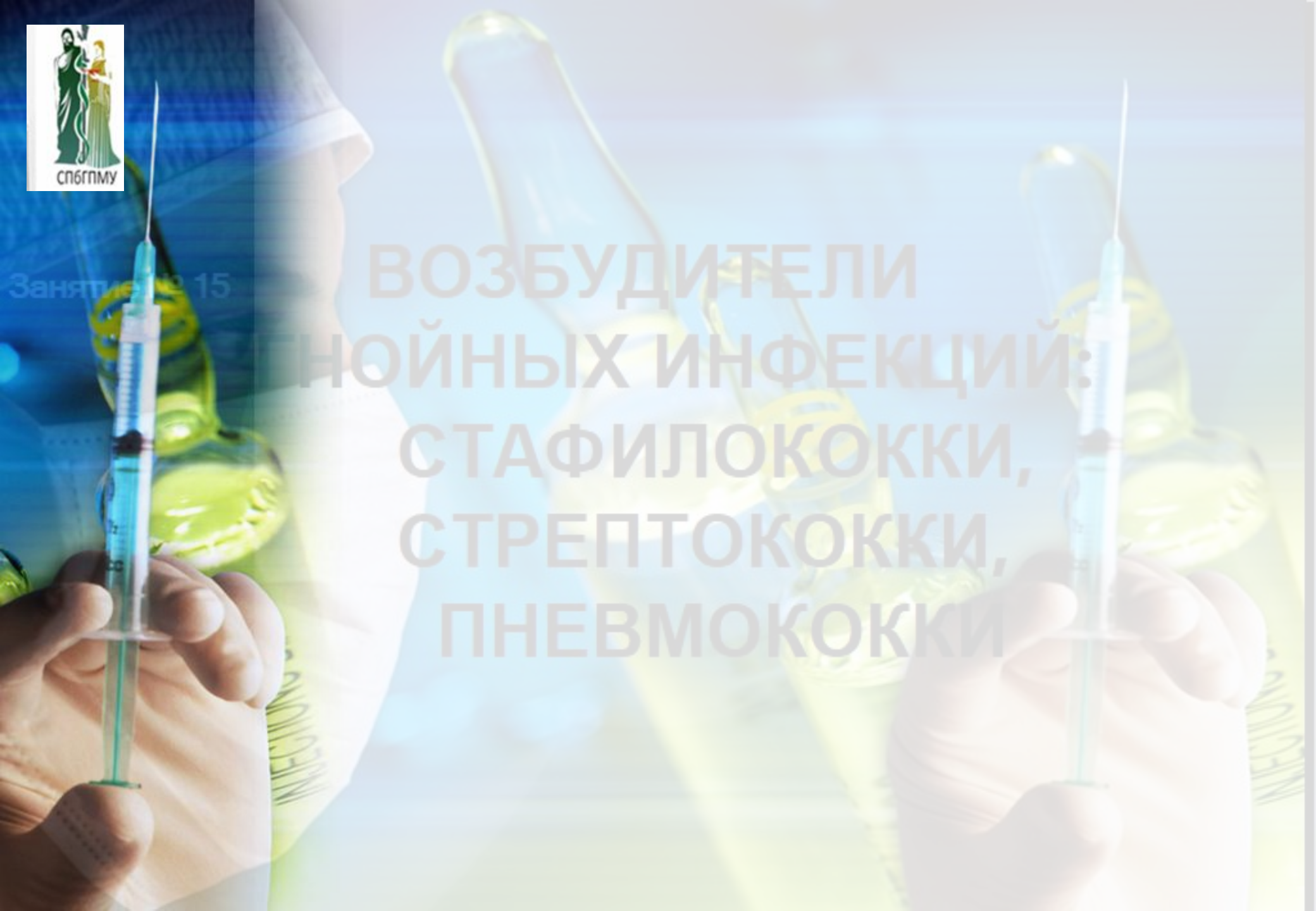




Занятие 15

ВОЗБУДИТЕЛИ НОЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ: СТАФИЛОКОККИ, СТРЕПТОКОККИ, ПНЕВМОКОККИ



ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ:

1. Понятие о биологических свойствах микроорганизмов.
2. Стафилококки и их биологические свойства, значение стафилококковых инфекций в детской патологии.
Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций.
3. Стрептококки и их биологические свойства, значение стрептококковых инфекций в патологии: клиническая картина скарлатины, лечение и профилактика.
4. Методы микробиологической диагностики стрептококковых инфекций.
5. Пневмококки и их биологические свойства.
Микробиологическая диагностика пневмококковых инфекций.



Стафилококки

Таксономическое положение

- род *Staphylococcus*
>35 видов

- Коагулазопозитивные стафилококки

S.aureus, S. intermedius, S.hyicus

Коагулазонегативные стафилококки:

*S.epidermidis, S.saprophyticus, S. hominis,
S.capitis*



Историческая справка

Стафилококки впервые были обнаружены Р. Кохом в 1878 году. В 1880 году выделены Луи Пастером из гнойной фурункула. Родовое название *Staphylococcus* дал Александр Огстон в 1881 году (*staphyl*-гроздь, *coccus*-ягодина, ягода). В 1884 году подробно изучил свойства стафилококков Розенбах.



Стафилококки

Таксономия

Род *Staphylococcus* (31 вид)

Основные виды: 1. **S.aureus** – золотистый стафилококк (основной патогенный вид);

2. *S.epidermidis* – эпидермальный стафилококк;

Морфология

имеют шаровидную форму, диаметром 0,5-1,5 мкм. Грам+ кокки, неподвижные, спор и капсул не образуют. Клеточная стенка содержит пептидогликан и тейхоевые кислоты, белок А (*S.aureus*).



