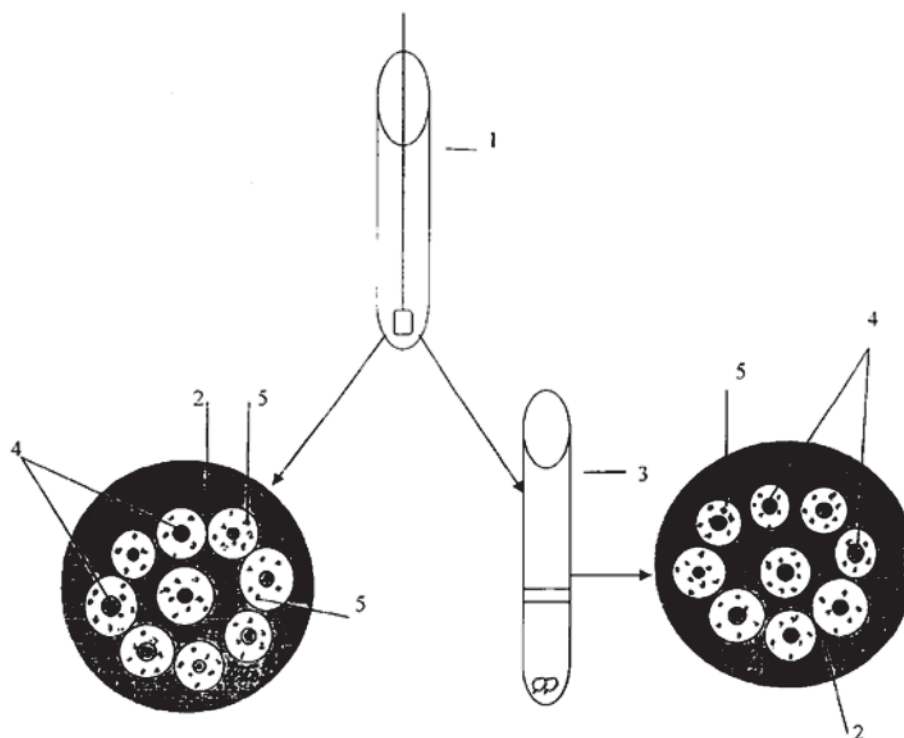


Схема получения изолированных колоний стрептококков. Обозначения:
1 – сбор исследуемого материала от больного (слизь из зева и с миндалин), 2–5% кровяной МПА,
3 – среда Кита-Тароцци для выращивания бактерий с анаэробным типом дыхания,
4 – диски с гентамицином, 5 – выросшие изолированные колонии стрептококков на кровяном МПА, обладающих аэробными и анаэробными свойствами

Способ выделения изолированных колоний стрептококков апробирован на базе бактериологической лаборатории Тюменского филиала ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту». Выделены госпитальные штаммы стрептококков серогруппы А (тип 8, 10, 13) и серогруппы С (тип 20, 21).

По материалам проведенных исследований оформлена заявка на изобретение №2012100122 от 10.01.2012 г. «Способ получения изолированных колоний стрептококков». В настоящее время заявка рассматривается на стадии экспертизы по существу.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследований показали, что в мазках из зева сопутствующая микрофлора была чувствительна к гентамицину

в 90–96% случаев, а выделенные культуры стрептококков были резистентны к гентамицину. На основании результатов анализа антибиотикограмм сопутствующей микрофлоры стрептококковой инфекции предложен способ выделения изолированных колоний стрептококков из смешанных микробных популяций. Способ заключается в следующем: с помощью тампона берут налет, слизь с миндалин и слизистых оболочек зева, затем методом штриха проводят посев исследуемого материала на 5% кровяной МПА, равномерно распределяя бактерии по поверхности питательной среды. На поверхность кровяного МПА с посевом исследуемого материала наносили диски с гентамицином в количестве 8–9 штук,

равномерно распределяя их на поверхности питательной среды. Через 18–20 часов роста бактерий при температуре 37°C на поверхности кровяного МПА вокруг дисков с гентамицином наблюдался рост изолированных колоний стрептококков. Для выделения стрептококков, обладающих анаэробными свойствами, предварительно делали посев исследуемого материала на печеночный бульон Китта-Тароцци, а затем через 18–20 часов роста бактерий при 37°C проводили пересев взвеси бактерий со среды Китта-Тароцци на 3% кровяной МПА. На поверхность кровяного МПА вносили 0,1 мл взвеси бактерий, равномерно распределяя их на поверхности плотной питательной среды. На посевах с микробной взвесью помещали диски с гентамицином в количестве 8–9 штук. Через 18–20 часов роста бактерий при температуре 37°C вокруг дисков с гентамицином отмечался рост изолированных колоний стрептококков, обладающих анаэробными свойствами. С помощью предложенного метода выделено 34 культуры стрептококков.

