

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Микробиологический мониторинг воздушной среды учебных аудиторий
СФУ для проведения практических занятий по микробиологии

Научный руководитель	_____	к.б.н., доцент	Н.И. Сарматова
Выпускник	_____		О.А. Хрущева
Рецензент	_____	д.б.н., доцент	О.А. Коленчукова

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Микробиологический мониторинг воздушной среды в микробиологических учебных аудиториях», содержит 76 страниц, 12 рисунков, 19 таблиц, 55 источников.

Ключевые слова: воздушная среда, мониторинг воздушной среды, золотистый стафилококк, спорообразующие палочки, резистентность к дезинфицирующим средствам, дезинфектанты.

Цель: Микробиологическое исследование воздуха в микробиологических учебных аудиториях и научно-исследовательских лабораториях и выявление устойчивости, выделенных микроорганизмов к дезинфектантам.

Задачи:

1. Применяя методы микробиологической диагностики воздушной среды, определить уровень контаминации воздуха в помещениях учебных аудиторий и провести сравнительный анализ с показателями лечебно-профилактического учреждения (ЛПУ).
2. Провести идентификацию доминирующих видов микроорганизмов среди штаммов, выделенных из учебных помещений и ЛПУ.
3. Определить чувствительность выделенной микрофлоры к дезинфектантам.
4. Дать оценку состояния воздушной среды исследуемых помещений и рекомендации по санитарно-гигиеническим мероприятиям.

В результате исследований были выявлены: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *p. Bacillus*. Чувствительность к дезинфицирующим средствам составила 100% в разных концентрациях.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	6
1 Бактериальная микрофлора.....	6
2 Санитарно- гигиенические мероприятия.....	12
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
1 Методы.....	22
1.1 Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды	22
2 Установление принадлежности культуры к роду <i>Staphylococcus</i>	26
2.1 Культуральный метод.....	26
2.2 Бактериоскопический метод	27
3 Определение ферментации глюкозы в анаэробных условиях.....	27
3.1 Видовая идентификация стафилококков	28
3.2 Идентификация <i>S. aureus</i>	29
3.2.1 Среда для определения лецитоветиллазы (лецитиназа)	29
3.2.2 Биохимическая дифференцировка стафилококков наборами НПО Диагностические системы.....	30
3.2.3 Дифференцирование <i>Enterobacteriaceae</i> специальными диагностическими системами - «Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии». .	35
4 Определение действия дезинфектанта на микробную клетку.....	39
5 Результаты.....	45
ВЫВОДЫ.....	59
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	60
БЛАГОДАРНОСТИ	61
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:	62
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	69

ВВЕДЕНИЕ

С санитарно-микробиологической точки зрения воздух представляет собой среду, в которой микроорганизмы не способны размножаться, так как в нем нет питательных веществ и влаги, а солнечные лучи оказывают бактерицидное действие.

Микробиологический мониторинг-это способ отслеживать циркуляцию патогенных и условно- патогенных микроорганизмов, изменения их структуры, развитие устойчивости к антимикробным препаратам, их свойства и особенности циркуляции. Обязательный компонент эпидемиологического надзора. Мониторинг, как и валидация, является неотъемлемой частью GMP микробиологического производства. Проводится данный вид мониторинга, как в чистых помещениях, так и в контролируемых зонах на производстве и в лабораториях.

Разработан мониторинг для лечебно-профилактических учреждений и производственных помещений, но данных мониторинга по учебным лабораториям отсутствует. Хотя в них наблюдается высокая антропогенная нагрузка, т.к. ведутся студентами микробиологические исследования с сапрофитными микроорганизмами. Оценкой микробиологического мониторинга служит: характеристика микробного пейзажа по исследуемым материалам; устойчивость к противомикробным средствам.

В воздухе постоянно присутствуют образующие пигмент кокки, споры бактерий, плесеней и актиномицетов. Микробная загрязненность воздуха имеет непостоянный характер и зависит от многих факторов. Так, болезнетворные микробы попадают в воздух с пылью из почвы и с выделениями больных людей и животных. Воздух помещений загрязняется во время сухой уборки, чихания и кашля. При этом капли аэрозоля, находящиеся в воздухе, служат источником аэрогенного заражения окружающих.

Исходя из всего этого становится понятной роль санитарно-микробиологических исследований внешней среды в учебных лабораториях и аудиториях.

Цель исследования

Изучить качественный и количественный состав воздушной среды учебных микробиологических аудиторий и лечебно-профилактического учреждения; провести сравнительный анализ полученных результатов и определить чувствительность микроорганизмов к дезинфектантам.

Задачи исследования

1. Применяя методы микробиологической диагностики воздушной среды, определить уровень контаминации воздуха в помещениях учебных аудиторий и провести сравнительный анализ с показателями лечебно-профилактического учреждения (ЛПУ).
2. Провести идентификацию доминирующих видов микроорганизмов среди штаммов, выделенных из учебных помещений и ЛПУ.
3. Определить чувствительность выделенной микрофлоры к дезинфектантам.
4. Дать оценку состояния воздушной среды исследуемых помещений и рекомендации по санитарно-гигиеническим мероприятиям.

Исследования проводились в учебной лаборатории базовой кафедры биотехнологии Сибирского Федерального Университета.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Бактериальная микрофлора

В настоящее время все большую актуальность приобретает проблема распространения возбудителей внутрибольничных инфекций. Присутствие очагов бактериального и грибкового поражения стен внутри помещений нередко способствует развитию у людей ряда заболеваний, которые возникают в результате вдыхания, а также попадания на кожу спор и мицелия микромицетов. Конидии некоторых грибов, попавших в организм респираторным путем, провоцируют аллергические реакции (*Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Mucor spp.*, *Penicillium sp*) [9].

Острая абдоминальная инфекция является одной из основных проблем современной хирургии. Клинически важной особенностью интраабдоминальных инфекций, во многом определяющей неудовлетворительный прогноз, является быстрое развитие генерализованной реакции макроорганизма в ответ на инфекционный процесс, которая обусловлена бактериальными эндо и экзотоксинами, и различными медиаторами воспаления [9].

Данные микробиологических исследований играют решающую роль для рациональной терапии абдоминальной инфекции в хирургии. Для идентификации резистентных бактерий и своевременной оптимизации назначения антибиотиков используется медицинская микробиология. Исследования, подтверждающие полимикробный характер интраабдоминальных инфекций с участием широкого спектра аэробных и анаэробных грамотрицательных и грамположительных бактерий, проводятся и в клиниках России. Как правило часто возбудителями абдоминальных инфекций и осложнений у больных хирургического профиля являются грамотрицательные бактерии, основное место среди которых занимают представители энтеробактерий (*E. coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*), псевдомонады, а также неспорообразующие анаэробы, особенно бактероиды.

Затрудняющие эффективное лечение больных, а также отличаются высокой и поливалентной резистентностью к антибиотикам [2,5].

Исходя из зарубежных источников прослеживается интерес к проблемам, связанным с сепсисом, обращая внимание врачей различных специальностей. Несмотря на применение новейших антибиотиков, современных инновационных методик медикаментозного и хирургического лечения, заболеваемость этой инфекцией не снижается. Ежегодно регистрируется тяжелый сепсис в США у 750 000 человек, из которых умирает 215.

В Европейских странах его диагностируют в 50–100 случаев на 100 000 населения. К сожалению, в России аналогичных исследований не проводилось, хотя показатель госпитальной летальности при сепсисе довольно высок и составляет 22,0– 25,4%. Вид микрофлоры, ее моно- или микст- культура по-разному воздействуют на клинику генерализованной бактериемии и ориентируют врача в решении проведения рациональной антибактериальной терапии. Что является немаловажным в повседневной клинической практике для выявления возбудителя сепсиса [35].

Но все-таки и в нашей стране ряд исследований проводится в данном направлении- один из примеров является работа Пермских врачей при обследовании и лечении 119 пациентов с генерализованными бактериемиями, госпитализированных в Краевую клиническую инфекционную больницу (ККИБ) г. Перми в 2005–2012 гг [20]. Осуществлялось микробиологическое исследование образцов крови, взятых чрескожно - у всех больных до назначения противомикробной терапии. В том случае, если присутствовало наличие очага инфекции и тяжелой формы синдрома воспалительного системного ответа (SIRS), обследование крови осуществлялось трехкратно. В то же время изучается цереброспинальная жидкость, моча, мокрота- этих же больных.

На основании результатов микробиологического исследования у 37 (31%) пациентов диагностирован сепсис, вызванный *S. aureus*, у 28 (23,5%) – *S. pneumoniae*, у 19 (15,9%) – *Escherichia coli*, у 14 (11,7%) – *Klebsiella pneumoniae*, у

8 (7%) – *Enterococcus spp.*, у 3 (2,5%) – *Pseudomonas aeruginosa*, у 2 (2%) – *Enterobacter spp.*

Следует отметить, что у поступивших в инфекционный стационар, пневмококк наряду со стафилококком оказался одним из этиологических лидеров распространенной бактериемии, в связи с чем в дальнейшем работа основывалась на освидетельствовании 65 больных, у которых сепсис был обусловлен *S. aureus* и *S. Pneumonia*. Таким образом у 13 (11%) человек этиологический фактор выявлен не был, поэтому диагностирован сепсис неспецифицированной этиологии. Этот факт не противоречит данным литературы, и обозначает отсутствие гемокультуры у 20–30% больных с сепсисом, что связано с наличием мембранного потенциала и разнообразности поверхности клеток крови, фиксирующих микроорганизмы на своих оболочках в кровеносном русле. В первую очередь эритроциты становятся разносчиками инфекции- они не способны к «самоочищению», в отличие от нейтрофилов и лимфоцитов, то впоследствии бактериальные клетки могут отделяться, переходя в плазму крови, или настолько прочно интегрироваться в клеточную оболочку, что посевы зараженных эритроцитов остаются стерильными [20].

Возраст просмотренных больных варьировался от 16 до 68 лет, помещенных в больницу со стафилококковой и пневмококковой инфекцией. Вне зависимости от нозологии более половины заболевших находились в молодом трудоспособном возрасте (31–50 лет): с пневмококковым сепсисом – 21(75%) человек, со стафилококковым – 20 (54%), $p < 0,05$. По половому составу различий не наблюдалось: при стафилококковом сепсисе мужчин было 19 (51.4%), женщин -18 (48.6%), при пневмококковом 16 (57.1%) и 12 (42.9%) соответственно. Исход болезни можно было определить по взаимодействию между членами полимикробных инфекций или между патогенами и синантропной флоры. Важными оппортунистическими патогенами можно назвать синегнойную палочку и золотистый стафилококк.

Шарлотта Фрюденлунд Михельсен с группой ученых Копенгагенского Университета проводили исследования направленного на изучение взаимодействия *S. aureus* и *P. Aeruginosa* [41].

В данном исследовании они проанализировали в условиях *in vitro* взаимодействие между *S. aureus* и коллекцией изолятов *P. aeruginosa*, представляющих различные эволюционные этапы доминирующей линии, DK2, которые развивались в течение десятилетий хронически инфицированных пациентов. В то время как раннее адаптированные штаммы *P. aeruginosa* DK2 *S. aureus* в сокультивировании на чашках, было обнаружено, что более поздние штаммы *P. aeruginosa* DK2 показали синантропные типы взаимодействия, где золотистый стафилококк не подавлялся *P. aeruginosa*, и активность роста *P. aeruginosa* усиливалась в присутствии золотистого стафилококка. Данный эффект опосредован одним или несколькими внеклеточными белками *S. aureus*, более 10 вариантов *S. aureus* в сокультивировании на чашках, было обнаружено, что более поздние штаммы *P. aeruginosa* DK2 показали синантропный тип взаимодействия, где золотистый стафилококк не подавляется *P. aeruginosa*, и активность роста *P. aeruginosa* усиливается в присутствии золотистого стафилококка. Этот эффект опосредован одним или несколькими внеклеточными белками *S. aureus*, более 10 кДа, которые также подавляются *P. aeruginosa* и препятствует лизису клеток клинически соответствующих антибиотиков, путем продвижения небольших колоний (КСМ). Синантропное взаимодействие не было отмечено стафилококком, штаммов, мутировавших в системе *Agr* или в *Sara* транскрипционной вирулентности регуляторе, а также с штаммами, не имеющих протеолитическую субъединицу, *ClpP*, протеазы *Clp*. Результаты исследования показывают, что в процессе эволюции доминирующего муковисцидоза- родословной *P. aeruginosa* выработан потенциал взаимодействия с комменсальным *S. aureus* [41].

Внутрибольничные инфекции являются актуальной темой исследования из-за постоянного изменения свойств микрофлоры, в тоже время несмотря на постоянный поиск и внедрение новых методов борьбы с госпитальными микробами. При санитарно-бактериологическом исследовании выявлены госпитальные штаммы: *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Enterobacter* и плесневые грибы. Первоначально были исследованы характеристики золотистого стафилококка, как наиболее часто встречаемого штамма являлся *Staphylococcus aureus*. Благодаря тому, что позволяет патогенной микрофлоре длительное время находиться в окружающей среде и противостоять защитным силам макроорганизма выделенные штаммы золотистого стафилококка обладают высоким персистентным потенциалом, множественной резистентностью к антибиотикам и некоторым дезинфектантам. Высокий персистентный потенциал выделенных штаммов стафилококков является фактором риска для пациентов, приводя к развитию затяжных гнойно-воспалительных заболеваний [28].

Обследования в разнопрофильных отделениях хирургических стационаров, фенотипические паттерны популяций синегнойной палочки достоверно не различались. Можно полагать, что госпитализированные в ОРИТ пациенты становятся причиной распространения высоковирулентных штаммов при переводе их в другие отделения ЛПУ наиболее высокой частотой встречаемости сходных по свойствам вариантов в различных отделениях. Преимущественно популяционное разнообразие обуславливается особенностями биотопа, послужившего источником инфицированного материала. Качественный сравнительный анализ позволил обнаружить слабую достоверную связь между присутствующей фосфолипазы и «легочным» происхождением изолята, а также между продукцией пиоцианина и выделением культуры из раны. При этом количественная оценка, не показывает статистически значимой разницы, уровня продукции пиоцианина и пиовердина с учетом материала выделения. В целом достоверно, что более выраженный их синтез нозокомиальными, чем внебольничными изолятами. Скорее всего, изучаемые признаки являются доминантными и встречаются у подавляющего большинства природных штаммов *P.aeruginosa*, наряду с этим их проявление на уровне модификационной изменчивости зависит от окружающих условий, что и выражается в фенотипической гетерогенностью [41]. Проблема внутрибольничных инфекций остается одной из самых острых в современных условиях, и все больше приобретает медицинскую и социальную значимость, несмотря на поиск и внедрение новых методов борьбы с госпитальными инфекциями. Актуальность проблемы внутрибольничных инфекций обусловлена

появлением так называемых госпитальных (как правило, полирезистентных к антибиотикам и химиопрепаратам) штаммов стафилококков, сальмонелл, синегнойной палочки и других возбудителей. К основной группе риска относятся дети и ослабленные люди, особенно пожилые, больные со сниженной иммунологической реактивностью. Заболеваемость госпитальными инфекциями колеблется от 5 до 20 % от общего числа пациентов, госпитализированных в лечебные учреждения. В тоже время, уровень смертности в группе госпитализированных и приобретших внутрибольничные инфекции пациентов в 8–10 раз превышает таковой среди госпитализированных больных без внутрибольничных инфекций. Нозокомиальные инфекции большей частью обусловлены бактериальным происхождением. Вирусные, грибковые возбудители и простейшие встречаются гораздо реже. Особенностью нозокомиальных инфекций является то, что они могут вызываться не только облигатными (например, *M. tuberculosis*), но и оппортунистическими возбудителями со сравнительно невысокой патогенностью (*S. maltophilia*, *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.* и др.), особенно у пациентов с иммунодефицитами [29].

Penicillium является оппортунистической инфекции у ВИЧ-инфицированных и других пациентов с ослабленным иммунитетом в основном в Юго-Восточной Азии, Южном Китае, Гонконге и на Тайване, с респираторными проявлениями в около одной трети пациентов. Исследования проводились на 26-летнем пациенте с ослабленным иммунитетом Представляя без ВИЧ с обструкцией дыхательных путей, вызванной – *Penicillium* [32].