Стафилококки в мазках могут располагаться поодиночке, парами, короткими цепочками и в виде гроздевидных скоплений



Стафилококки. Окраска по



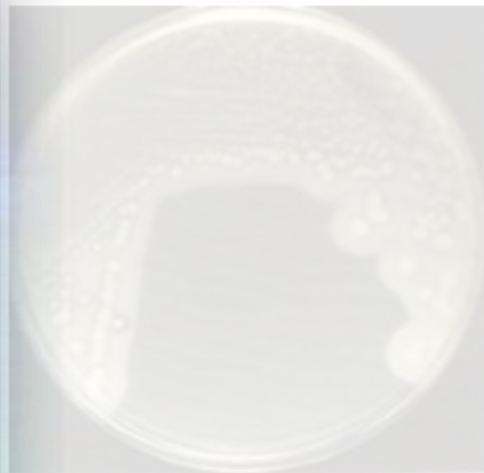
Рис. 1.2. Стафилококки в гное.

- Растут на МПБ и МПА, средах с NaCl.
- Колонии - выпуклые с ровными краями пигментированы, размером 1- 4 мм (белые, золотистые, жёлтые).
- На кровяном агаре – гемолиз
- Элективная среда- ЖСА (до 15% NaCl + желток)
- На бульоне - диффузное помутнение.



Рис. 1.4. Колонии *S. aureus* на маннитол-солевом агаре (ферментация маннита, образование пигмента). HiMedia, Mannitol Salt Agar (M118).





а



б

Характер роста стафилококков на желточно-солевом агаре (а) и зоны опалесценции вокруг колоний (б).



а



б

Характер роста на кровяном агаре золотистого стафилококка (а) и эпидермального стафилококка (б).



Серологические признаки

видоспецифические антигены:

- белок А,
- теиховые кислоты (рибит- и глицеринтеиховые),

у *S. aureus* имеются **перекрестно реагирующие антигены** с эритроцитами, клетками кожи и почек.

Стафилококковые инфекции: эпидемиология

● Источник инфекции

1. Животные
2. Человек:
 - больные,
 - носители (временные и постоянные)

● Механизмы передачи (путь):

- аэрогенный,
- контактный,
- фекально-оральный (алиментарный)



Факторы патогенности

• Факторы адгезии: белки-адгезины, капсула, тейхоевые и липотейхоевые кислоты, нейраминидаза;

• Факторы инвазии: гиалуронидаза, протеазы, липазы (лецитиназа), ДНКаза, фибринолизин;

• Антифагоцитарные факторы: полисахаридная капсула; белок А, связывающий Fc-фрагменты иммуноглобулинов; пептидогликан активирует комплемент по классическому и альтернативному пути; плазмокоагулаза (нити фибрина образуют псевдокапсулу вокруг стафилококка);

Токсины:

- ❖ Гемолизины альфа (повышение проницаемости мембран), бета, гамма, дельта (разрушение мембран)
- ❖ Лейкоцидин (избирательное действие на мембраны нейтрофилов)
- ❖ Эксфолиативные токсины А и В (разрушение эпидермиса)
- ❖ Токсин синдрома токсического шока (СТШ) – суперантиген (вызывает неспецифическую активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов и





- *В патогенезе стафилококковых инфекций* выделяют синдромы: токсический, инфекционно-септический, аллергический
- *Клинические проявления* - более 100 нозологических форм:
 - ✓ фолликулит, фурункулы, карбункулы, пузырчатка новорожденных;
 - ✓ тонзиллит, назофарингит;
 - ✓ трахеит, бронхит, пневмония, абсцесс легкого;
 - ✓ энтерит, колит, холецистит;
 - ✓ менингит, абсцесс мозга;
 - ✓ остеомиелит, артрит;
 - ✓ мастит;
 - ✓ пиелонефрит, цистит, уретрит, эндометрит;
 - ✓ эндокардит, флебит, сепсис

Фолликулит
Экسفоллиативный дерматит



Гидраденит



Пузырчатка

Импетиго



Стафилококковая пиодермия

«Ошпаренных младенцев» (болезнь Риттера)

Микробиологическая диагностика

1. **Бактериологический (культуральный) метод - основной;**
2. **Серологические методы (диагностика при хронических или латентных формах инфекции):**
 - реакция латекс-агглютинации (латекс нагружен белком А или другими аг),
 - ИФА, РНГА (обнаружение антител к тейхоевым кислотам),
 - реакции нейтрализации токсина



Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций

Гной, кровь, слизь из зева, носа, отделяемое ран, мокрота

мазок
грам +
кокки

ЖСА - «радужный венчик»

чистая культура: плазмокоагулаза +
глюкоза под маслом +
маннит под маслом +

Антибиотикограмма

фаготипирование

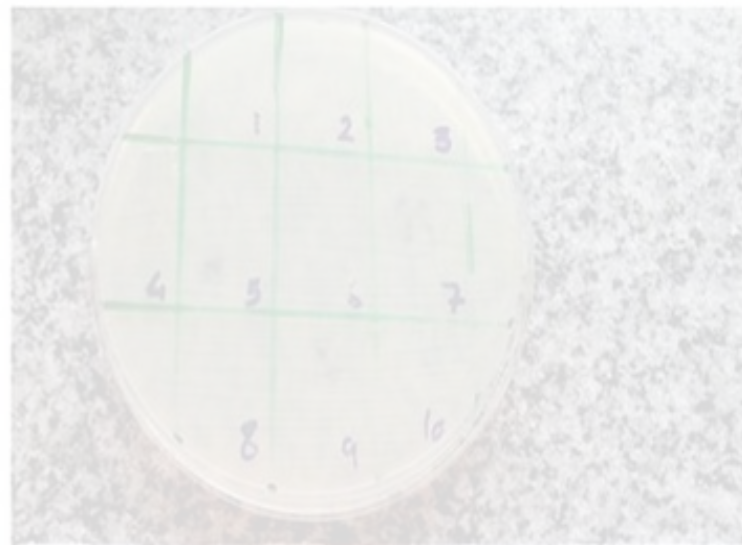


Определение каталазы



При добавлении перекиси водорода видно образование пузырьков
Тест позволяет дифференцировать стафилококки (каталазопозитивные) и стрептококки (каталазонегативные)

В. Фаготипирование стафилококков



Phage typing plaque formation (e.g for staphylococcus aureus)

- Видны зоны лизиса культуры стафилококков диагностическими типовыми бактериофагами.