По сравнению с традиционными методами микробиологической диагностики стрептококковых инфекций предложенный способ позволяет уменьшить расход питательных сред, повысить процент выделения стрептококков из исследуемого материала, что позволяет своевременно и в более полном объеме проводить противоэпидемическое расследование и осуществлять мероприятия, направленные на предупреждение возникновения ИСМП стрептококковой этиологии.

Следует отметить, что сложность и низкая эффективность выделения стрептококков из исследуемого материала при диагностике инфекционных заболеваний связана с тем, что сопутствующая микрофлора по сравнению со стрептококками более устойчива во внешней среде, неприхотлива к питательным средам, как правило, обладает антагонистическими свойствами и поэтому при инфекционных заболеваниях выделенную микрофлору от больных часто выделяют и идентифицируют преимущественно из группы условно-патогенной сопутствующей микрофлоры. При обследовании ожоговых больных в популяциях сопутствующей микрофлоры наиболее часто определялся эпидермальный стафилококк.

Заключение

Итак, стрептококки, в отличие от условно-патогенной микрофлоры и стафилококков, менее устойчивы во внешней среде, часто обладали анаэробными свойствами и медленнее размножались на питательных средах. Поэтому не всегда удается выделять

чистую культуру стрептококков традиционными микробиологическими методами.

Предложенный способ позволил повысить процент выделения стрептококков из исследуемого материала, сократить время проведения микробиологических исследований по выделению изолированных колоний стрептококков, уменьшить количество ложноотрицательных результатов исследований и снизить расход питательных сред в процессе лабораторной диагностики стрептококковых инфекций. Сокращение сроков проведения лабораторных исследований позволяет в ранние сроки и в более полном объеме проводить противоэпидемические мероприятия при возникновении ИСМП, вызываемых стрептококками.

Список литературы

1. Алешукина А.В. Медицинская микробиология. – Ростов н/Д.: Феникс, 2003. – 480 с.
2. Клиническая лабораторная аналитика. Т. IV. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 691 с.
3. Лабинская А.С.. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
4. Медицинская микробиология / под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. – 1200 с.
5. Медицинская микробиология / под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-мед, 2001. – 768 с.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / под ред. А.А. Воробьева. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 691 с.
7. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. – М.: Минздрав России, 2011. – 22 с.

References

1. Aleshukina A.V. Medicinskaya mikrobiologiya. Rostov n/D: Feniks, 2003. 480 p.
2. Klinicheskaya laboratornaya analitika. T. IV. Chastnye analiticheskie tehnologii v klinicheskoy laboratorii / Pod red. V.V. Men'shikova. M.: Medicinskoe informatsionnoe agenstvo, 2004. 691 p.
3. Labinskaya A.S.. Mikrobiologiya s tehnikoy mikrobiologicheskikh issledovaniy. M., Meditsina, 1978, 394 p.
4. Medicinskaya mikrobiologiya/ red. V.I. Pokrovskiy, O.K. Pozdeev. M.: GJEOTAR MEDICINA. 1999. 1200 p.
5. Medicinskaya mikrobiologiya/ Pod red. V.I. Pokrovskogo. M.: GJEOTAR-med, 2001. 768 p.
6. Medicinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. Pod red. A.A. Vorob'eva. M.: Medicinskoe informatsionnoe agenstvo, 2004. 691 p.
7. Nacional'naja koncepcija profilaktiki infekcij, svjazannyh s okazaniem medicinskoj pomowi. M.: Minzdrav Rossii, 2011. 22 p.

Рецензенты:

Шаповалов П.Я., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гигиены с основами экологии ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», г. Тюмень;

Мефодьев В.В., д.м.н., профессор кафедры медико-профилактического дела ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», г. Тюмень.

Работа поступила в редакцию 06.06.2012.