2 Санитарно- гигиенические мероприятия

Гигиена рук признается как наиболее важной мерой для предотвращения внутрибольничных инфекций в медицинских учреждениях. Главным образом, в немедицинских учреждениях, гигиена рук признается в качестве ключевого элемента помогает предотвратить распространение инфекционных заболеваний. Целью исследования является оценка эффективности трех различных дезинфицирующих средств для дезинфекции рук в снижении бремени бактериального загрязнения рук в 60 здоровых добровольцев в условиях общины, как до, так и после образования о правильном использовании руки дезинфицирующими. Исследование является первым, чтобы оценить эффективность и простоту использования различных формулировок, используемых обработки рук населением в целом [46,55].

Если рассматривать показатели заболеваемости и смертности от инфекций, вызванных мицелиальными и плесневыми грибами, во всем мире, увеличение просматривается с каждым годом. Возникновение кандидозов и микозов у пациентов стационаров, вследствие высокой восприимчивости к грибковой инфекции, селекции устойчивых к антимикотикам штаммов, появления новых факторов передачи, нарушения санитарно-эпидемиологического режима в отделениях, – обуславливает актуальность данного исследования [50]. Высокие концентрации грибов в летние месяцы, по предположению Т. Сото и других исследователей не связаны со скученностью пациентов в помещениях медицинских учреждений вследствие их сапронозного происхождения. Явная сезонность высокой микологической обсемененности в помещениях медицинских учреждений обусловлена, по мнению М. Оберле и других авторов доминированием в воздухе окружающей среды в течение лета спор грибов преимущественно родов *Alternaria* и *Cladosporium* вследствие смешивания атмосферного воздуха и воздуха помещения. Роль *Aspergillus spp.*, исходя из утверждения М. Оберле, в возникновении летней сезонности не имеет значения. Так, в результате исследования воздуха лечебного учреждения, проведенного С. Ю. Баландиной и соавт., установлено, что весной и летом отмечаются высокие

концентрации грибов родов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Penicillium* и низкие – *Aspergillus spp* [7,9]. Микромицеты как возбудители микозов, могут участвовать в развитии микогенной аллергии, аллергического бронхолегочного аспергиллеза, аллергического риносинусита и т.д. Следует отметить о имеющихся данных, взаимосвязи концентрации микромицетов в помещениях различного профиля и развития заболеваний, являются противоречивыми. И единого мнения о влиянии микромицетов на организм человека до сих пор нет. Существует предположение роли грибов в качестве неспецифических иммуногенных триггеров при развитии аллергических заболеваний. Благодаря синергизму они усиливают в воздухе, даже в незначительных концентрациях, патогенное действие других компонентов аэрозоля. Могут провоцировать различные болезни у пациентов с низким иммунным ответом, из-за постоянного контакта с этими организмами и их метаболитами. Такими больными могут оказаться иммунно-компрометированные лица, пациенты инфекционных, онко-гематологических, гематологических и реанимационных отделений [12].

Одним из исследований по изучении морфологических свойств штаммов микроорганизмов, высеянных при смывах лечебно-диагностического оборудования, воздуха в отдельных структурных подразделениях, изделий общего и специального медицинского назначения, а также санитарно-технического оборудования. Микробиологические исследования выполнялись на базе лаборатории «Бактерицид» Пермского государственного национального исследовательского университета [9]. Исследование обсемененности воздушной среды осуществляли по общепринятым методикам в соответствии с приложением №2 к приказу №720 от 31.07.1978 г., МУК №3182-84 и МУК 4.2.734- 99, СанПиН 2.1.3.2630-10. Пробы воздуха отбирали в присутствии пациентов аспирационным методом с помощью автоматического пробоотборника воздуха марки ПУ-1Б в различных помещениях (палатах, процедурных и сестринских кабинетах, столовой, приемном покое и др.) на чашки Петри с селективными питательными средами Чапека-Докса, диагностические среды Сабуро. Изучение проб проводилось с использованием современных микробиологических

определителей: методом микроскопирования и идентификацией до рода, вида. По типичным морфологическим признакам подсчитывали выросшие колонии через 3-5 суток. Смывы производили стерильным тампоном в пробирки с 1% пептонной водой с добавлением глюкозы, затем засеивали на плотные питательные среды Чапека-Докса и Сабуро и термостатировали при 26°C в течение 7-14 дней. Стандартизированными микробиологическими определителями идентифицировали плесневые грибы путем микроскопирования. Для подавления контаминирующих бактерий при выявлении дрожжеподобных грибов, посеvy которых наносили через 18-20 часов на среду Сабуро, вносили антибиотики. Инкубировали при стандартных условиях - 37°C в течение 48 часов для обнаружения патогенных для человека видов грибов. Дрожжеподобные грибы идентифицировали с помощью хромогенного агара. Общее количество проб, отобранных для исследования, составило 76, в том числе – 24 пробы воздуха и 52 смыва с объектов больничной среды.

Результаты обрабатывали с помощью статистического пакета «Microsoft Excel 2000», а также методов параметрической статистики. При анализе полученных результатов определяли средние величины и стандартную ошибку ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$ [13].

Staphylococcus aureus, как метициллин чувствительный и устойчивый, представляет основу сообщества патогенных микроорганизмов по всему окружающему миру. Основным положением для этого является появление многофакторных эпидемических клонов с повышенной устойчивостью, в том числе и к антибиотикам, возможной колонизации или инвазивности. Домашние очаги инфекции этих особенных штаммов имеют главное значение для распространения в качестве ассоциационных патогенов. Стафилококки становятся реакционными агентами в домашних хозяйствах, либо в качестве колонизаторов или загрязнителей окружающей среды, что повышает риск повторяющихся инфекций. Общение инфицированных членов семьи с другими людьми или нахождение в общественных местах: включая школы и детские

учреждения, играют не последнюю роль в способности этих штаммов стать эндемичными [14]. Согласно зарубежным источникам, госпитальная пневмония стоит на втором месте по распространенности в стационарах, как приобретенная инфекция в США и прослеживается связь с большой заболеваемостью и смертностью. Ранняя диагностика пневмонии является важным эпидемиологической переменной и ключевым фактором риска для конкретных патогенов ранней пневмонии. Диагностирование заболевания на 4 день от начала, имеет лучший прогноз по лечению, в основном вызывается антибиотик-восприимчивыми бактериями. Выявление пневмонии на 5 день можно соотнести с поздним началом пневмонии, вызванной множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) бактериями и связано с тяжестью заболевания [42].

В настоящее время широко изучается распространение резистентных бактериальных агентов, являющихся главной медицинской проблемой. В клинически значимых штаммах стафилококков, генетические детерминанты, обеспечивающие устойчивость к противомикробным препаратам, располагаются на подвижных элементах- плазмидах. Плазмиды горизонтальной передачей обмениваются устойчивостями с другим бактериям в их окружении, приводящую к быстрой адаптации популяций бактерий. После распространения плазмиды-сопротивления, они начинают поддерживаться новым хозяином, даже в отсутствие селективного давления. Плазмиды устойчивости переносятся с помощью плазмиды-закодированных генетических систем, гарантирующие эффективную репликацию и сегрегационную стабильность во время деления клеток. Стафилококковые плазмиды привлекают белки эволюционно различных семей для начала репликации из плазмиды происхождения репликации [39].

Главная роль в распространении генов сопротивления, принадлежит плазмидам и интенсивное развитие множественно устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* в больницах по всему миру показывает пример этого явления.

Золотистый стафилококк нормальная флора здорового человека, но способна привести к условиям угрожающих жизни, главным образом у

ослабленных людей или пациентов, перенесших хирургические вмешательства. Стафилококки являются основной причиной внутрибольничных инфекций и отличаются от других бактерий своей предрасположенностью к развитию устойчивости к различным противомикробным препаратам. У *Staphylococcus aureus*, отмечаются гены, связанные с мобильными генетическими элементами, такие как: плазмиды, геномные острова, и транспозоны. Многие из этих элементов имеют возможность горизонтального переноса между клетками бактерий путем конъюгации, мобилизации и/или фаг-опосредованный механизм, поддерживающие распространение генов устойчивости. У стафилококка, конъюгативные плазмиды исполняют центральную роль в обеспечении межклеточного переноса ДНК как конъюгативные и мобилизуемые плазмиды, способные каждого снабдить усиливающимися множественной резистентностью и вирулентностью генов [39,40].

Одним из исследований по оценке эффективности четвертичного хлорида аммония (ЧАС) поверхностно-активного вещества в уменьшении поверхностного загрязнения стафилококковой инфекции, в постоянно действующей медицинской палате занятой пациентами, дающие положительный результат на метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (MRSA) [36]. ЧАС испытываемая антибактериальная пленка, которая распыляется на рабочую поверхность и срок ее действия прослеживается в течение 8 ч. Экспериментальное полевое исследование было разработано с ЧАС, в добавок ежедневная уборка гипохлоритом в качестве экспериментальной группы и только в качестве контрольной группы- гипохлорита очистки. Метод протирки увлажненных поверхностей применялся для отбора проб. Хлоргексидин, как дезинфицирующее средство используется в амбулаторных условиях для борьбы со вспышками метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (MRSA) и в качестве компонента программ для MRSA деколонизации и обезвреживания кожи и мягких тканей инфекций (ИКМТ) [41,42]. Было получено 83% и 77% из посевов прикроватных поверхностей MRSA-положительных и MRSA-отрицательных пациентов, зараженных стафилококком в 08:00 часов. Отмечалось увеличение

стафилококковых концентраций на 80% в течение 4-х часовой период в обычной палате и в местах клинической деятельности. Независимо от статуса MRSA пациентов, высоко располагающиеся поверхности вокруг исследуемых кроватей-единиц в экспериментальном медицинском отделении были сильно загрязнены [36,51,52].

Золотистый стафилококк является важным патогеном у педиатрических пациентов с инфекций кровотока. Эпидемиология бактериемии золотистого стафилококка, однако, не была хорошо изучена у детей в Южной Африке [41].

Ретроспективное исследование проводилось в детской больнице в Кейптауне, Южная Африка, исследовалась эпидемиология бактериемии золотистого стафилококка от 2007-2011 гг. Проведено сравнение заболеваемости, клинические проявления, факторы риска, управление и исходы метициллин чувствительного золотистого стафилококка (MSSA) и метициллин золотистого стафилококка (MRSA) бактериемийной устойчивостью [41].

Рассмотрение загрязнения пищевых продуктов и кормов микотоксинами становится все более серьезной проблемой. Микотоксины представляют собой серьезную опасность для здоровья человека и животных, а также экономики. Один из них Охратоксин А (ОТА), который является одним из наиболее распространенных микотоксинов загрязняющих корма и пищевые продукты. ОТА является вторичным метаболитом производящегося различными штаммами *Aspergillus* и *Penicillium*. При приеме внутрь, ОТА имеет ряд острых и хронических токсических эффектов-это нефротоксичным, тератогенным, иммунодепрессивный и канцерогенный (группа 2В). Как следствие, некоторые нормативные ограничения были введены на уровни ОТА в нескольких товарах. Токсический характер ОТА требует высокочувствительный и селективный метод мониторинга для защиты здоровья людей и животных [19]. Грибковые загрязнения помещений связано с неблагоприятными последствиями для здоровья людей. Исключение грибкового загрязнения требует удаления грибов, присутствующих и изменения внутренней среды, чтобы она стала менее

благоприятной для роста. Это может включать в себя обработку внутри помещений с противогрибковыми средствами для предотвращения дальнейшего роста. Однако есть ограничения: даны рекомендации по воздействию химических веществ, пригодных для внутренней грибковой реабилитации [32].

3 Механизм действия дезинфектантов на микробную клетку

3.1 Действие антисептиков на микробную клетку

Одним из механизмов формирования резистентности микроорганизмов к дезинфектантам является изменение проницаемости клеточной стенки и цитоплазматической мембраны за счет ионных каналов. Липиды, имеющие уникальные физико-химические свойства, играют важную роль в этих процессах. Они являются основным диффузным барьером для низкомолекулярных веществ, в частности, которыми являются дезинфектанты. Стоит отметить, что при соответствующих условиях, определенном количественном и качественном соотношении всех компонентов обеспечивается высокий транспорт этих веществ в клетку. Одновременно можно отметить, как устойчивость к действию дезинфектантов, так и повышенную чувствительность, из-за изменения количества и состава липидов в мембране. Естественная устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам – генетически закрепленное свойство микроорганизмов, относящихся к одному таксону, что проявляется в устойчивости (снижение чувствительности, нечувствительности) [22].

Мишени действия антисептиков разнообразны и присутствуют в клеточной стенке, мембранах и цитоплазме.

Необратимое образование перекрестных связей в структуре клеточной стенки грамположительных бактерий, может вызвать глутаровый альдегид. Нарушение мембранного потенциала, ферментов мембраны и ее проницаемости сопровождается воздействием на цитоплазматическую мембрану. Приводит к разобщению транспорта электронов и фосфорилирования, препятствует переносу

протонов через мембрану, и создает прекращение энергетических процессов, направленных к синтезу АТФ. Такие явления можно проследить при наличие таких веществ, как тетрахлорсалициланилид, трикарбанилид, трихлоркарбанилид, пентахлорфенол и 2-феноксиэтанол [22].

При воздействии на цитоплазматическую мембрану такими антисептиками, как: ЧАС, фенол, гексилрезорцин- нарушается ее проницаемость, что сопровождается утечкой цитоплазматического содержимого.

Происходит потеря клеткой калия, пуринов, пиримидинов сахара и других метаболитов. Бактериостатический эффект отмечается при кратковременном действии антисептика.

Многокомпонентная система молекул и субклеточных частиц цитоплазмы, которая может в той или иной степени подвергаться воздействию антисептиков, приводящее общую коагуляцию цитоплазмы. Такими свойствами обладают высокие концентрации биоцидов, например: хлоргексидина, фенола, солей ртути. Диссоциация рибосом на субчастицы наступает в присутствии водорода пероксида и п-хлормеркуробензоата. Нарушить функцию ДНК могут акридиновые красители, которые встраиваются в ее структуру. Галогены антисептиков взаимодействуют с тиоловыми группами белков, и их окисляют. С аминогруппами взаимодействуют: формальдегид, глутаровый альдегид и серы диоксид, воздействуя на многие клеточные системы. Например, нарушение структуры белков и других макромолекул происходит под воздействием β -пропиолактона, который алкилирует амино-, имино-, гидроксильные и карбоксильные группы, взаимодействует с тио- и дисульфидными группами. Этилена оксид также обладает подобной активностью. К высокой реактогенностью можно отнести: серы диоксид, сульфиты и бисульфиты [6].

3.2 Резистентность микроорганизмов к антисептикам и дезинфектантам

Микроорганизмы заметно различаются своими свойствами по своей резистентности к действию биоцидов. Резистентность бактерий может быть

естественная, т.е. природная и приобретенная. Приобретенная резистентность имеет наибольшее значение в практике [18]. Естественная резистентность связана с природными особенностями строения микробной клетки и ее метаболизма: наличием защитных покровов, образованием биопленок, способностью к ферментативной деградации или активному выбросу ксенобиотиков из клетки.

Проницаемость клеточных мембран у разных микроорганизмов различная. Этим определяется разная устойчивость у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Грамотрицательные бактерии, как правило, более устойчивы, это определяется трудной проницаемостью внешней мембраны. Однако ПАВ способны разрушать липополисахаридный слой внешней мембраны и проникать внутрь клетки, вызывая необратимые изменения структур клетки. Устойчивость грамотрицательных бактерий так же определяется их способностью к адгезии на поверхностях, с образованием биопленок. Верхний слой пленки (гликокаликс) защищает внутреннюю часть пленки от проникновения биоцида. Нахождение клеток внутри биопленки, при ограниченном доступе питательных веществ, способствует развитию их резистентности.

Более чувствительны к биоцидам грамположительные бактерии. Но и среди них есть устойчивые штаммы. Например, устойчивость *Staphylococcus aureus* к некоторым веществам, можно объяснить наличием на поверхности липидов, защищающих клетку.

Стоит отметить, что *P. aeruginosa* использует в качестве источника углерода- бензалкониум хлорид, и другие ПАВ, подвергая их микробной деградации, как в рабочей концентрации, так и в ниже действующей. Этот микроорганизм наиболее часто обнаруживается в растворах дезинфектантов наряду с представителями других родов [6; 19].

Способность развития резистентности у микроорганизмов следует учитывать при применении биоцидов для дезинфекции. Для эффективного проведения дезинфекционных мероприятий, следует использовать несколько химических веществ и применять их в определенном порядке.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами санитарно-бактериологического исследования в нашей работе являлись микроорганизмы, выделенные из воздушной среды учебных и научно-исследовательских лабораторий.