Б. Определение плазмокоагулазы



Определение плазмокоагулазы.

При выделении плазмокоагулазы стафилококками в пробирке образуется сгусток кроличьей плазмы.

Ферментативные свойства

- биохимически активны: ферментируют с выделением кислоты глицерин, мальтозу, сахарозу, маннит, восстанавливают нитраты в нитриты, продуцируют уреазу, фосфатазу, аргиназу.
- Глюкозу ферментируют как в аэробных и анаэробных условиях.
- Выделяют сероводород и аммиак.
- Оксидазоотрицательны.
- Стафилококки делятся на каталазоположительные (*S. aureus*) и каталазоотрицательные (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*).
- *S. epidermidis* не сбраживает маннита.
- *S. saprophyticus* не сбраживает маннозу, не продуцирует фосфатазу.

Глюкоза	Лактоза	Маннит	Сахароза	H ₂ S	Индол
К	К	К	К	+	—

Глюкоза Сахароза Лактоза Маннит Мальтоза



Ферментация углеводов золотистым стафилококком



а



б

Тест на оксидазу с использованием индикаторных полосок (а) и слайдов (б). Синее окрашивание указывает на положительный результат.



Рост коагулазоотрицательных (слева) и коагулазоположительных (справа) стафилококков на солевом агаре с маннитом



Тест-система для определения биохимических свойств стафилококков

Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA)

- Главная проблема лечения стафилококковых инфекций – высокая лекарственная устойчивость.
- Один из механизмов лекарственной устойчивости – продукция β -лактамазы
- Известны пенициллиназа-резистентные антибиотики, такие как оксациллин, метициллин и др.
- Устойчивость к метициллину (оксациллину) является маркером на множественную лекарственную устойчивость.
- MRSA составляют основную проблему внутрибольничных инфекций
- В отношении MRSA эффективны:
 - Гликопептидный антибиотик – ванкомицин
 - Оксазолидоновый антибиотик - линезолид



Метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA)

- Главная проблема лечения стафилококковых инфекций – высокая лекарственная устойчивость.
- Один из механизмов лекарственной устойчивости – продукция β -лактамазы

Устойчивость к бета-лактамам

- 50-е - продукция плазмидных бета-лактамаз класса A
- 60-е – MRSA (ORSA – oxacillin resistant *S. aureus*)
модифицированный пенициллинсвязывающий белок ПСБ2а
– Устойчивость ко всем бета-лактамам

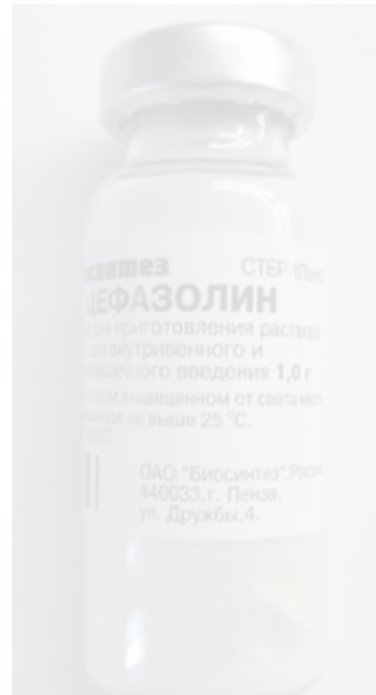
Устойчивость к гликопептидам

- 1996 – промежуточный уровень устойчивости к ванкомицину
– Избыточное образования пептидогликана
- 2002 – высокий уровень устойчивости к ванкомицину
– VanA

Принципы лечения стафилококковых инфекций

1. Антибиотики;
2. Стафилококковый бактериофаг (при локализованных формах), пиобактериофаг;
3. Стафилококковый анатоксин (при лечении хронических форм инфекции);
4. Гипериммунная стафилококковая плазма, сыворотка (лечение токсинемии);
5. Аутовакцина





Таксономия рода
Streptococcus

Отдел *Firmicutes*

Семейство *Streptococcaceae*

Род *Streptococcus*

- Род включает в себя около 29 видов





Таксономия и систематика рода *Streptococcus*

- *S. pyogenes*
- *S. agalactiae*
- *S. pneumoniae*
- *S. faecalis* (*Enterococcus faecalis*)
- *S. lactis* (*Lactococcus lactis*)

История открытия

- В тканях человека стрептококки впервые были обнаружены известным хирургом Теодором Бильротом при роже и раневых инфекциях в 1874 г. Именно Бильрот впервые назвал их стрептококками (от греч. «streptos» - цепочка и «coccus» - ягода).
- В 1878 г. эти бактерии заметил Луи Пастер, изучая явление послеродового сепсиса.
- Выделить чистую культуру стрептококков впервые удалось только Ф. Фелейзену в 1883 г.
- На сегодняшний день известно, что стрептококки могут поражать практически любую часть тела.
- Выделяют стрептококки патогенные для человека.
- Некоторые из них являются сапрофитами молока и других продуктов.
- Род *Streptococcus* включает и непатогенные виды.





Типы классификации стрептококков:

- - по типу гемолиза (классификация Брауна)
- - по серологическим свойствам (классификация Лансфилд)
- - общепринятыми названиями наряду с латинскими родовыми и видовыми



Совмещенная классификация стрептококков способность к гемолизу + группу по Лансфилд

- Бета-гемолитические Streptococcus (группа по Лансфилд)
 - Группа A Streptococcus (*S. pyogenes*)
 - Группа B Streptococcus (*S. agalactiae*)
 - Группа C Streptococcus
 - Группа G Streptococcus
- Альфа-гемолитические Streptococcus
 - *S. pneumoniae* (Pneumococcus)
 - *S. viridans* (бактериальный эндокардит)
- Негемолитические Streptococcus
 - *S. faecalis* (Группа D)
 - Отдельные варианты групп B, C, D, H, and O

Streptococcus pyogenes

- Грам+ кокки,
- располагаются цепочкой,
- в организме хозяина и на средах с кровью образуют гиалуроновую капсулу

Растут только на обогащенных средах - кровяной агар (бета-гемолиз)

- неподвижные,
- не образуют спор
- некоторые виды стрептококков формируют капсулу
- имеют пили (фимбрии)



Окраска по Граму чистая культура



Стрептококк в гное, окраска по Граму



Культуральные свойства

- Стрептококки – факультативные анаэробы, растут на средах, обогащенных углеводами, кровью, сывороткой, асцитической жидкостью;
- на плотных питательных средах образуют колонии трех типов:
 - мукоидные – крупные блестящие вязкой консистенции, напоминающие каплю воды (капсульные штаммы),
 - R – штаммы, имеющие M АГ,
 - S – невирулентные штаммы;
- на жидких средах – придонно-пристеночный рост в виде крошковатого осадка.