Для проведения микробиологического мониторинга воздушной среды были выбраны две категории аудиторий. Для проведения семинарских (сюда же вошла и преподавательская) и практических занятий по микробиологии, рисунок 1.

Аудитория	Площадь (м ²)	Пропускная способность (человек)	Назначение
Преподавательская 43-06	27,4	30	Работа со студентами
Лаборатория геносистематики 43-9а	40,8	100	Проведение семинарских занятий
Лаборатория микробиологического практикума 43-9	38,4	50	Проведение практических занятий
Лаборатория общей микробиологии 43-10	40,8	50	Проведение практических занятий

Рисунок 1 - Аудитории для проведения исследований

Аудитории имеют практически одинаковую площадь, за исключением преподавательской, но и пропускная способность данного помещения ниже. Количество студентов, находящихся в аудитории для семинарских занятий в два раза выше, чем количество студентов, проходящих через аудитории для практических занятий.

Для исследования были проведены посевы **воздуха**.

На рисунке 2 представлена схема расположения аудиторий и точки отбора материала.

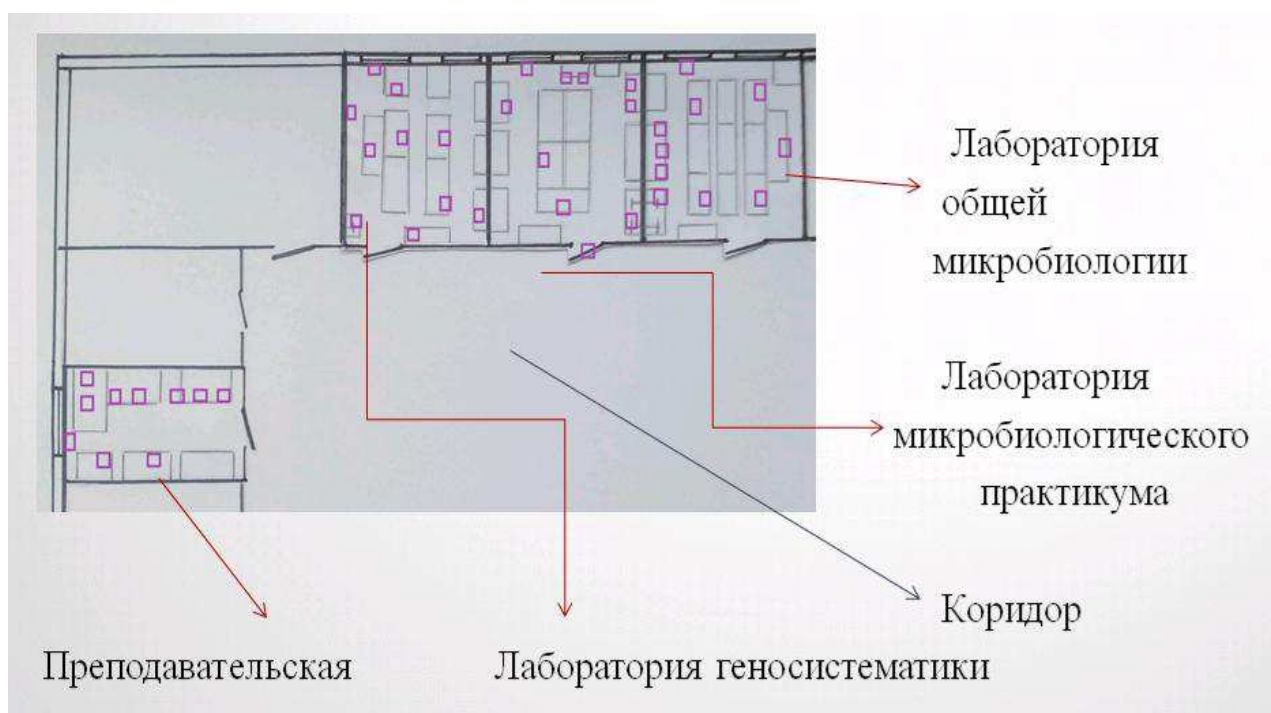


Рисунок 2 - Схема отбора проб в аудиториях

1 Методы

1.1 Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды

Наличие микроорганизмов в воздухе проводится аспирационным, седиментационным методами. В своей работе использовали седиментационный метод.

По эпидемиологическим показаниям исследования бактериальной обсемененности воздушной среды в помещениях лечебных организаций в зависимости от их функционального назначения, проводят в помещениях на санитарно-микробиологические показатели:

- Общее количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха (КОЕ/ м^3);
- Количество колоний *S. aureus* в 1 м^3 воздуха (КОЕ/ м^3);
- Количество плесневых и дрожжевых грибов в 1 м^3 воздуха [3].

Для общеобразовательных учреждений, узаконенных нормативов по бактериальной обсеменённости воздуха не существует. Для оценки чистоты воздуха закрытых помещений рекомендуют ориентироваться на местные «нормативы», которые устанавливаются для каждого помещения после его уборки как среднее арифметическое нескольких исследований.

Санитарно-гигиеническое состояние воздуха определяется по следующим микробиологическим показателям:

1. Общее количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха (так называемое общее микробное число, или обсемененность воздуха) — количество колоний микроорганизмов, выросших при посеве воздуха на питательном агаре в чашке Петри в течение 24 ч при 37 °С, выраженное в КОЕ;

2. Индекс санитарно-показательных микробов— количество золотистого стафилококка и гемолитических стрептококков в 1 м³ воздуха. Эти бактерии являются представителями микрофлоры верхних дыхательных путей и имеют общий путь выделения с патогенными микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем. Появление в воздухе спорообразующих бактерий р. *Bacillus* — показатель загрязненности воздуха микроорганизмами почвы, а появление грамотрицательных бактерий — показатель возможного антисанитарного состояния. Существуют нормативные показатели только для жилых помещений, которые можно увидеть в таблице 1 в тексте.

Таблица 1- Микробиологические критерии чистоты воздуха помещений

Качество воздуха	Всего микроорганизмов в 1 м ³ воздуха	
	Лето	Зима
Чистый	1500	4500
Загрязненный	2500	7000

3. Подсчет числа колоний в чашках Петри и рассчитать общее микробное число (ОМЧ) воздуха по формуле Омелянского В. Л. согласно которой на поверхность площадью 100 см² в течение 5 мин оседает столько микробов, сколько их содержится в 10 дм³ воздуха. Количество микроорганизмов (X) в 1 м³ воздуха рассчитывают так:

$$A \times 5 \times 100 \times 1000$$

$$X = \frac{\quad}{\quad}$$

$$C \times 10 \times V$$

X – количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха;

A – количество колоний в чашке Петри;

V - площадь чашки Петри ($\approx 78,5$, при $d = 10$ см)

C – экспозиция посева (40 мин)

После забора воздуха чашки Петри, пронумеровали маркером, закрыли крышками.

Исследование обсемененности воздушной среды осуществляли по общепринятым методикам в соответствии с приложением №2 к приказу №720 от 31.07.1978 г., МУК 4.2.2942-11, дополнение N 2 к ГН 2.1.6.711-98, СанПиН 2.1.3.1375—0 [3,22,26].

Одним из исследований являлся забор проб воздуха на среды МПА (мясопептонный агар) и Сабуро (для идентификации плесневых грибов). Забор проб проводился в учебной аудитории, учебной лаборатории, помещении автоклава, в рабочем кабинете кафедры с естественным притоком воздуха.

В своем исследовании пробы воздуха проводила микробиологический контроль воздуха с помощью методов естественной седиментации -оседание микроорганизмов. Естественная седиментация (по методу Коха) проводится в течение 40 мин путем осаждения микробов на поверхность твердой питательной среды в чашке Петри, который основан на способности микроорганизмов, в силу тяжести и под влиянием движения воздуха вместе с частицами пыли и капельками влаги, оседать на поверхность питательной среды. Для посева чашку Петри открывали в помещении на 30-40 мин. Затем чашки закрывали, подписывали и ставила в термостат на 48 часов для культивирования. Чашки Петри можно размещать в различных помещениях на различных уровнях, учитывая среднее количество бактерий. Следует отметить,

что полученные в этом случае результаты оказываются заниженными, по сравнению с данными, получаемыми при использовании аспирационного метода, в среднем в три раза, так как фракции с частицами менее 100 мкм практически не оседают [3].

В начале своего исследования чашки Петри со средой МПА и средой Сабуро держали открытыми на 40 мин в исследуемом помещении (классе, автоклавной, учебной лаборатории, в кабинете кафедры) методом расстановки - конвертом (в пяти точках).

Чашки Петри со средой МПА поместили в термостат при температуре +37°C, после чего культивировали в течение 48 ч;

чашки Петри со средой Сабуро — культивировали при температуре +25°C в течение 4–7 суток. Далее проводили подсчет выросших колоний по всей чашке.

Стандартная методика отбора проб воздуха-это аспирационный метод, при помощи аппаратов и устройств, разрешенных к применению в установленном порядке.

Количество пропущенного воздуха должно составлять 100 дм³ для определения общего количества микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов и 250 дм³ для определения *Staphylococcus aureus*. Исследование воздуха седиментационным методом не допускается [3].

Для эталонного определения общего количества микроорганизмов в 1м³ воздуха забор проб проводят на питательный агар типа МПА, СПА, ГРМ-агар и другие, приготовленные согласно инструкции по применению. Подсчет выросших колоний проводится из расчета на 1м³ воздуха, посеы инкубируются при температуре 37°C в течение (48±2) ч. Выросшие колонии плесневых и дрожжевых грибов, рассчитывают и делают пересчет на 1м³ воздуха. В протоколе Количество дрожжевых и плесневых грибов, в протоколе указывается отдельно [3].

Поверхность переносного оборудования обрабатывается, с учетом переноса из одного помещения в другое, растворами дезинфицирующего средства. Внутреннюю и внешнюю стороны аппарата Кротова, столик для

чашек Петри, внутренние стыки, крышку обрабатывают антисептиком-спиртом 70 %.

В соответствии с рекомендациями "Краткого определителя бактерий Берджи" 1980 г., род *Staphylococcus* относится к семейству *Micrococcaceae*, в которое входят также роды *Micrococcus* и *Planococcus*.

Род *Staphylococcus* состоит из трех видов: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*.

Сначала необходимо установить принадлежность выделенной культуры к семейству *Micrococcaceae* и роду *Staphylococcus*.

Чтобы установить принадлежность культуры к семейству микрококков используют тест на каталазу. Представители семейства микрококков, которые имеют фермент каталазу, расщепляют перекись водорода, образуя при этом воду и газообразный кислород. В то время как, представители родственного семейства стрептококков каталазы не имеют [25].

Основной способностью представителей семейства микрококков, имеющих фермент каталазу, является свойство расщеплять перекись водорода, с образованием воды и газообразного кислорода. В отличие от микрококков, представители родственного семейства стрептококков каталазы не имеют [25].

2 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.

2.1 Культуральный метод

Окраска колоний на плотной среде, основной признак, дифференцирующий стафилококки от микрококков. В отличии от микрококков

стафилококки имеют характерные золотистые (от палевых до ярко-золотистых) или белые колонии. 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 среде. Микрококки гемолитическими свойствами не обладают, стафилококк растворяет эритроциты, с образованием прозрачной зоны гемолиза вокруг колоний- характерный признак для большинства штаммов *S. aureus* и некоторых штаммов *S. epidermidis* [3; 25].

2.2 Бактериоскопический метод

Для микроскопии материал окрашивают 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 их размер как правило больше (диаметр 0,5 - 3,5 мкм), чем у стафилококков (диаметр 0,5 - 1,5 мкм) [3; 25].

3 Определение ферментации глюкозы в анаэробных условиях

Стафилококки являются факультативными анаэробами, растущими и ферментирующими глюкозу в анаэробных условиях; микрококки, как облигатные аэробы такой способностью не обладают [25].

При ферментации глюкозы в анаэробных условиях образуется молочная кислота, что вызывает закисление среды и рН ее снижается. Изменяя окраску индикатора, добавленного в среду.

Оптимальной средой для исследования является среда Хью-Лейфсона с индикатором бромтимоловым синим.

Готовую среду разливают по 5 мл в пробирки и подвергают дробной стерилизации. Перед посевом пробирки со средой помещают на 15 минут в кипящую водяную баню- для удаления кислорода, а затем быстро охлаждают ледяной баней [26].

Используя бактериальную петлю, суточную агаровую культуру исследуемого штамма сеют в столбик среды уколом до дна пробирки, для создания анаэробных условий на поверхность агара наливают 1,5 мл стерильного вазелинового масла. Инкубация протекает в стандартных условиях при 37 °С в течение 5 суток, регистрация результатов ежедневно. Реакция считается положительной, если происходит желтое окрашивание столбика среды, занимающее не менее 2/3 его высоты.

3.1 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* [26].

Выделенные бактерии исследовали до уровня вида по биохимическим тестам, изложенным в определителе Kreger van Rij (1986) ауксанографическим методом на среде Гисса.

Важное место в идентификации бактерий занимают биохимические исследования. Использование ассимиляционного теста, как одного из определителей, который определяет- какой из сахаров используется бактерией в качестве единственного источника углерода. Одновременно должно оцениваться сочетание ассимилируемых сахаров, специфических для бактерии.

Многие патогенные бактерии имеют свойство расщеплять углеводы и высокоатомные спирты. Под действием сахаролитических ферментов бактерий сахара расщепляются на альдегиды и кислоты. Конечными продуктами этой реакции расщепления, являются газообразные вещества: углекислый газ и вода.

Способность *S. aureus* разлагать манит в анаэробных условиях в отличии от *S. epidermidis*, позволяет его идентифицировать [26].

3.2 Идентификация *S. aureus*

Дифференциально-диагностической средой для *S. aureus* является молочно-желточный солевой агар (МЖСА). Принадлежности культуры к виду можно получить при изучении характера колоний, выросших после посева исходного материала на селективную среду стафилококков - молочно-желточный солевой агар (МЖСА) [25].

3.2.1 Среда для определения лецитовителлазы (лецитиназа)

Хлористый натрий является селективным фактором, подавляющим 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 которого на поверхности среды образуется радужный венчик вокруг колонии. Добавление в среду молока стимулирует образование стафилококками золотистого или лимонно-желтого пигмента, относящегося к группе каротиноидов [6;25].

Инкубация посева для идентификации лецитиназы, образование радужного венчика, достаточно в течение 18 - 24 часов при 37 °С.

Штаммы *S. aureus*, обладают лецитиназой активностью и пигментом, а культуры двух других видов лишены их. Существуют и исключения: некоторые штаммы *S. aureus* не имеют пигмента или лецитиназы, а ряд штаммов *S. epidermidis* обладает лецитиназной активностью [6; 25].

3.2.2 Биохимическая дифференцировка стафилококков наборами НПО Диагностические системы

В своем исследовании для биохимической дифференцировки стафилококков использовала набор реагентов НПО Диагностические системы «Пластина биохимическая, дифференцирующая стафилококки (ПБДС)».

Состав набора:

ПБДС – пластина с 20 конусообразными лунками, 17 из которых содержит сухие питательные субстраты с индикаторами. ПБДС определяет следующие биохимические свойства культур стафилококков, такие как: утилизацию глюкозы; фруктозы; маннозы; мальтозы; лактозы; трегалозы; маннита; наличие фосфотазы; нитратредуктазы; образование ацетилметилкарбинола; наличие аргининдегидролазы; утилизация ксилозы; сахарозы; арабинозы; галактозы; салицина; наличие уреазы.

Набор рассчитан на дифференциацию до вида 20 культур микроорганизмов рода *Staphylococcus*, выделенных в ходе бактериологических исследований.

Функциональное назначение:

Определение ферментативной активности микроорганизмов рода *Staphylococcus*, выделенных в ходе бактериологического анализа, и дифференциация их до вида.

Состав набора, условия хранения:

- | | |
|---|---------|
| 1. Пластина биохимическая, дифференцирующая стафилококки- 20штук
в запаянном полиэтиленовом пакете | 1 пакет |
| 2. Масло вазелиновое- 8,0 мл | 1 фл. |
| 3. α- нафтол – 0,12 г | 1 фл. |
| 4. Реактив Грисса- 0,2 г | 1 фл. |
| 5. Калия гидроксид – 0,8 г | 1 фл. |
| 6. Натрия гидроксид – 0,4 г | 1 фл. |

7. 1 % пептонная вода, сухая (рН 7,2-7,4) – на 0,1 л раствора (пептон сухой ферментативный для бактериологических целей – 1,0 г, натрия хлорид- 0,85 г).

Срок годности набора -12 месяцев. Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре +2°C- +25°C, в течение всего срока годности. Замораживание не допускается.

Ход определения

1. Оборудование, реактивы и материалы

- Термостат;
- Дозаторы пипеточные переменного объема (одно- и многоканальные) с одноразовыми наконечниками с погрешностью измерения не более 5 %;
- Стерильная 1 % пептонная вода рН 7,2-7,4;
- Пипетка стеклянная вместимостью 1 мл 2 класса точности по ГОСТ 202992-76 Е;
- Отраслевой стандарт образец мутности (ОСО мутности) (ОСО 42-28-85-06П) – 10 МЕ;
- Этиловый спирт;
- Пробирки стеклянные стерильные.

2. Подготовка исследуемых образцов

Для идентификации культуры выращивали на питательном агаре в течение 18-24 часов при 37°C.

Для идентификации готовят микробную суспензию в стерильной 1% пептонной воде рН 7,2-7,4 густотой 10 единиц по отраслевому стандартному образцу для визуального определения мутности бактериальных взвесей. При отсутствии стандартного образца 2-3 петли культуры вносят в пробирки с 4,0 мл 1% пептонной воды.

3. Ход анализа

Извлекают пластину из полиэтиленового пакета;

Регистрируют на крышке пластины номер засеваемого штамма;

Открывают крышку пластины и располагают пластину на столе;

Добавляют пипеткой вместимостью 1,0 мл по 0,15 мл суспензии во все лунки пластины, кроме № 17, 18, 19, которые остаются свободными;

Для создания анаэробных условий наслаивают по 1-2 капле вазелинового масла в лунки для определения аргининдегидролазы и уреазы (№ 11,20);

Закрывают пластину крышкой;

Выдерживают пластину при 37°С 18- 24 часа.

4. Учет результатов

Учет результатов производят визуально, в соответствии с цветовым указателем (таблица 3) по окончании инкубации при 37°С. После окончания инкубации открывают крышку пластины и в лунку для выявления ацетилметилкарбинола (№ 10) добавляют 1 каплю 6% раствора α -нафтола и 1 каплю 40% раствора гидроокиси К; для определения фосфатазы (№ 8) добавляют 1 каплю 20% раствора гидроокиси Na; в лунку для выявления нитратредуктазы (№ 9) добавляют 1-2 капли реактива Грисса. Выявление ацетилметилкарбинола (№ 10) осуществляют через 15-20 минут после закапывания реактивов.

Идентификация культур микроорганизмов проводят с использованием таблицы биохимических свойств стафилококков, кодируемой карточки, каталога кодов – пособия для интерпретации полученных результатов с использованием математического метода классификации.

Таблица 2- Цветовой указатель

№ лунки и теста	Наименование теста	Цвет среды в сухом виде	Цвет среды в растворенном виде	Положительная реакция	Отрицательная реакция
1	2	3	3	4	5
1.	Утилизация глюкозы	красный	красный	желтый	красный
2.	Утилизация фруктозы	красный	красный	желтый	красный
3.	Утилизация маннозы	красный	красный	желтый, оранжевый	красный
4.	Утилизация мальтозы	красный	красный	желтый, оранжевый	красный
5.	Утилизация лактозы	красный	красный	желтый	красный
6.	Утилизация трегалозы	красный	красный	желтый	красный
7.	Утилизация маннита	красный	красный	желтый, оранжевый	красный
8.	Наличие фосфатазы	бесцветный	бесцветный	малиновый	бесцветный, слабо-розовый
9.	Наличие нитратредуктазы	бесцветный	бесцветный	розовый, малиновый	бесцветный
10.	Образование ацетилметилкарбинола	бесцветный	бесцветный	розовый, малиновый	бесцветный
11.	Наличие аргининдегидролазы	желтый, зеленый	желтый, зеленый	голубой, синий	желтый, зеленый
12.	Утилизация ксилозы	красный	красный	желтый	красный, оранжевый
13.	Утилизация сахарозы	красный	красный	желтый	красный
14.	Утилизация арабинозы	красный	красный	желтый, оранжевый	красный
15.	Утилизация галактозы	красный	красный	желтый, оранжевый	красный
16.	Утилизация салицина	красный	красный	желтый, оранжевый	красный
20.	Наличие уреазы	желтый	желтый	красный, малиновый	желтый

Таблица 3- Биохимическая характеристика стафилококков

Тип или субстрат	глюкоза	фруктоза	манноза	мальтоза	лактоза	трегалоза	маннит	фосфатаза	нитратредуктаза	ацетилметилкарбинол	аргинин	ксилоза	сахароза	арабиноза	галактоза	салицин	уреаза	плазмокоагуляция
ВИДЫ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>S.aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>S.epidermidis</i>	+	+	+	+	В	-	-	+	+	+	+	-	+	-	В	-	+	-
<i>S.saprophyticus</i>	+	+	-	+	В	+	В	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>S.saccharolyticus</i>	+	+	+	-	-	-	-	Н	+	Н	+	-	-	-	Н	Н	Н	-
<i>S.carnosus</i>	+	+	+	-	В	В	+	+	+	+	+	-	-	-	В	-	-	-
<i>S.caseolyticus</i>	+	+	-	-	+	В	-	Н	+	-	Н	-	В	Н	+	Н	Н	-

«+» - данный тест положителен у 90-100% штаммов данного вида;

«-» - данный тест отрицателен у 90-100% штаммов данного вида;

«Н»- тест не исследован;

«В»- тест вариабелен.

3.2.3 Дифференцирование *Enterobacteriaceae* специальными диагностическими системами - «Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии».

Функциональное назначение

Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии (ПБДЭ) используется для определения ферментативной активности микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в ходе бактериологического анализа, и дифференциации их до вида по 20 биохимическим признакам в течение суток.

Состав набора:

1. ПБДЭ - представляет собой полимерную пластину с 20 лунками, содержащими высушенные среды с субстратами и индикаторами для 20 тестов: выявление уреазы, β -D-галактозидазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, аргининдигидролазы; образования сероводорода, индола, ацетоина; ферментацию глюкозы, сахарозы, маннита, малоната, цитрата, цитрата натрия с глюкозой, инозитола, сорбитола, арабинозы, мальтозы. Пластина помещена в полимерный пенал. Каждая лунка содержит субстрат для биохимического дифференцирующего теста.
 2. Альфа-нафтол, флакон
 3. Пара-диметиламинобензальдегид, флакон.
 4. Хлорид железа (3+) гексагидрат, флакон.
 5. Калия гидроксид, флакон.
 6. Буферный раствор, сухой порошок для приготовления, флакон
 7. Вазелиновое масло, флакон.
 8. Таблица биохимических свойств энтеробактерий и карта кодов.
- Время анализа: 18-24 часа.

Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки анализа:

1. Термостат;

2. Дозаторы пипеточные переменного объема с одноразовыми наконечниками;
3. Стерильный фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) рН 6,0 - 6,2;
4. Пипетки стеклянные вместимостью 1 мл 2 класса точности по ГОСТ 20292-76 Е;
5. Отраслевой стандартный образец мутности (ОСО мутности) (ОСО 42-28-85-06П) - 10 МЕ;
6. Пробирки стеклянные стерильные.

Ход анализа:

Для идентификации готовят микробную суспензию в фосфатно-солевом буферном растворе (рН от 6,0 до 6,2) густотой 10 единиц по отраслевому стандартному образцу для визуального определения мутности бактериальных взвесей.

1. Извлекают пластину из полиэтиленового пакета;
2. Регистрируют на крышке пластины номер засеваемого штамма;
3. Открывают крышку пластины и располагают ее на столе;
4. Добавляют по 0,15 мл микробной суспензии во все лунки пластины;
5. Для создания анаэробных условий наливают по 1-2 капли стерильного вазелинового масла в лунки для определения лизиндекарбоксилазы (№ 4), аргининдегидролазы (№ 5), орнитин-декарбоксилазы (№ 6), уреазы (№ 10) и образования сероводорода (№ 11);
6. Закрывают пластину крышкой;
7. Выдерживают пластину при температуре 37° С от 18 до 24 ч.

Учет результатов:

Учет результатов производят по окончании инкубации визуально в соответствии с цветовым указателем, представленным в таблице 5. Затем добавляют реактивы в соответствующие лунки и учитывают результаты.

Результаты вносят в кодовую карточку. Идентификацию проводят по каталогу кодов. Биохимические свойства энтеробактерий для тест-системы ПБДЭ представлены в таблице 5.

Таблица 4 - Цветовой указатель

№ Лунки и теста	Наименование теста	Цвет среды в сухом виде	Цвет среды в растворенном виде	Положительная реакция	Отрицательная реакция
1	Утилизация цитрата натрия	Желтый, светло-зеленый	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
2	Утилизация малоната натрия	Желтый	Желтый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
3	Утилизация цитрата натрия с глюкозой	Желтый, коричневый	Желтый, коричневый	Фиолетовый, бурый	Желтый, коричневый
4	Наличие лизиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
5	Наличие аргининдегидрогеназы	Желтый, светло-зеленый	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
6	Утилизация орнитиндекарбоксилазы	Желтый, светло-зеленый	Желтый, светло-зеленый	Темно-зеленый, синий	Желтый, светло-зеленый
7	Наличие фенилаланиндезаминазы	Бесцветный	Бесцветный	Темно-зеленый	Желтый
8	Образование индола	Бесцветный	Бесцветный	Розовый	Бесцветный
9	Образование ацетилметилкарбинола	Бесцветный	Бесцветный	Розовый, малиновый	Бесцветный
10	Наличие уреазы	Желтый	Желтый	Малиновый, красный	Желтый
11	Образование сероводорода	Бесцветный	Бесцветный	Черный, темно-серый, коричневый	Желтый
12	Утилизация глюкозы	Красный	Красный	Желтый	Красный
13	Наличие В-галактозидазы	Бесцветный	Бесцветный	Желтый	Бесцветный
14	Утилизация лактозы	Красный	Красный	Желтый	Красный
15	Утилизация маннита	Красный	Красный	Желтый	Красный
16	Утилизация сахарозы	Красный	Красный	Желтый	Красный
17	Утилизация инозита	Красный	Красный	Желтый	Красный
18	Утилизация сорбита	Красный	Красный	Желтый, желто-оранжевый	Красный
19	Утилизация арабинозы	Красный	Красный	Желтый, желто-оранжевый	Красный
20	Утилизация мальтозы	Красный	Красный	Желтый	Красный

Таблица 5 - Биохимические свойства для энтеробактерий для тест-системы ПБДЭ

№ п/п	Наименование м/о	ЦН	МН	ЦНГ	ЛИЗ	АРГ	ОРН	ФА	ИНД	АМК	МОЧ	H ₂ S
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>Budvicia aquatica</i>	-	-	d	-	-	-	-	-	-	d	[+]
2	<i>Cedecea davisae</i>	+	+	d	-	d	+	-	-	d	-	-
3	<i>Cedecea lapagei</i>	+	+	d	-	[+]	-	-	-	[+]	-	-
5	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	[+]	-	[+]	-	[+]	+	-	+	-	[+]	-
6	<i>Citrobacter diversus</i>	+	+	+	-	d	+	-	+	-	d	-
7	<i>Citrobacter freundii</i>	+	[-]	+	-	d	[-]	-	-	-	d	[+]
22	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	[-]	d	-	+	-	-	-
23	<i>Escherichia coli</i> [неакт]	-	-	d	d	-	[-]	-	[+]	-	-	-
47	<i>Proteus penneri</i>	-	-	d	-	-	-	+	-	-	+	d
48	<i>Proteus vulgaris</i>	[-]	-	[-]	-	-	-	+	+	-	+	+
51	<i>Providencia reetgeri</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
76	<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	[-]	-
77	<i>Serratia odorifera</i>	+	-	+	+	-	d	-	d	[+]	-	-

«-» - 0 — 10 % штаммов положительные;

[-] - 11 — 25 % штаммов положительные;

d — 26 — 75 % штаммов положительные;

[+] - 76 — 89 % штаммов положительные;

«+» - 90 -100 % штаммов положительные.

Продолжение Таблица 5

№ п/п	Наименование м/о	ГЛ	ONPG	ЛАК	МНТ	САХ	ИНО	СОР	АРА	МАЛ	ПОДВ
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	<i>Budvicia aquatica</i>	+	+	[+]	d	-	-	-	[+]	-	d
2	<i>Cedecea davisae</i>	+	+	[-]	+	+	-	-	-	+	+
3	<i>Cedecea lapagei</i>	+	+	d	+	-	-	-	-	+	[+]
5	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	+	+	d	+	[-]	-	+	+	+	+
6	<i>Citrobacter diversus</i>	+	+	d	+	d	-	+	+	+	+
7	<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	d	+	d	-	+	+	+	+
22	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+
23	<i>Escherichia coli [неакт]</i>	+	d	[-]	+	[-]	-	[+]	[+]	[+]	-
47	<i>Proteus penneri</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	[+]
48	<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
51	<i>Providencia reetgeri</i>	+	-	-	+	[-]	+	-	-	-	+
76	<i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	+	+	[+]	+	-	+	+
77	<i>Serratia odorifera</i>	+	+	[+]	+	d	+	+	+	+	+

«-» - 0 — 10 % штаммов положительные;

[-] - 11 — 25 % штаммов положительные;

d — 26 — 75 % штаммов положительные;

[+] - 76 — 89 % штаммов положительные;

«+» - 90 -100 % штаммов положительные.

4 Определение действия дезинфектанта на микробную клетку

В своем учебнике Фармацевтическая микробиология В.А. Галынкин писал [6, с.240], что для определения действия дезинфектанта на микробную клетку готовится раствор из концентрированного дезинфицирующего средства в разведении 1:10 в качестве разбавителя используют фосфатный буферный раствор с NaCl и пептоном с рН 7,0. Далее из разведения готовят последовательные разведения 1:50, 1:100, 1:500 методом титрования, что

соответствует концентрациям дезинфицирующего средства соответственно- 2%; 1%; 0,5%.

Для приготовления инокулята используются 24-ти часовые бульонные культуры (рисунок 3), выращенные на МПБ. Разводят стерильным раствором натрия хлорида 0,9% до концентрации около 10^4 КОЕ/мл [6].

- 1:100000 (бактериальные клетки)

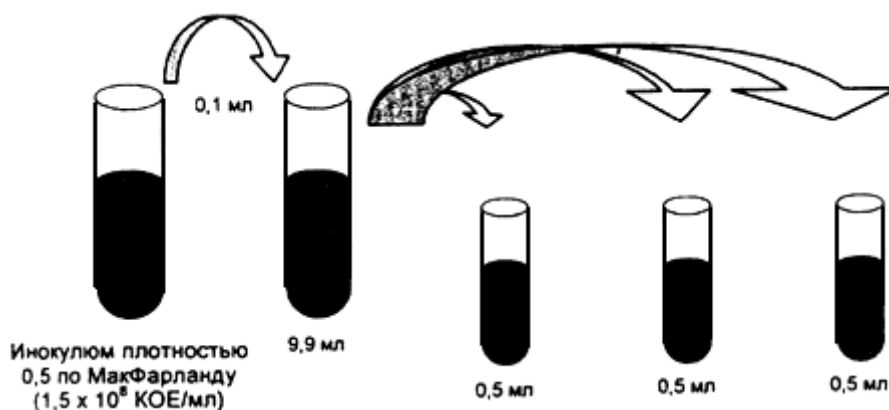


Рисунок 3- Метод разведения инокулята

Концентрацию бактериальной взвеси (инокулята) определяли по «стандартам мутности» по Макфарланду на приборе, измеряющем степень мутности -денситометре, рисунок 4.



Рисунок 4- Денситометр

Далее полученную взвесь в объеме по 0,2 мл вносили в чашки Петри (диаметром 90 мм). Чашки с бактериями заливали расплавленным и охлажденным до 42°C 10,0-15,0 мл МПА и добавляли каждое разведение дезинфектанта в количестве 1,0 мл. В контрольные чашки вместо разведений препарата вносили такое же количество растворителя. Ставили в термостат при

стандартных условиях инкубирования на 48 часов и по истечению срока инкубации подсчитывали ОМЧ.