Культивирование на жидких ПС

1. На жидких питательных средах *S. pyogenes* дает придонно-пристеночный рост с образованием мелкозернистого осадка и сохранением полной прозрачности среды.
2. *S. bovis* и некоторые штаммы *S. pyogenes* и *S. agalactiae* вызывают интенсивное помутнение бульона с образованием небольшого гомогенного осадка.



- На твердых средах колонии мелкие $d=0.5-1$ мм полупрозрачные беловато-серые росинки



Ферментативные свойства

- *S. pyogenes* ферментирует глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, маннит с образованием кислоты без газа.
- Расщепляет салицин, трегалозу.
- Протеолитической активностью не обладает.

Кровяной агар для определения гемолитической активности стрептококков



α – гемолиз



γ – гемолиз,
без гемолиза



β -гемолиз

PPt4\

Антигенные свойства

- Полисахаридный АГ – «субстанция С» (по Ленсфилд) *S. pyogenes* – серогруппа А.
- Белковый АГ М – типовой (свыше 100 серотипов серогруппы А).
- Перекрестные АГ: АТ к ним реагируют с мышечными волокнами миокарда, тканью почки и др. → иммунопатологические состояния.
- Капсула состоит из гиалуроновой кислоты идентичной обнаруживаемой в соединительной ткани человека (стрептококки не распознаются как «чужие»).



Факторы патогенности стрептококков

группы А

Streptococcus *pyogenes*

Белок М - основной фактор вирулентности и типоспецифический Аг

- выделяют более 80 сероваров белка М, (значительно снижает эффективность гуморальных защитных реакций)
- ингибирует фагоцитарные реакции
- проявляет свойства суперантигена, вызывая поликлональную активацию лимфоцитов и образование АТ



Факторы патогенности *Streptococcus pyogenes*

- Факторы адгезии и колонизации: гиалуроновая капсула (защитная функция, антигенная мимикрия), поверхностные белки М, F (М белок играет основную роль в фиксации), липотейхоевые и тейхоевые кислоты, нейраминидаза;
- Факторы инвазии : стрептокиназа (фибринолизин), стрептодорназа (ДНКаза), гиалуронидаза, фактор помутнения (вызывает гидролиз липопротеидов, в том числе сыворотки крови)
- Антифагоцитарные факторы: капсула, поверхностные белки, пептидогликан, С-полисахарид, Fc-реактивный белок, С5а пептидаза, фактор, угнетающий хемотаксис;
- Токсины:
 - Стрептолизин О (цитотоксин, действует в анаэробных условиях, обладает антигенными свойствами);
 - Стрептолизин S (цитотоксин, устойчив к кислороду, неиммуногенен);
 - Кардиотоксин;
 - Эритрогенный токсин (скарлатинозный), серотипы А, В, С



Патогенез

- **Источник инфекции** – больной, реконвалесцент, носитель.
- **Механизмы передачи** – аспирационный, контактный, реже алиментарный.
- **Пути передачи** – воздушно-капельный, прямой и непрямой контакт, пищевой.
- **Входные ворота** – миндалины, слизистые оболочки верхних дыхательных путей, поврежденная кожа, у новорожденных – пупочная ранка.
 - ↑ резистентность – **локальная инфекция**, ↓ резистентность – **генерализация** (лимфо- и гематогенно).
- **Наиболее поражаемый орган** – небные миндалины (тонзиллит), сердечная мышца, кожа, подкожная клетчатка (рожа, скарлатина); почка (острый гломерулонефрит).



Стрептококки серогруппы А

- *S. pyogenes*
- гноеродно-гемолитические, этиологическая причина возникновения ангины, эндокардита, ревматизма, гломерулонефрита, рожистого воспаления, родового сепсиса, фарингита и скарлатины.

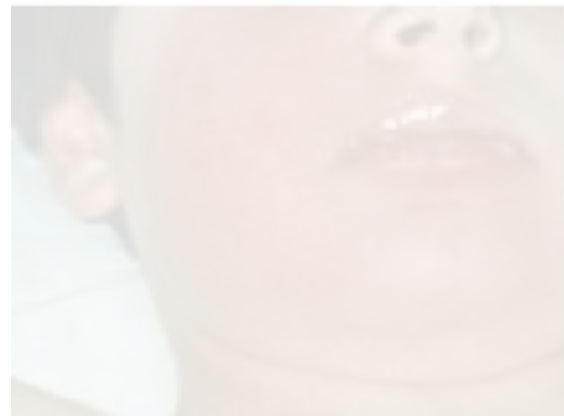
Скарлатина

- От итал. *skarlato* – красный, багровый
- Инфекционное токсико-септическое заболевание, сопровождающееся лихорадочным состоянием и ангиной (часто некротической), увеличением лимфоузлов, ярко-красной мелкоточечной сыпью, мощной интоксикацией организма.

“Малиновый язык” при скарлатине.



Клиническое проявление
стрептодермии



Рожистое воспаление



Флегмона



Стрептококковая ангина

СТРЕПТОДЕРМИИ - это гнойничковые поражения кожи, вызванные стрептококками



ИМПЕТИГО



ЗАЕДА



ПАРОНИХИЯ



Стрептококки серогруппы В

- *S. agalactiae*
- Обнаруживают на слизистых оболочках глотки, прямой кишки, гениталий,
- у 25% здоровых женщин – бессимптомные носители, но в дальнейшем это может привести к септическому аборту, родовому сепсису, сепсису новорожденных и менингиту новорожденных.