Таблица 6 - Допустимые уровни бактериальной обсемененности воздушной среды помещений лечебных учреждений в зависимости от их функционального назначения и класса чистоты

Класс чистоты	Название помещения	Санитарно-микробиологические показатели					
		общее количество микроорганизмов в 1 м ³ воздуха (КОЕ/м ³)		количество колоний <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 м ³ воздуха (КОЕ/м ³)		количество плесневых и дрожжевых грибов в 1 дм ³ воздуха	
		до начала работы	во время работы	до начала работы	во время работы	до начала работы	во время работы
Особо чистые (А)	Операционные, родильные залы, асептические боксы для гематологических, ожоговых пациентов, палаты для недоношенных детей, асептический блок аптек, стерилизационная (чистая половина), боксы бактериологических лабораторий	не более 200	не более 500	не должно быть	не должно быть	не должно быть	не должно быть
Чистые (Б)	Процедурные, перевязочные, предоперационные, палаты и залы реанимации, детские палаты, комнаты сбора и пастеризации грудного молока, ассистентские и фасовочные аптек, помещения бактериологических и клинических лабораторий, предназначенные для проведения исследований	не более 500	не более 750	не должно быть	не должно быть	не должно быть	не должно быть
Условно-чистые (В)	Палаты хирургических отделений, коридоры, примыкающие к операционным, родильным залам, смотровые, боксы и палаты инфекционных отделений, ординаторские, материальные, кладовые чистого белья	не более 750	не более 1000	не должно быть	не более 2	не должно быть	не должно быть
Грязные (Г)	Коридоры и помещения административных зданий, лестничные марши лечебно-диагностических корпусов, санитарные комнаты, туалеты, комнаты для грязного белья и временного хранения отходов	Не нормируется		Не нормируется		Не нормируется	

[26].

Исходя из допустимых уровней бактериальной обсемененности воздушной среды помещений лечебных учреждений (Таблица 7) в зависимости

от их функционального назначения и класса чистоты, учебные аудитории можно отнести к «классу Г» (коридоры и помещения административных зданий). Из этих нормативов видно, что санитарно – микробиологические показатели не нормируются для этих видов помещений.

В свою очередь санитарно- показательные микроорганизмы делятся на три группы, представлены в таблице 7: I группа – фекальное загрязнение; II группа – воздушно-капельное загрязнение; III группа – загрязнение разлагающимися органическими субстратами.

Таблица 7- Санитарно-показательные микроорганизмы различных объектов окружающей среды

объект	Группы санитарно-показательных микроорганизмов							
	1			2		3		
	БГКП (ОКБ, ТКБ)	энтерококки	Сульфитредуцирующие клубоидии	стафилококки	стрептококки	Бактерии группы протея	термофилы	нигрификаторы
Вода	+	(+)	+	+		+		+
Почва	+		+			+	+	+
Воздух				+	+			
Пищевые продукты	+		+	+		+		
Предметы обихода	+			+	+	+		

Выбор санитарно -показательного микроорганизма в пределах одной группы зависит от задачи исследования и включает в себе определение того или иного показателя. Например:

- массивность того или иного загрязнения;
- давность загрязнения;
- характер загрязнения, в зависимости от обнаружения санитарно-показательных микроорганизмов.

На предприятиях микробиологической промышленности, где в производстве используются в качестве продуцентов различные микроорганизмы исследуют количественное и качественное содержание в воздухе микробов-продуцентов с целью предупреждения воздействия их на организм работающих людей (возможность заболевания и развитие сенсбилизации) [13]. Нормирование качества воздушной среды определяется в соответствии с нормативным документом ГН 2.1.6. 1041-01 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК), микроорганизмов продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест». Некоторые ПДК микроорганизмов-продуцентов, рабочих зон приведены в таблице 8 ниже [24].

Таблица 8 - ПДК микроорганизмов- продуцентов в воздухе рабочей зоны

Наименование микроорганизма- продуцента	назначение	ПДК кл/м³	Класс опасности
<i>Aspergillus awamori</i> 120/177	Продуцент глюкоамилазы	2000	3
<i>Bacillus subtilis</i> 65	Продуцент нейтральной протеиназы и амилазы	40000	4
<i>Bacillus subtilis</i> 72	Продуцент щелочной протеазы	50000	4
<i>Bacillus subtilis</i> 103	Продуцент нейтральной протеазы	50000	4
<i>Bacillus licheniformis</i> 1001	Продуцент бацитрацина	50000	4
<i>Candida tropicalis</i> Y- 456	Продуцент ксилита	300	3
<i>Penicillium canescens</i> F-832	Продуцент ксиланазы	2000	3

Для закрытых жилых и иных помещений узаконенных нормативов по бактериальной обсемененности воздушной среды не существует. Разработаны нормы для ЛПУ, комбинатов бытовых услуг, но отсутствуют для учебных лабораторий, только документация по микроклимату учебных помещений.

Для оценки чистоты воздуха закрытых помещений рекомендуют ориентироваться на местные «нормативы», полученные в результате многократных исследований после уборки и проветривания- и выведенные, как среднеарифметические «нормы» для данного помещения.

Во всех случаях, когда в воздухе жилых или производственных помещений обнаруживаются патогенные микроорганизмы, воздух считается загрязненным и эпидемически опасным [13].

5 Результаты

Исследовательская работа проводилась в период 2016-2017 учебный год на базе лечебного учреждения. Исследовалась воздушная среда в помещениях разных классов чистоты, в таблице 9 приведены результаты. Для сравнительного анализа, следующим этапом моей работы, являлись микробиологический мониторинг воздушной среды учебных аудиторий СФУ Института фундаментальной биологии и биотехнологии. Посевы воздуха проводились в период летней практики и с октября по декабрь 2017 года, ежемесячно. Экспозиция посевов выставлялась: до учебных занятий в лабораториях.

При проведении микробиологического мониторинга воздушной среды седиментационным методом на базовой кафедре ИФБиБТ был выявлен следующий таксономический состав микроорганизмов воздуха в учебных аудиториях и представлен видами: *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *p. Bacillus*. Таксономический состав микроорганизмов воздуха в ЛПУ представлен видами: *Staphylococcus aureus*.

В дальнейшем мы исследовали устойчивость, выделенных штаммов к дезинфицирующим средствам различной концентрации и химического состава.

Таблица 9 - Анализ проб воздуха кабинетов лечебного учреждения

Место забора	Класс / норма	ОМЧ КОЕ в 1 м ³			<i>S. aureus</i> КОЕ в 1 м ³
		IV кв 2016 г	I кв 2017 г	II кв 2017 г	
стационар					
Род. зал №1	200	230	420	110	0
Род. зал №2	200	80	240	390	0
Род. зал №3	200	180	300	100	0
Род. зал №4	500	270	240	130	0
Род. зал №5	500	510	330	260	0
Род. зал №6	500	140	270	80	0
Операционная №1	200	150	390	30	0
Операционная №2	200	220	330	60	0
ОАР пит № 1	200	30	290	30	0
ОАР пит № 2	500	320	250	100	0
ОАР пит № 3	200	330	220	130	0
ОАР пит № 4	200	330	450	90	0
АОПБ процедур. каб.	500	100	300	80	0
АОПБ смотровая	300	330	390	160	0
АФО процедур. каб.	500	300	300	150	0
АФО смотровая	300	220	300	80	0
АОО смотровая	300	450	70	30	0
ДО пит № 3	200	480	250	130	0
ДО процедур. каб.	500	140	240	90	0
ДО молочная ком.	500	510	360	230	0
ГО операционная №1	200	70	420	570	0
ГО операционная №2	200	200	160	570	0
ЦСО автоклавная	500	270	240	540	0
ЦСО стерильная	500	390	-	450	0
3эт. процедурная	300	330	220	300	0
3эт. смотровая	500	180	190	300	0
4эт. процедурная	300	600	260	540	0
4эт. смотровая	300	480	190	510	0
Смотровая приемный покой	750	2840	660	2760	0
Поликлиническая служба		IV кв 2016 г	I кв 2017 г	II кв 2017 г	
ЖК1 процедурный	300	420	540	660	0
ЖК1 манипуляцион.	750	420	600	1080	0
ЖК1 стоматолог. каб.	750	600	480	570	4
ЖК2 процедурный	300	480	690	660	0
ЖК2 манипуляцион.	750	660	330	180	0
Ж21 стоматолог. каб	750	100	480	420	0
ЖК3 процедурный	300	180	900	250	0
ЖК3 манипуляцион.	750	1980	420	780	0
ЖК3 стоматолог. каб	750	400	780	510	0

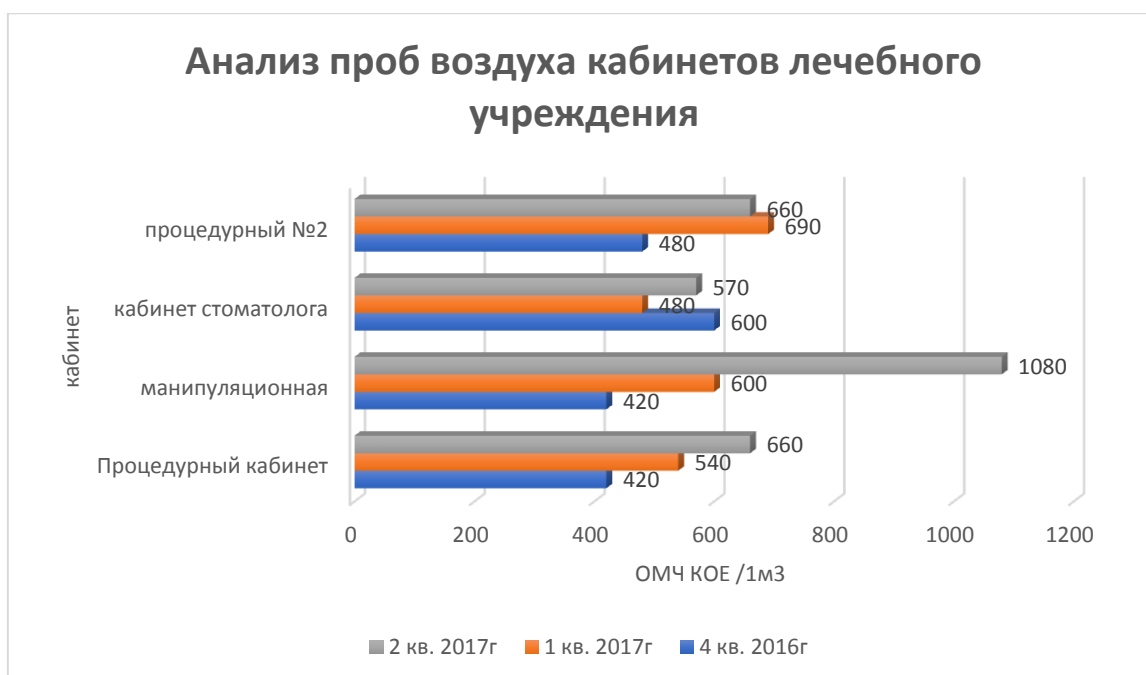


Рисунок 5- Анализ проб воздуха кабинетов лечебного учреждения

В первый год обучения исследовалась воздушная среда ЛПУ, было исследовано 113 точек из них получены 33 положительных результата превышения нормы по ОМЧ, что составляет 29% от общего числа посевов воздуха, данные результатов предоставлены в таблице 9, рисунок 5. При идентификации выделенных микроорганизмов, из санитарно – показательных микроорганизмов был выявлен *S. aureus* (0,79 % от общего числа посевов), в одной из точек забора воздуха- это отмечено на рисунке 6. Что говорит о хороших санитарно-эпидемиологических мероприятиях, проводимых в учреждении.

Таблица 10 - Результаты анализа проб воздуха закрытых помещений

Место забора	Кол-во точек забора	Количество точек превышающих норму	% превышения ОМЧ КОЕ в 1 м ³	<i>S. aureus</i>
Стационар	86	23	26,7	0
Поликлиническая служба	27	10	37,0	1

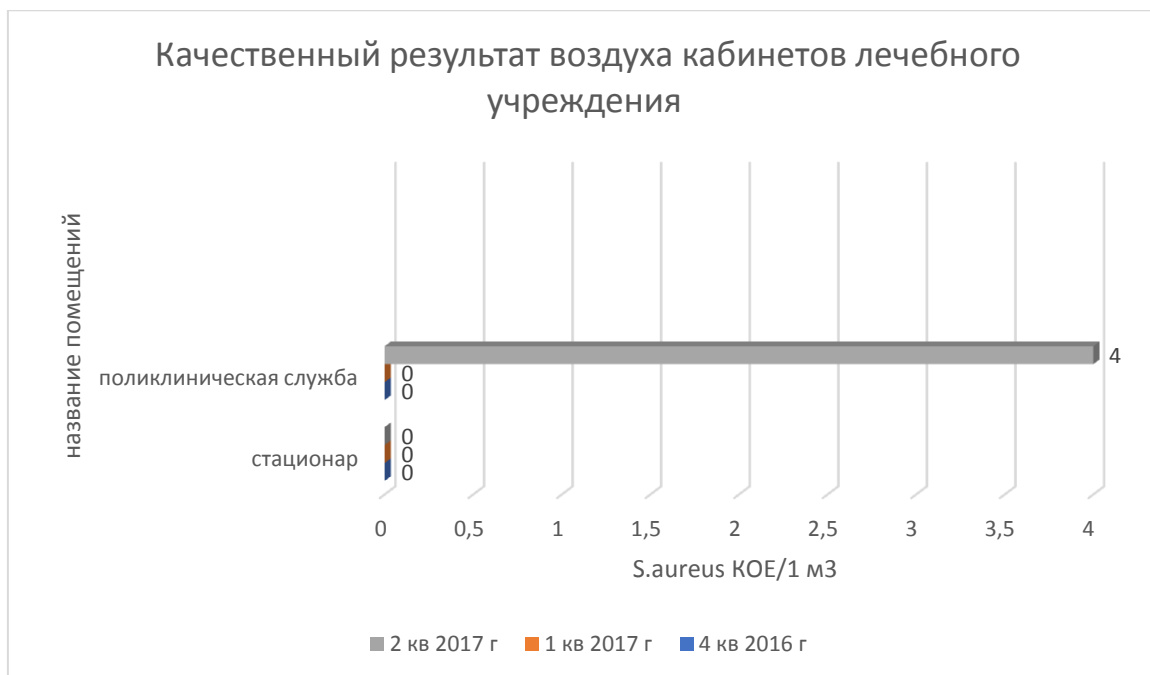


Рисунок 6- Качественный результат воздуха кабинетов лечебного учреждения

Микробиологический мониторинг проводили 1 раз в месяц с октября по декабрь в учебных помещениях базовой кафедры биотехнологии. Кабинеты

- 43-06 преподавательская ИФБ и БТ;
- 43-09^а лаборатория геносистематики микроорганизмов;
- 43-09 лаборатория микробиологического практикума;
- 43-10 лаборатория общей микробиологии;
- 43-11 автоклавная.

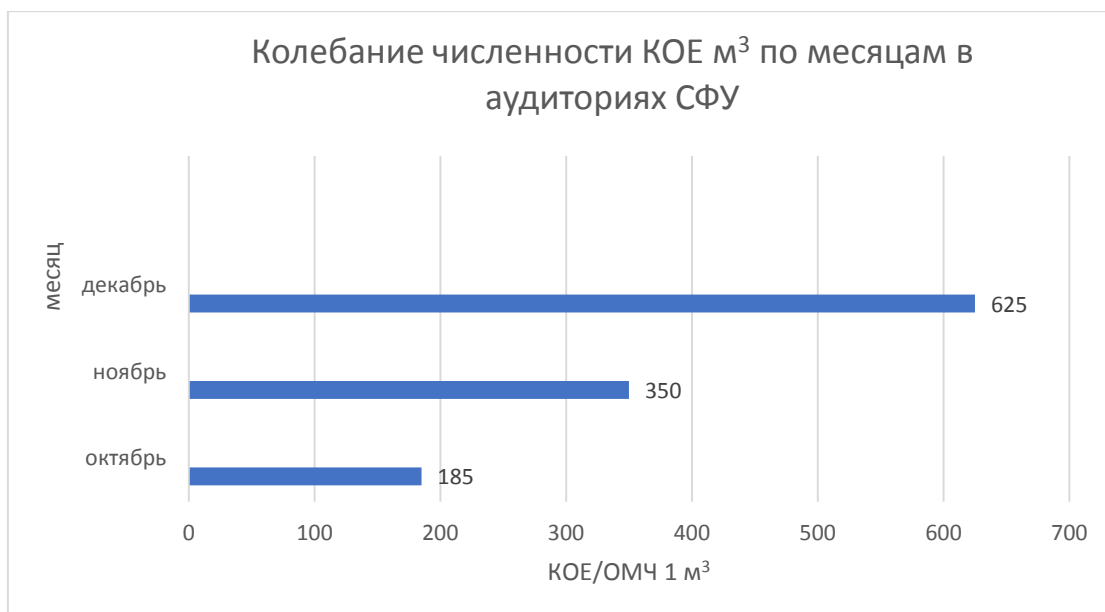


Рисунок 7- количество микроорганизмов КОЕ/1м³

В результате проведения исследований воздушной среды установили колебание численности микроорганизмов от 185 КОЕ в 1 м³ в октябре до 625 КОЕ в 1 м³ в декабре. Было исследовано 250 точек, по идентификации микроорганизмов по системе Берджи и проведение дифференцировки биохимических свойств, выделенных микроорганизмов были получены следующие результаты, представленные в таблице 11, рисунок 7.

Таблица 11 - Количественный состав микроорганизмов, микробиологических лабораторий СФУ

микрофлора	месяц		
	Октябрь	Ноябрь	Декабрь
<i>Micrococcaceae</i>	80	82	85
<i>S.epidermidis</i>	3	2	5
<i>p. Bacillus</i>	16	14	17
<i>Serratia marcescens</i>	1	2	3

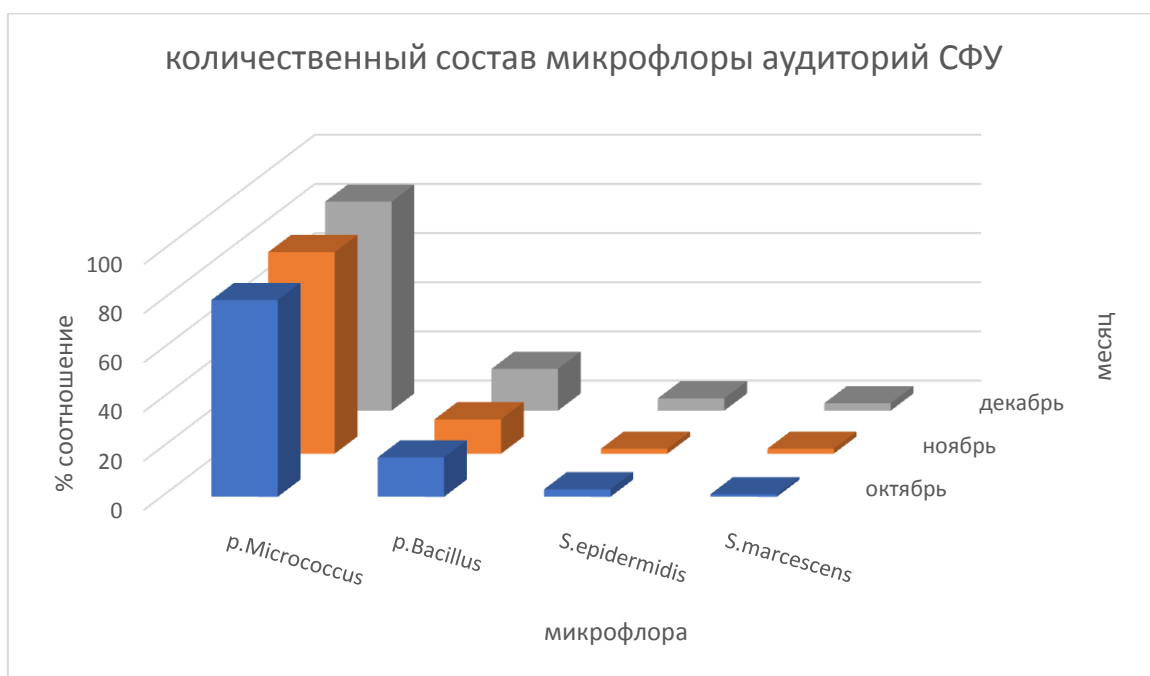


Рисунок 8 - Количественный состав микрофлоры аудиторий СФУ

Независимо от времени взятия образцов доминировали грам (+) кокки. По совокупности идентификационных тестов отнесены к семейству

Micrococcaceae, роду *Micrococcus* по классификации Берджи. А также грам (+) спорообразующие палочки- представители р. *Bacillus*. При дифференцировании грам (-) палочек специальными диагностическими системами Российского производства- «Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии» в единичных количествах выделялись грам (-) палочки вида- *Serratia marcescens*. А также был дифференцированы тест системами для биохимической дифференцировки стафилококков, наборами НПО Диагностические системы. В результате проведенных тестов дифференцировала *S. epidermidis*. Эти результаты исследований отмечены в таблице 11.

Таблица 12 - Результаты посева воздуха

кабинет	бактерии						Мицелиальные грибы	
	октябрь		ноябрь		декабрь		КОЕ/ 1м ³	ОМЧ
	КОЕ/ 1м ³	ОМЧ	КОЕ/ 1м ³	ОМЧ	КОЕ/ 1м ³	ОМЧ		
43-06	18	2 647	40	5 882	100	14 705	2	32
43-09 ^a	22	3 235	48	7 058	150	22 058	3	48
43-09	68	10 000	122	17 941	165	24 264	3	48
43-10	64	9 411	114	16 764	185	27 205	0	0
43-11	13	1 911	28	4 117	35	5 147	4	64

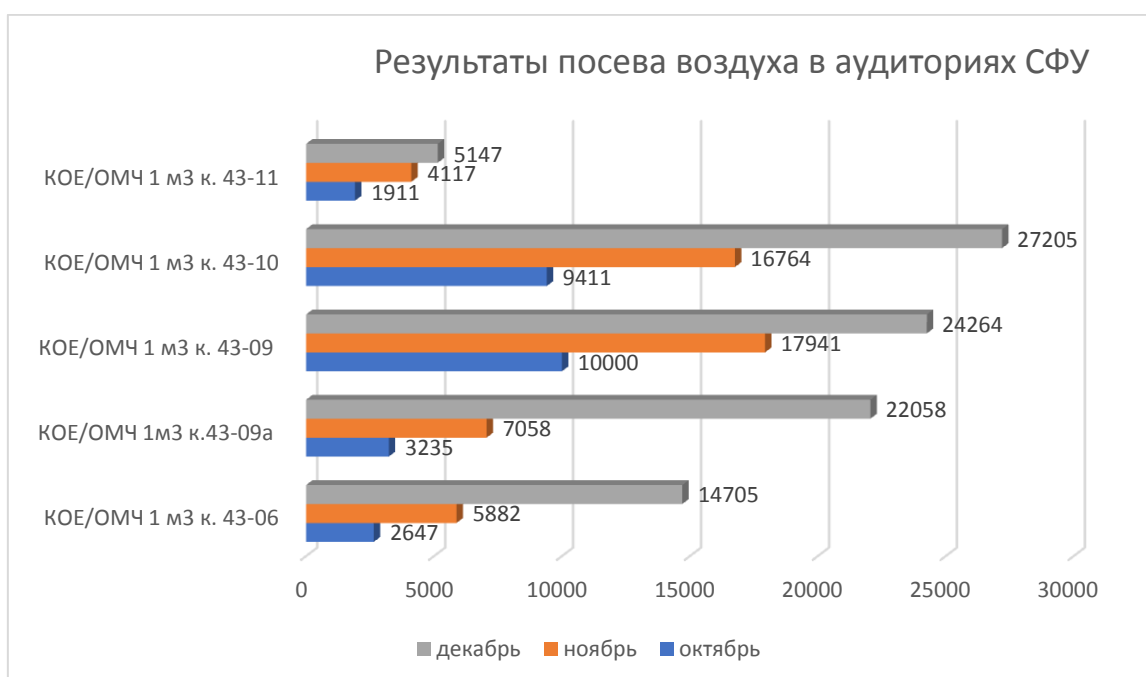


Рисунок 9 – Результаты посева воздуха в аудиториях СФУ

Небольшое количество колоний было выделено в объекте 43-06 – комната преподавателей кафедры (Рисунок 9, таблица 12) и в объекте 43-11 – автоклавной (Рисунок 9, таблица 12) - это обусловлено тем, что данные аудитории наименее проходимы для студентов в отличие от учебных микробиологических лабораторий.

Наибольшее количество микроорганизмов отмечается в кабинетах 43-09 (Рисунок 9, таблица 12) и 43-10 (Рисунок 9, таблица 12), так как в них проводятся научно- исследовательские работы и в период учебного процесса количество студентов максимально.

Из результатов исследования отмечается колебание количества КОЕ-это связано с тем, что режим проветривания в осенних месяцах соблюдался чаще, чем в зимний период времени и в первых учебных месяцах количество практических занятий меньше. В дальнейшем их количество увеличивается и в декабре, как видно из моего исследования, что количество КОЕ максимально.

Одним из выявленных микроорганизмов являются спорообразующие палочки р. *Bacillus*, что говорит о запыленности и загрязнении микроорганизмами из почвы, а так как в учебных лабораториях ведутся экспериментальные работы с почвой, то обнаружение этих микроорганизмов говорит о недостаточности санитарно-эпидемиологических мероприятий- влажной уборке.

Количество КОЕ мицелиальных грибов по нормативной документации не учитывается, но все же в моем исследовании были получены положительные результаты. Наибольшее количество колоний было высеяно в автоклаве, кабинет 43-11.

В автоклавной проводят не только стерилизацию чистой посуды и питательных сред, но и утилизация отработанных посевов. При открытии автоклавов в воздух поступают водяные пары. Недостаточное проветривание помещения может сказаться на присутствии мицелиальных грибов. Но по

результатам исследования бактериальной обсемененности воздуха результаты КОЕ ниже, чем в других объектах исследования из-за меньшей проходимости. Чтобы снизить количество колоний грибов необходимо увеличить время проветривания помещения.

Выросшие на питательных средах колонии бактерий описывали согласно методическим рекомендациям. И отсеивали на скошенный агар для выделения чистой культуры и проведения идентификации по биохимическим признакам диагностическими тест-системами.

Таблица 13- Биохимическая характеристика стафилококков

Тип или субстрат	глюкоза	фруктоза	манноза	мальтоза	лактоза	трегалоза	маннит	фосфагаза	нитратредуктаза	ацетилметилкарбинол	аргинин	ксиллоза	сахароза	арабиноза	галактоза	салицин	уреаза	плазмокоагуляция
ВИДЫ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>S.aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>S.epidermidis</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-

Были определены виды, относящиеся к роду *Staphylococcus*, тест системами для биохимической дифференцировки стафилококков, наборами НПО Диагностические системы, результаты приведены в таблице 13. А также дифференцированы грамотрицательные палочки- пластиной биохимической, дифференцирующей энтеробактери- *Serratia marcescens*, результаты приведены в таблице 14.

Таблица 14- Биохимические свойства для энтеробактерий для тест-системы ПБДЭ

№ п/п	Наименование м/о	ЦН	МН	ЦНГ	ЛИЗ	АРГ	ОРН	ФА	ИНД	АМК	МОЧ	Н ₂ S
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
76	<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	[-]	-

Продолжение таблицы 14

№ п/п	Наименование м/о	ГЛ	ONPG	ЛЯК	МНТ	САХ	ИНО	СОР	АРА	МАЛ	ПОДВ
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
76	<i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	+	+	[+]	+	-	+	+

После определения видовой принадлежности микроорганизмов, определяли их устойчивость к дезинфицирующим средствам. Из полученных результатов видно, что выбранные концентрации дезинфицирующих средств: от максимальной концентрации в разведении 1:50 до минимальной исследуемой концентрации в разведении 1:500; подавили рост исследуемых микроорганизмов. Проверяли чувствительность микроорганизмов к трем дезифектантам: Бионса (таблица 15, рисунок 10), Ника Пероксам (таблица 16, таблица 11), Монитор-Окси результаты приведены в таблице 17, Рисунок 12.

Результаты проверки чувствительности, выделенных микроорганизмов к дезинфицирующему средству Бионса в различных разведениях.

Таблица 15 - Определение устойчивости к дезинфицирующему средству Бионса

Дезинфектант Бионса микроорганизмы	1:50	1:100	1:500
<i>Micrococcus</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
p. <i>Bacillus</i> Гр (+)	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>Serratia marcescens</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>S. aureus</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>S.epidermidis</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста

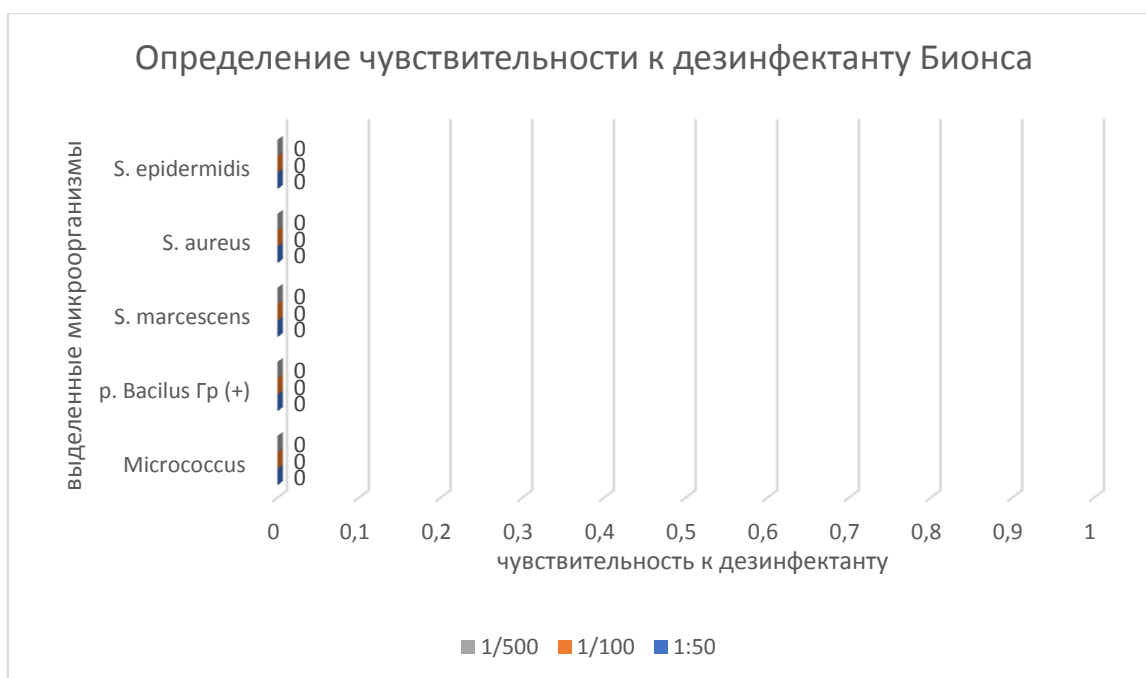


Рисунок 10- Определение чувствительности к дезинфектанту Бионса

Результаты проверки чувствительности, выделенных микроорганизмов к дезинфицирующему средству Ника Пероксам в различных разведениях.