CAMP test

Staphylococcus aureus



Streptococcus agalactiae

Стрептококки серогруппы D

- В основном – энтерококки
- Обитатели кишечника здорового человека,
- но при определенных условиях могут стать причиной развития послеоперационных осложнений, пиелонефрита, бактериального эндокардита, язв при пролежнях и абсцессов различной локализации.



Стрептококки, не содержащие групповой АГ

- *S. mutans* – обитатель полости рта, частая причина кариеса, абсцессов, болезней пародонта.
- *S. pneumoniae* - пиогенные стрептококки, причина пневмонии, отличаются от остальных стрептококков особыми свойствами.

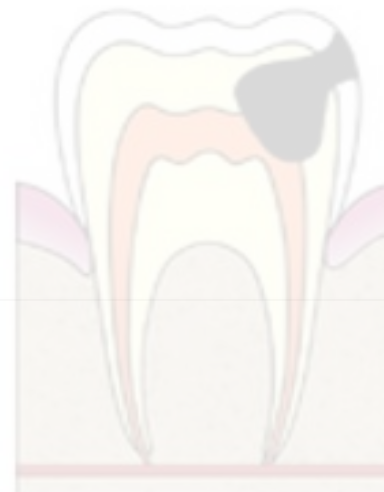


Схема развития кариеса

Лабораторная диагностика стрептококков

Биоптат: слизь с рото- и носоглотки, гной, раневое содержимое, кровь, мокрота, моча.

Посевы на сахарный бульон и кровяной агар.

Выделенные чистые культуры идентифицируют по их морфологическим признакам, характеру гемолиза, биохимической активности: определяют каталазную активность бактерий. У стрептококков каталазный тест должен быть отрицательным.



Тиогликолевая среда

(МПБ+глюкоза)



Двухфазная среда
(МПБ+глюкоза+МПА)



Среды для посева крови

Серотипирование: серогруппу выделенных стрептококков определяют с помощью реакции преципитации в геле или ИФА с группоспецифическими сыворотками;

- серотип стрептококков определяют путем постановки реакции латекс-агглютинации с М-антисыворотками



Наборы для определения серогрупп стрептококков

A hand holding a syringe with a needle, with laboratory glassware in the background.

Лечение и профилактика

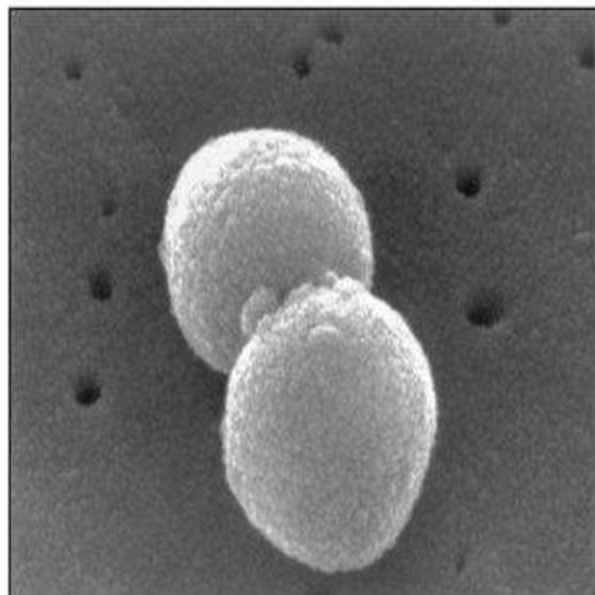
- Лечение антибиотиками (β -лактамы, макролиды).
- Стрептококковый бактериофаг.
- При скарлатине ослабленным детям вводят иммуноглобулин.
- Профилактика неспецифическая.