Таблица 16- Определение устойчивости к дезинфицирующему средству Ника Пероксам

Дезинфектант Пероксам микроорганизмы	1:50	1:100	1:500
<i>Micrococcus</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
p. Bacillus Гр (+)	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>Serratia marcescens</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>S. aureus</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>S.epidermidis</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста

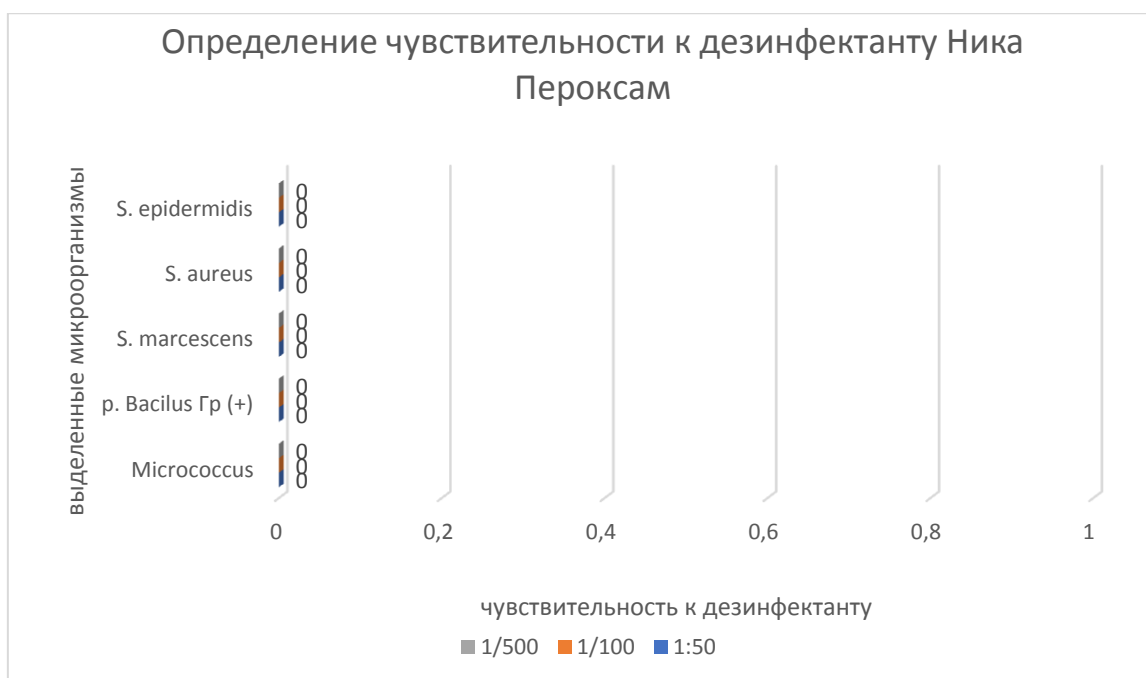


Рисунок 11 - Определение чувствительности к дезинфектанту Ника Пероксам

Результаты проверки чувствительности, выделенных микроорганизмов к дезинфицирующему средству Монитор Оксид в различных разведениях.

Таблица 17- Определение устойчивости к дезинфицирующему средству Монитор-Оксид

Дезинфектант / микроорганизмы	1:50	1:100	1:500
<i>Micrococcus</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>p. Bacillus Гр (+)</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>Serratia marcescens</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>S. aureus</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста
<i>S. epidermidis</i>	Нет роста	Нет роста	Нет роста

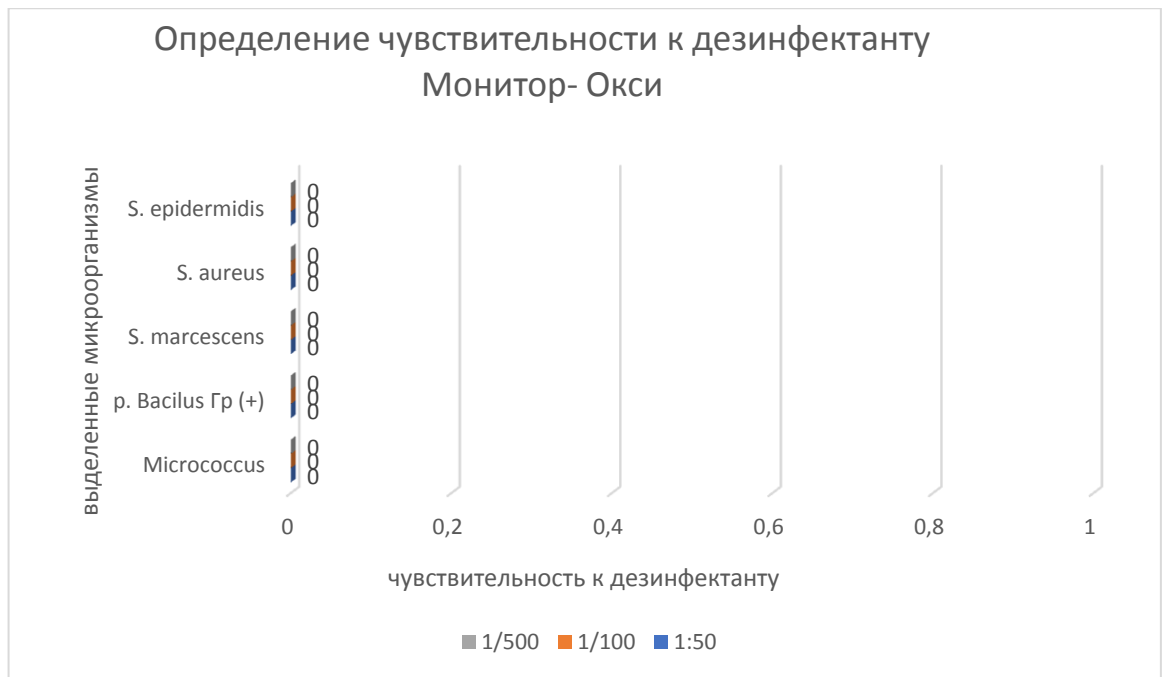


Рисунок 12 - Определение чувствительности к Монитор -Окси

Таблица 18- посев воздуха - среда Сабуро

№ кабинета	Месяц исследования	Мицелиальные грибы	КОЕ в 1м³
43 - 06	июнь	1	2
	октябрь	0	
	ноябрь	0	
	декабрь	1	
43 - 09	июнь	1	3
	октябрь	0	
	ноябрь	0	
	декабрь	2	
43 – 09 ^a	июнь	0	3
	октябрь	1	
	ноябрь	0	
	декабрь	2	
43 - 10	июнь	0	0
	октябрь	0	
	ноябрь	0	
	декабрь	0	
43 - 11	июнь	1	4
	октябрь		
	ноябрь	1	
	декабрь	2	

Таблица 19- Посев воздуха на среду МПА

№ кабинета	Месяц исследования	Колонии белые с ровными краями	Колонии белые с волнистыми краями	Колонии желтые с ровными краями	Колонии оранжевые с ровными краями	Всего на чашках	Количество КОЕ
43 - 06	июнь	3	5	9	23	40	198
	октябрь		3	3	12	18	
	ноябрь		11	15	14	40	
	декабрь		26	37	47	100	
43 - 09	июнь		3	3	12	18	373
	октябрь		19	27	22	68	
	ноябрь		12	58	52	122	
	декабрь		29	73	63	165	
43 - 09 ^a	июнь		2	10	10	22	242
	октябрь		3	7	12	22	
	ноябрь		6	22	20	48	
	декабрь		12	74	64	150	
43 - 10	июнь		3	5	5	13	376
	октябрь		3	39	22	64	
	ноябрь		14	64	46	114	
	декабрь		26	87	72	185	
43 - 11	июнь		6	10	12	28	104
	октябрь		2	4	7	13	
	ноябрь		6	7	15	28	
	декабрь		8	13	14	35	

ВЫВОДЫ

Проведен микробиологический мониторинг воздушной среды в лечебно-профилактическом учреждении, микробиологических лабораториях СФУ, что позволило оценить качественный и количественный состав микроорганизмов, а также проверили их чувствительность к дезинфицирующим средствам.

В результате проведения микробиологического мониторинга воздушной среды лабораторий СФУ, установили колебание численности микроорганизмов от 1911 КОЕ/ОМЧ в 1 м³ в октябре до 27 205 КОЕ/ОМЧ в 1 м³ в декабре. В помещениях ЛПУ ОМЧ составляло от 660 ОМЧ/КОЕ в 1 м³ до 2760 ОМЧ/КОЕ в 1 м³;

Таксономический состав микроорганизмов воздуха в учебных аудиториях представлен видами: *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *p. Bacillus*, *p. Micrococcus*.

Таксономический состав микроорганизмов воздуха в ЛПУ представлен видами: *Staphylococcus aureus*;

Проведя сравнительный анализ полученных результатов, пришла к следующему заключению. ОМЧ лечебного учреждения ниже, чем ОМЧ учебных микробиологических лабораторий, но тем не менее в ЛПУ были обнаружены санитарно-показательные микроорганизмы, что говорит о возможном бактериальном загрязнении. ОМЧ учебных лабораторий высокое, но здесь не обнаружены санитарно-показательные микроорганизмы, чем среда пребывания более благоприятна.

Исследования проведенные на выявление чувствительности, выделенных микроорганизмов к дезинфицирующим средствам, таким как: Бионса, Ника Пероксам, Монитор-Окси дали 100% результат по стабильности дезинфектантов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1. БГКП — бактерии группы кишечной палочки
2. СПМ — санитарно-показательные микроорганизмы
3. ОМЧ — общее микробное число
4. МУК — методические указания
5. КОЕ — колонии образующая единица
6. РКП — реакция коагуляции плазмы
7. ЛПУ — лечебно-профилактические учреждения
8. ПАВ – поверхностно-активные вещества
9. МПА – мясопептонный агар
10. МПБ- мясопептонный бульон

БЛАГОДАРНОСТИ

Я выражаю глубокую признательность за помощь в процессе подготовки магистерской диссертации моему научному руководителю –доценту, кандидату биологических наук Сарматовой Наталье Ивановне, за советы и ценные замечания в работе над диссертацией, за педагогический и научный подход, отличное знание предмета, что вдохновляло меня на выполнение данной работы.

Выражаю глубокую благодарность заведующей базовой кафедрой биотехнологии, доктору биологических наук, профессору Воловой Татьяне Григорьевне, доктору биологических наук, профессору Прудниковой Светлане Владиславне за объективные и ценные замечания в ходе выполнения работы, а также по представленным на предзащите материалам магистерской диссертации.

Хотелось бы выразить благодарность рецензенту работы –доктору биологических наук, доценту Коленчуковой Оксане Александровне за ее внимательный анализ проделанной работы, объективную рецензию, которая позволила улучшить работу.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Акимкин, В. Г. Внутрибольничные инфекции: значение, определение, причины возникновения, структура, основные противоэпидемические мероприятия / В.Г. Акимкин, В. М. Ключев // Эпидемиолог.ру.
2. Бадмашина, Г.Г. Проблемы организации микробиологического мониторинга воздушной среды в медицинских организациях. / Г. Г. Бадмашина // Пермский медицинский журнал. 2016.- Т.33, №6,- С.72-77.
3. Верещагин, А.И. МУК 4.2.2942-11/ А.И. Верещагин // Государственное санитарно -эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. 2011. - С.12.
4. Возрастающая угроза развития антимикробной резистентности. Возможные меры: Всемирная организация здравоохранения, 2013. – 130 с.
5. Волков, А. Г. Микробный пейзаж абдоминальных хирургических инфекций у больных многопрофильного стационара / А.Г. Волков // Пермский медицинский журнал. 2014. -Т. 31, № 1. - С. 53–57.
6. Галынкин, В. А. Фармацевтическая микробиология/ В.А. Галынкин, В.И. Кочеровец, А.Э. Габидова// М.: Арнебия. 2 издание, дополненное и переработанное. 2015. — 240 с.
7. Доршакова, Е. В. Микромицеты в естественной среде обитания и в помещениях их потенциальная опасность для здоровья людей / Е.В. Доршакова // Проблемы медицинской микологии. 2012.- Т. 14, № 3. - С. 53–58.
8. Еремин, Д. И. Формирование почвенной микрофлоры в антропогенно - преобразованных почвах / Д.И. Еремин // Вестник Государственного аграрного университета Северного Зауралья. 2015.-Т. 4, № 31. -С.7-12.

9. Зиатдинов, В. Б. Характеристика микологической обсемененности воздуха в медицинских организациях / В.Б. Зиатдинов // Пермский медицинский журнал. 2016-Т. 3, № 4. - С. 107–112.
10. Зайцева, Т. А., Оценка влияния выбросов автотранспорта на микрофлору экосистемы почвы/ Т.А. Зайцева, Л.В. Рудакова // Фундаментальные исследования. 2014. - Т. 5, №1. -С. 23–28.
11. Кобзев, Е. Н. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы/ Е.Н. Кобзев, В.А. Чугунов, В.Б. Родин, Е.В. Детушева, П. В. Слукин, Л.С. Фёдорова, В.Г. Акимкин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. - Т. 19, № 6.
12. Козлов, Л. Б. Роль микробных ассоциаций в инфекционной патологии человека. / Л. Б. Крамарь, С. П. Сахаров, Е. В. Диц // Фундаментальные исследования. 2013. – Т.9, №3. - С. 366-370.
13. Кондакова, Г. В. Санитарная микробиология: текст лекций / Г. В. Кондакова// Ярославский Государственный Университет – Ярославль: ЯрГУ, 2005. - 84 с.
14. Крамарь, Л. В. Фенотипические характеристики популяций *S. aureus*, выделенных от различных категорий носителей/ Л. В. Крамарь, Ю. В. Жадченко, Ю. О. Хлынина // Фундаментальные исследования. 2012. – Т.4, №2. - С.295-298.
15. Кузнецова, М. В. Характеристика биологических свойств нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* / М.В. Кузнецова // Пермский Медицинский Журнал. 2014. -Т. 8, № 342. - С. 59–64.
16. Максимова, Е. Н. Оценка экологического состояния почв по качественному составу автотрофной микрофлоры / Е. Н. Максимова // Иркутский вестник. 2015. Т. 68. - С. 56– 63.
17. Методические рекомендации по ускоренному определению устойчивости бактерий к дезинфекционным средствам. (Утверждены руководителем департамента госсанэпиднадзора Минздрава России А.А. Монисовым 10.01.2000 г. за №1100-26-0-117).

18. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности, Р 4.2.2643-10. -Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Г.Г. Онищенко – 1 июня 2010 г.

19. Мониторинг устойчивости бактерий к Дезинфицирующим средствам в медицинских организациях. - Федеральные клинические рекомендации- Сентябрь 2013 г.

20. Николенко, В. В. Клинические особенности течения генерализованной бактериемии, вызванной *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* / В. В. Николенко // Пермский медицинский журнал. 2014.- Т. 31, № 2. - С. 19.

21. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология: учебное пособие / под ред. В.И. Покровского, — 4-е изд. испр. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 768 с.

22. Пономаренко, С. В., Антушева Т. И., Калиниченко С. В. Изучение чувствительности госпитальных штаммов *S. aureus* к действию дезинфектантов/ С. В. Пономаренко, Т.И. Антушева, С.В. Калиниченко, Т.А. Рыжкова, А.А. Ковалева// «Живые и биокосные системы». – 2015. – № 13.

23. Попова, А.Ю., Надзор за соблюдением санитарно – эпидемиологического законодательства при оказании медицинской помощи в целях обеспечения ее качества и безопасности. /А. Ю. Попова, Е. Б. Ежлова, Е. П. Игонина // Вестник росздравнадзора. 2016.- №1. С.74-79.

24. "Предельно допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест. Дополнение N 2 к ГН 2.1.6.711-98. Гигиенические нормативы. ГН 2.1.6.1041-01" (утв. Минздравом РФ 28.04.2001).

25. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 N 535 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-

профилактических учреждений" (вместе с "Методическими указаниями по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях".

26. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.1.3.1375—03.

27. Сиволодский, Е.П. Систематика и идентификация энтеробактерий (Издание третье, переработанное и дополненное) /Е.П. Сиволодский // ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, отдел новых технологий. С-Петербург. 2011.- С.17-19.

28. Фельдблюм, И. В. Микромицеты в естественной среде обитания и в помещениях, их потенциальная опасность для здоровья людей/ И. В. Фельдблюм // Проблемы медицинской микологии. 2012.- Т. 14, № 3. - С. 64-66.

29. Хараева, З. Ф. Особенности внутрибольничных штаммов *Staphylococcus aureus* / З. Ф. Хараева // Фундаментальные исследования. 2014. - Т.11, № 6-С.1316–1318.

30. Чарушина, И. П. Сравнительная оценка интенсивности контаминации объектов внешней среды инфекционного стационара различными микромицетами / И. П. Чарушина, И. В. Фельдблюм, Г. А. Александрова // Успехи медицинской микологии.2014. -Т.12. - С.31–34.

31. Шкарин, В. В., Благонравова А. С., Ковалишена О.В. Способ определения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам/ В. В. Шкарин, А.С. Благонравова, О.В. Ковалишена, Т.А. Рыжкова, А. А. Ковалева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. -№ 6.

32. Babeluk, R. Hand hygiene - Evaluation of three disinfectant hand sanitizers in a community setting/ R. Babeluk // PLoS One. 2014.- Vol. 9, № 11. – P. 1–7.

33. Boonsarngsuk, V. Airway obstruction caused by penicilliosis: a case report and review of the literature. / V. Boonsarngsuk // Arch. Bronconeumol. 2015.- Vol. 51, № 5. - P. 25-28.