Пневмококки

Семейство Streptococcaceae

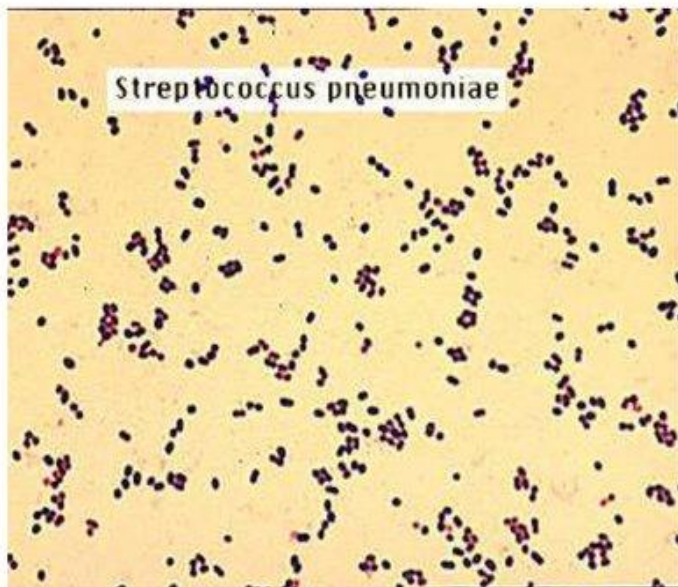
Род Streptococcus

Вид ***S. pneumoniae***

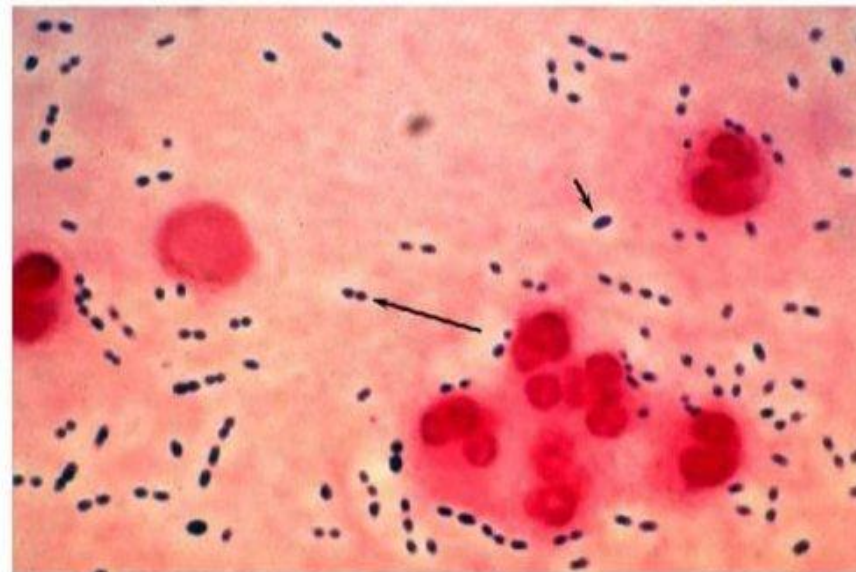


Морфология

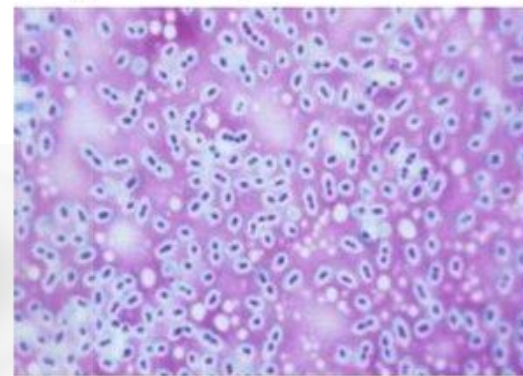
Грамположительные диплококки
ланцетовидной формы,
окруженные общей капсулой,
неподвижны



S. pneumoniae (чистая культура).
Окраска по Граму.



S. pneumoniae в гное. Окраска по Граму. Вокруг
диплококков видна неокрашенная капсула



Капсула

Культуральные свойства



- ❑ Образуют S- и R-формы колоний.
- ❑ При переходе из S- в R-форму теряют способность синтезировать капсулу.

- ❑ Факультативные анаэробы
- ❑ Биохимически малоактивны
- ❑ Растут на средах с кровью и сывороткой
- ❑ На кровяном агаре образуют зеленоватую зону гемолиза *альфа-гемолиз*
- ❑ Чувствительны к *оптохину* и желчи, что отличает их от остальных стрептококков

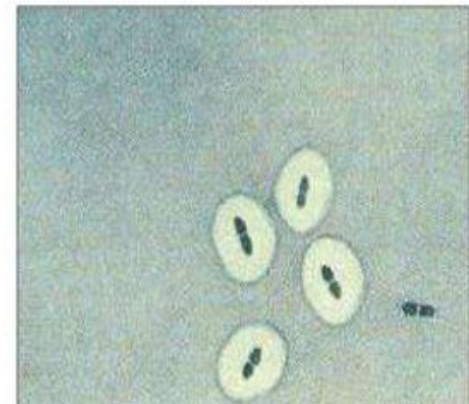
В ЖПС – рыхлый осадок

Расщепляет до кислоты, без газа
глюкозу, мальтозу, галактозу

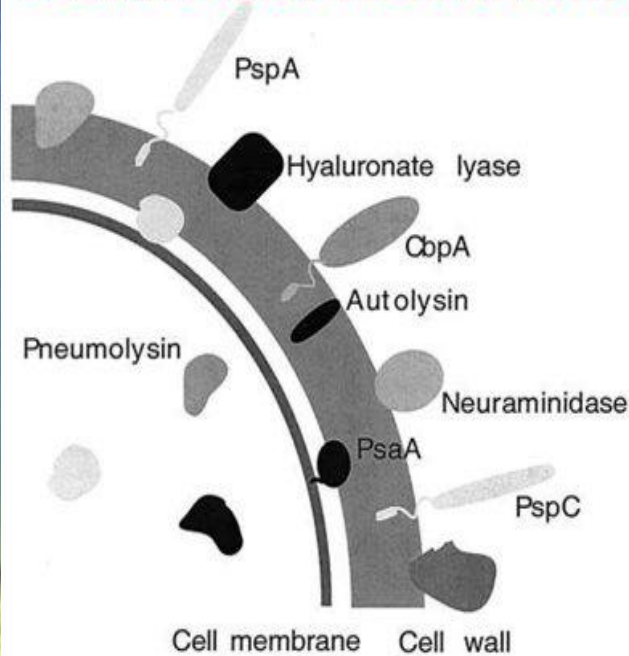
Оксидазу и каталазу не продуцируют

Антигенная классификация

- ❑ Полисахаридный соматический антиген аналогичен С-субстанции других стрептококков, не имеет диагностического значения
- ❑ Нет группового антигена
- ❑ По *капсульному полисахариду* выделяют 93 серотипа.
- ❑ Вирулентность пневмококков разных серотипов варьирует. Пневмококки 1-го, 2-го, 3-го, 5-го, 7-го, 14-го, 16-го, 25-го, 28-го, 36-го, 43-го, 46-го и 47-го серотипов обладают более высокой вирулентностью (выделяются преимущественно при инвазивных инфекциях), серотипы 6, 18, 19 и 23 изолируются преимущественно от носителей.
- ❑ В основе серотипирования – реакция набухания капсулы (в присутствии специфических антител капсула увеличивается в размерах)



Факторы патогенности



PspA - протективный антиген. Находится на поверхности клеточной стенки и блокирует систему комплемента, предотвращая связывание C3 компонента с пневмококком; электроположительная часть антигена нейтрализует заряд капсулы (капсульные полисахариды, особенно пневмококков, сильно электроотрицательны)