34. Guilherme Campos, B Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil /B. Campos Guilherme, G. Simone, M. Marques Lucas // *New microbiologica*. - 2012.- Vol. 35, P.183-190.

35. Furuhashi, K. Bacterial contamination in cold water samples obtained from water dispensers/ K. Furuhashi, N. Ishizaki, M. Fukuyama// *Biocontrol Sci*. 2015.- Vol. 20, № 2, - P. 51-147.

36. He, Q. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community/Q. He // *Trends Microbiol*. 2015.- Vol. 33, № 4. -P. 395–401.

37. Hinenoya, A. Chlorine Dioxide is a Better Disinfectant than Sodium Hypochlorite against Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*/ A. Hinenoya, S.P. Awasthi, N. Yasuda, A. Shima, H. Morino, T. Koizumi, T. Fukuda, T. Miura, Shibata T., Yamasaki S.Jpn // *J Infect Dis*.- 2015. - Vol. 68, № 4, P. 9-276.

38. Campos Guilherme, B. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil/ Campos Guilherme B., G. Simone, Lucas M. Marques // *New microbiologica*. - 2012.- Vol. 35, P.183-190.

39. Knox, J. Environmental contamination as a risk factor for intrahousehold *Staphylococcus aureus* transmission. /J. Knox, Anne-Catrin Uhlemann, M. Miller, C. Hafer, G. Vasquez, P. Vavagiaki, Q. Shi, F. D. Lowy// *PLOS ONE*. 2012. - Vol. 7, Issue11, P.49900.

40. Kwong, S.M. Replication of Staphylococcal Resistance Plasmids/ S.M. Kwong, J.P. Ramsay, S.O. Jensen, N. Firth// *Frontiers in Microbiology*. -2017.- Vol. 8, P. 2279.

41. Kwong, Stephen M. Replication of Staphylococcal Resistance Plasmids/ Stephen M. Kwong, Joshua P. Ramsay, Slade O. Jensen, Neville Firth// *Front Microbiol*. – 2017.- Vol. 8, P. 2279.

42. Naidoo, R. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Bacteraemia at a Tertiary Children's Hospital in Cape Town, South Africa / R. Naidoo // *PLoS One*. 2013. -Vol. 8, № 10. - P. 1–9.
43. Pasquale, T.R. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of late-onset nosocomial pneumonia in intensive care patients in the USA/ T.R. Pasquale // *Int. J. Infect. Dis. Elsevier*, 2013.- Vol.17, №6. - P.398–403.
44. Pollet, R.M. Processing of nonconjugative resistance plasmids by conjugation nicking enzyme of staphylococci/ R.M. Pollet, J.D. Ingle, J.P. Hymes, T.C. Eakes, K.Y. Eto, S.M. Kwong, J.P. Ramsay, N. Firth, M.R. Redinbo // *Journal of Bacteriology*. 2016.- Vol. 198, P. 888–897.
45. Rhouati, A. Aptamers: A promising tool for ochratoxin a detection in food analysis/ A. Rhouati // *Toxins (Basel)*, 2013. - Vol. 5, № 11. - P. 1988–2008.
46. Rogawansamy, S. An Evaluation of Antifungal Agents for the Treatment of Fungal Contamination in Indoor Air Environments / S. Rogawansamy // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2015. -Vol. 12, № 6. -P. 6319–6332.
47. Schlett, C.D. Prevalence of chlorhexidine-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following prolonged exposure / C.D. Schlett // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2014. -Vol. 58, № 8. - P. 4404–4410.
48. Senok A. Diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC22-MRSA-IV from Saudi Arabia and the Gulf region / A. Senok, A. Somily, A. Raji // *International Journal of infectious Diseases*. 2016. - Vol.51 - P. 31-35.
49. Smith, K. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multidrug resistant clinical isolates/ Karen Smith, Iain S. Hunter// *Journal of Medical Microbiology*. 2008.- Vol.57- P. 966-973.
50. Tavares, A High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community–hospital boundaries / A. Tavares, M. Miragaia, J. Rolo, C. Coelho, H. de Lencastre // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013- Vol. 32, № 10, P. 1269-1283.

51. Taylor, M. Airborne fungal profiles in office buildings in metropolitan Adelaide, South Australia: Background levels, diversity and seasonal variation. / M. Taylor, S. Gaskin, R. Bentham, D. Pisaniello// Indoor Built Environ. 2013.- Vol. 23, P.1002–1011.

52. Wang, Q, Inhibition of various gram-positive and gram-negative bacteria growth on selenium nanoparticle coated paper towels/ Q. Wang, P. Larese-Casanova, TJ Webster// Int J Nanomedicine. – 2015.- Vol. 13, № 10, P. 94.

53. Wassenaar Trudy, M. The qacC Gene Has Recently Spread between Rolling Circle Plasmids of Staphylococcus, Indicative of a Novel Gene Transfer Mechanism/ Trudy M. Wassenaar, David W. Ussery, Hanne Ingmer// Front. Microbiol. - 2016. - Vol.7, P.1528.

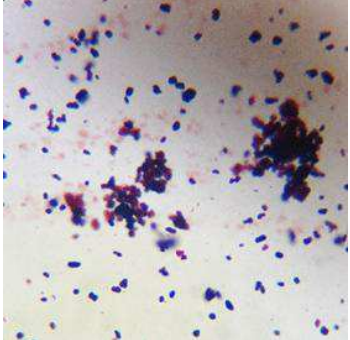
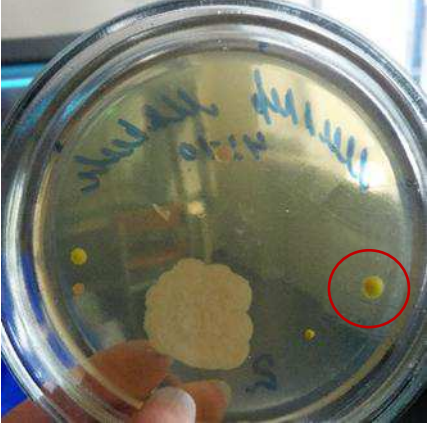
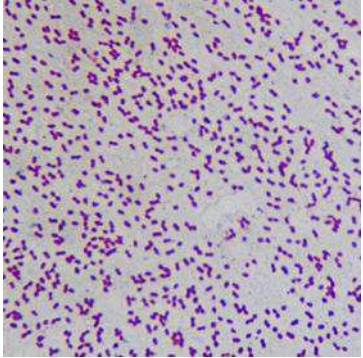
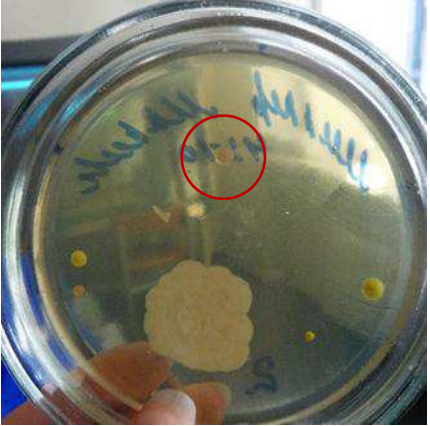
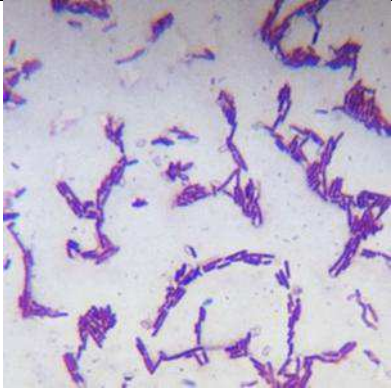

54. Yuen, J.W.M. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) contamination in bedside surfaces of a hospital ward and the potential effectiveness of enhanced disinfection with an antimicrobial polymer surfactant/ J.W.M. Yuen, T.W.K. Chung, A.Y. Loke // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2015. -Vol. 12, № 3.- P. 3026–3041.

55. Zhang, M. Prevalence of antisepticresistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonizing nurses and the general population in Hong Kong. / M. Zhang, M. M. O'Donoghue, T. Ito, K. Hiramatsu, M. V. Boost // Hospital infection. 2011. – Vol. 78, P.113–117.

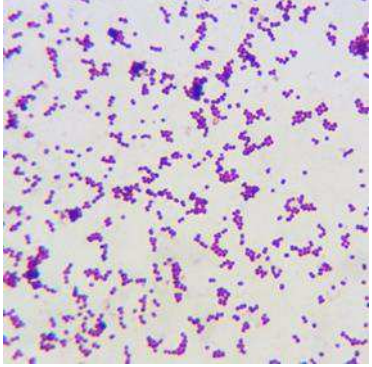

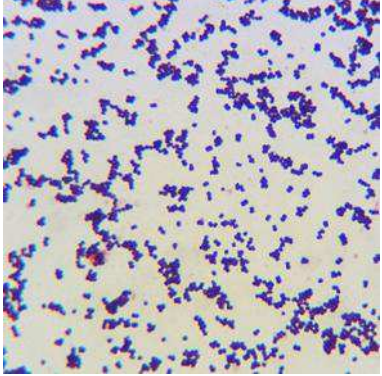
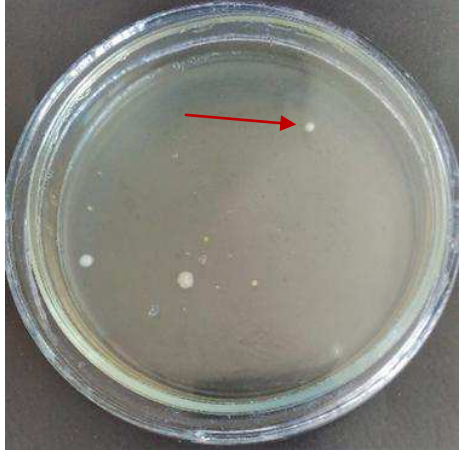
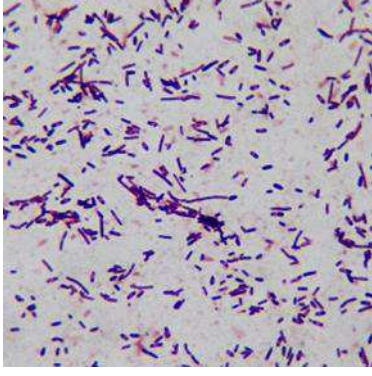
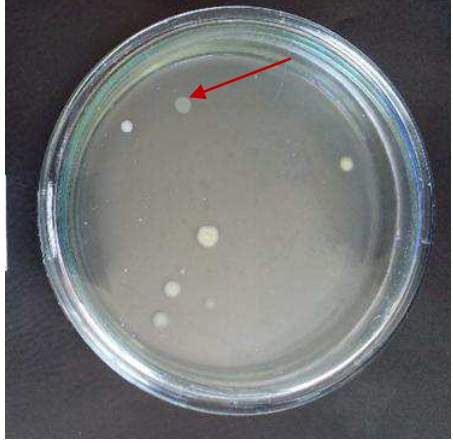
ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЯ А

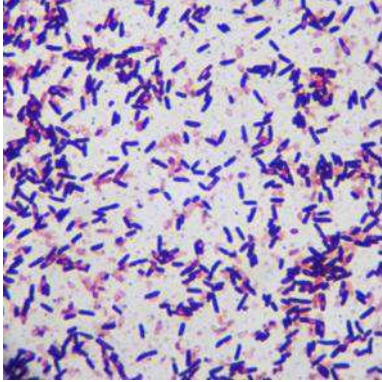

Морфо-тинкториальные признаки выделенных микроорганизмов

№ мазка	Микроскопия	Питательная среда
1	 <p>кокки Гр (+)</p>	 <p>МПА колония желтого цвета</p>
2	 <p>кокки Гр (+)</p>	 <p>МПА колония розового цвета</p>
3	 <p>спорообразующие палочки Гр (+)</p>	 <p>МПА колония белого цвета с волнистыми краями</p>

Продолжение ПРИЛОЖЕНИЯ А




№ мазка	Микроскопия	Питательная среда
4	 <p>кокки Гр (+)</p>	 <p>МПА, колония оранжевого цвета</p>
5	 <p>кокки Гр (+)</p>	 <p>МПА, колония белого цвета выпуклая с ровными краями</p>
6	 <p>Спорообразующие палочки Гр (+), (-)</p>	 <p>МПА, колония белого цвета, мутная</p>

Конец ПРИЛОЖЕНИЯ А

№ мазка	микроскопия	Питательная среда
7	 <p data-bbox="411 779 683 824">палочки Гр (+), (-)</p>	 <p data-bbox="983 860 1517 949">МПА, колония белого цвета с неровными краями</p>

ПРИЛОЖЕНИЯ Б

Мицелиальные грибы

Номер чашки	Питательная среда
1.	 <p data-bbox="976 770 1085 806">Сабуро</p>
2.	 <p data-bbox="976 1258 1085 1294">Сабуро</p>
3.	 <p data-bbox="976 1751 1085 1787">Сабуро</p>

ПРИЛОЖЕНИЯ В

Схема бактериологического исследования на стафилококк

Первый день

Для определения присутствия *S. aureus*, на объектах окружающей среды забор проб проводят на желточно-солевые среды на основе сред: элективно-солевой агар. Чашки с посевами инкубируют в термостате при 37°C (48±2) ч. При необходимости первые 24 часа инкубируются в термостате, оставшиеся 24 часа на свету при комнатной температуре. [3,26].

Второй день- третий день

Производят просмотр выросших колоний на чашках, с обязательной регистрацией в журнале характера и массивности роста. Если колонии вырастают на ЖСА в виде круглых, блестящих маслянистых, выпуклых, пигментированных колоний, то их можно идентифицировать как стафилококк. В 60-70% случаев положительная лецитовителлазная активность, в виде радужного венчика, от выделенных стафилококков от человека. Не менее 2-х колоний, подозрительных на стафилококк, для дальнейшего исследования отвиваются на скошенный агар. В первую очередь при исследовании отсеиваются колонии с лецитовителлазную реакцию. Если на чашках отсутствуют такие колонии, то дальнейшему исследованию подвергаются пигментированные колонии, схожие по морфологии со стафилококком. Если на чашках присутствуют одновременно колонии стафилококка, отличающихся по пигменту, то следует отвивать не менее двух колоний различного вида. Пробирки с посевом инкубируют в термостате при 37°C на (24±2) ч. [3,26].

Четвертый день

По истечению 20 часов у выделенных штаммов проверяют тинкториальные свойства, проводят тест плазмокоагулирующей активности, изучают морфологию. Как правило *S. aureus* дает обильный, равномерный рост, *S. epidermidis* скудный неравномерный рост по ходу посева. Проводят окраску мазков, выделенных культур по Граму. Стафилококки, окрашенные по Граму, при микроскопии имеют вид фиолетово-синих кокков, располагающихся гроздьями или небольшими кучками («кружево»).

Учитывая плазмокоагулирующую и лицевителлазной активность 70% - 75% случаев позволяют определить принадлежность штамма к виду *S. aureus*. Если недостаточно тестов для дифференцировки, необходимо провести ферментацию маннита, провести тест на гемолитическую активность.

После выделения и подтверждения чистой культуры можно провести определение чувствительности или устойчивости к антибиотикам, дезинфицирующим средствам, бактериофагам после выделения чистой культуры, проводят при необходимости [3,26].

Пятый день

Проведение и учет результатов дополнительных тестов. Окончательная выдача ответа [3,26].

Контроль стерильности питательных сред

Для контроля стерильности питательные среды после изготовления и стерилизации помещают в термостат при стандартных условиях: температуре 37°C на 48 ч.

Бульон Сабуро контролируют полностью (всю приготовленную серию пробирок или колб).

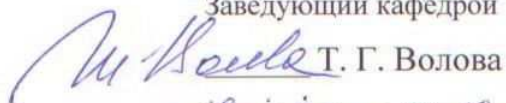
Для санитарно-микробиологического исследования объектов окружающей среды, воздуха в учебных лабораториях и аудиториях могут быть

использованы питательные среды лабораторного и промышленного приготовления [3, 25].

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

«18» июня 2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 Биология

06.04.01.01. Микробиология и биотехнология

Микробиологический мониторинг воздушной среды учебных аудиторий
СФУ для проведения практических занятий по микробиологии

Научный руководитель  к.б.н., доцент Н.И. Сарматова

Выпускник  О.А. Хрущева

Рецензент  д.б.н., доцент О.А. Коленчукова

Красноярск 2018