- ❑ Поверхностные белки А и С (PspA, PspC), поверхностный антиген А (PsaA), холинсвязывающий белок А (CbpA), а также IgA-протеаза и нейраминидазы обеспечивают адгезию и колонизацию
- ❑ **Капсула** – главный фактор патогенности обеспечивает защиту от фагоцитоза, препятствует механическому удалению с поверхности слизистой, доступу антибиотиков
- ❑ Все компоненты клеточной стенки выступают как активаторы воспаления: активируют комплемент по альтернативному пути, хемотаксис лейкоцитов, индуцируют продукцию интерлейкина-1 и интерлейкина-6, фактора некроза опухолей;
- ❑ Ферменты инвазии – гиалуронидаза и пептидазы;
- ❑ Перекись водорода – разрушает клетки хозяина и может индуцировать апоптоз нервных клеток при менингите;
- ❑ Токсины:
 - гемолизин=пневмолизин (Ply) – является цитотоксином для ресничного эпителия, повреждение которого ускоряет распространение инфекции и непосредственно подавляет активность фагоцитов и иммунокомпетентных клеток
 - холестерол-зависимые цитолизины – связываются с холестерином ЦПМ, встраиваются в мембрану, что приводит к образованию пор и лизису клетки
- ❑ Поверхностный антиген А (PsaA) обеспечивает транспорт Mn^{2+} и Zn^{2+} в цитоплазму бактериальной клетки, *PsaA⁻ мутанты авирулентны*

Эпидемиология

- ❑ *Streptococcus pneumoniae* входит в состав нормальной микрофлоры тракта;
- ❑ Источником инфекции являются бактерионосители
- ❑ Путь передачи – воздушно-капельный
- ❑ Эпидемический процесс при пневмококковых инфекциях проявляется спорадической и вспышечной заболеваемостью.
- ❑ Наиболее часто инвазивными формами пневмококковой инфекции заболевают дети в возрасте от 1 месяца до 2 лет. У детей первого месяца жизни присутствуют материнские антитела против пневмококка, а у детей старше 2 лет успевает развиться приобретенный иммунитет.
- ❑ Другой группой риска по развитию инвазивных форм и летальных исходов при пневмококковой инфекции являются лица старше 65 лет.



Патогенез пневмококковой инфекции

Входные ворота –слизистая оболочка носоглотки.

❑ Компоненты клеточной стенки пневмококков запускают каскад воспалительных реакций, пневмолизины и др. усиливают воспаление и разрушают клетки, что способствует инвазии

❑ На первой стадии процесса пневмококки размножаются в альвеолах, которые в результате воспалительного процесса переполняются серозной жидкостью, что приводит к забросу содержимого в соседние альвеолы, распространению процесса и нарушению газообмена

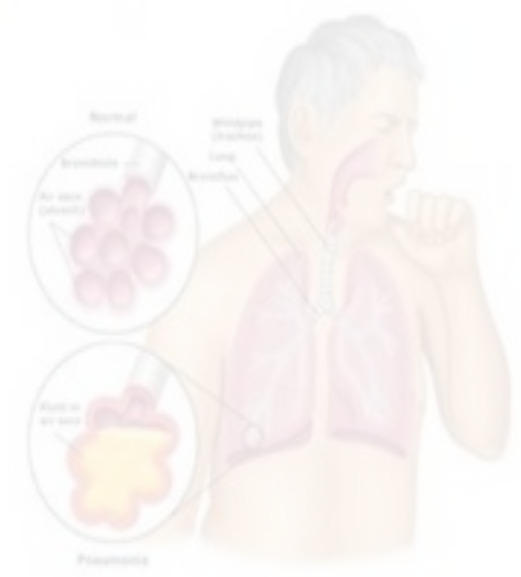
❑ На второй стадии процесса происходит инфильтрация легочной ткани нейтрофилами, а затем эритроцитами (наблюдается выпадение фибрина)

❑ Пораженные доли легкого приобретают консистенцию печени, имеют серый или темно-красный цвет (стадия серой или красной гепатизации). Происходит выделение «ржавой» мокроты





- На третьей стадии процесса легочные альвеолы наполнены нейтрофилами и остаточными пневмококками, возможно поражение соседних участков легких, что проявляется как уплотнение, или фиброз легких
- На четвертой стадии - нейтрофилы замещаются макрофагами, выпот рассасывается и восстанавливается структура легочной ткани.
- Если инфекция прогрессирует, пневмококки могут попасть в кровь. Бактериемия может стать причиной развития менингита, эндокардита, артрита, а также отита и конъюнктивита





Клинические формы пневмонии

- Для крупозной формы пневмонии характерны высокая температура и воспалительное поражение одной или нескольких долей легких
- Для очаговой пневмонии характерно воспаление с вовлечением отдельных сегментов или участков легочной ткани, а также бронхов (бронхопневмония)

Лабораторная диагностика инфекций, вызванных *S.pneumoniae*

Клинический материал: гной, мокрота, плевральный выпот и прочие экссудаты, кровь, экссудат, спинномозговая жидкость, сыворотка, слизь из носа и зева, отделяемое глазных изъязвлений, выделения из уха, моча, кусочки органов (в случае смерти больного)

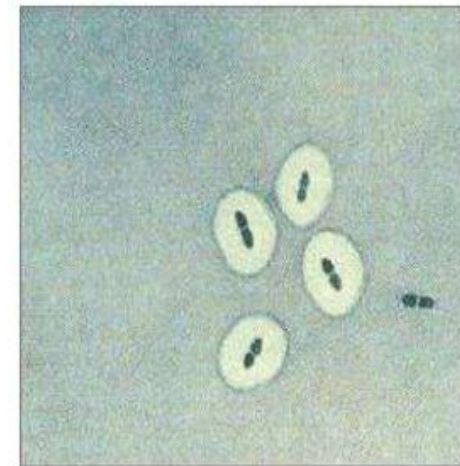
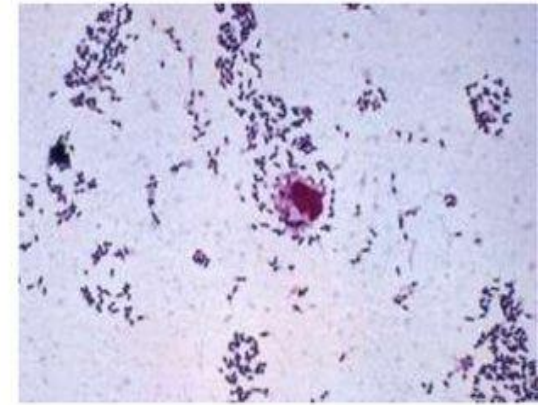
Методы:

1. Бактериоскопический
2. Бактериологический (культуральный) - основной
3. Серологические
4. Биологический метод (заражение мышей с последующим выделением чистой культуры)
5. Иммунофлуоресценция (быстрая диагностика).
6. Иммунохимические
7. Молекулярно-генетические



Бактериоскопический метод

- Микроскопия мазков мокроты (окраска по Граму): обнаруживают Грам+ ланцетовидные диплококки и лейкоциты (не менее 10 стрептококков/поле зрения)
- Важно выявить наличие капсул (окраска простым методом или по Бурри-Гинсу)
- Мазок мокроты весьма информативен, если на нем обнаружено много клеток, принимающих участие в воспалительном процессе (особенно ПМЯЛ), и однотипная микрофлора, например грамположительные кокки или грамотрицательные палочки. Результат особенно показателен, если микроорганизмы находятся внутри или около ПМЯЛ.
- Окончательным доказательством того, что стрептококки в мокроте или других препаратах - это *S. pneumoniae*, служит реакция набухания капсулы при добавлении поливалентной пневмококковой антисыворотки (реакция Нойфельда).



Бактериологический метод

Золотым стандартом микробиологической диагностики пневмококковой инфекции является выделение чистой культуры *S. pneumoniae*

1 этап: посев клинического материала на кровяной агар. Инкубирование в присутствии 5-10% CO₂.

2 этап: Макроскопическое изучение колоний (альфа-гемолиз), мазок по Граму; отсев типичной колонии на свежий агар

3 этап: Идентификацию пневмококков выполняют по следующим тестам:

- обнаружение в нативном материале (ликвор и/или кровь) диплококков, окруженных капсулой;
- рост на средах, содержащих кровь с образованием альфа-гемолиза;
- характерная морфология культурального мазка по Граму;
- положительная проба с оптохином;
- чувствительность к желчным кислотам;
- Для биохимической идентификации пневмококков также используют тест-системы, например, api Strept
- Серотипирование – реакция микроагглютинации или тест Нейфильда (набухание капсулы) с типоспецифическими сыворотками





Оценка результатов культурального исследования.

□ Для нестерильных локусов:

- выявление при посеве в мокроте или лаважной жидкости более чем 10^3 КОЕ/мл пневмококков является диагностическим критерием постановки диагноза пневмония;
- выявление в гнойном экссудате при остром бактериальном синусите более 10^5 КОЕ/мл пневмококков является диагностическим критерием постановки диагноза синусит;
- выявление в гнойном отделяемом при остром среднем отите более 10^4 КОЕ/мл пневмококков, является диагностическим критерием постановки диагноза отит.

□ Для стерильных локусов:

- любое выявление возбудителя в стерильных жидкостях организма служит основанием для постановки диагноза пневмококковой инфекции.



Серологические методы

- ❑ **Серологическая диагностика пневмококковой инфекции** направлена на выявление титра антикапсулярных антител в сыворотке крови больного (диагностическим считают нарастание титра антител через 7-10 суток при исследовании парных сывороток) или пневмококковых антигенов в крови, ликворе и др.

- ❑ Методы: РИА, ИФА, РНГА, количественный встречный иммуноэлектрофорез
- встречный (противоточный) иммуноэлектрофорез (ВИЭ) применяют как для выявления антигенов, так и для серотипирования выделенных штаммов и диагностики заболевания по препаратам мокроты, мочи или других жидкостей организма



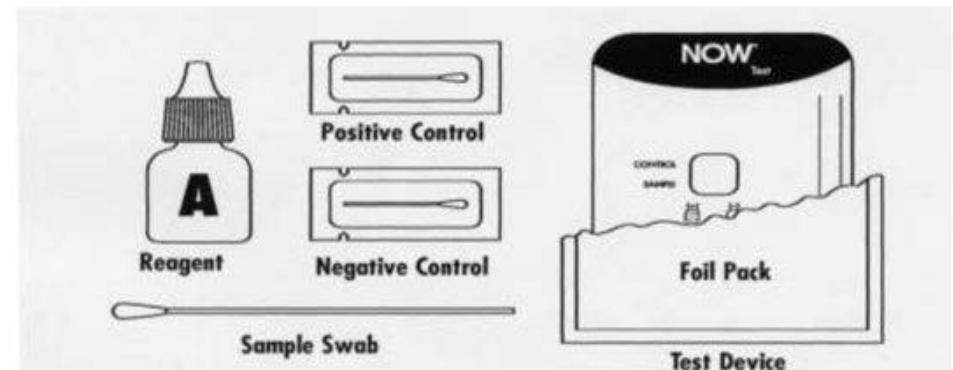
Экспресс - методы

РИА. *Streptococcus pneumoniae*

- выявление специфического антигена в реакции латекс-агглютинации
- РИА (реакция иммунофлуоресценции)
- иммунохроматографический тест для выявления антигена пневмококка в спинномозговой жидкости и моче



NOW *Streptococcus pneumoniae* Test
Быстрый иммунохроматографический тест
для выявления антигена *S.pneumoniae* в
моче и спинномозговой жидкости




Молекулярно-генетические методы

- **ПЦР** применяют для обнаружения специфических генетических фрагментов пневмококка, в качестве мишеней используют специфические фрагменты генов, кодирующих факторы патогенности: пневмолизин (Ply), аутолизин (LytA), пневмококковый поверхностный АГ (PsaA), пневмококковый поверхностный протеин А (PspA), марганец-зависимая супероксид-дисмутаза (sodA), поверхностный пенициллин-связывающий белок 2b (Pbp2b), Spn9802, Spn9828.
- Для повышения специфичности исследования применяется мультиплексная ПЦР, при которой проводится одновременная индикация нескольких генов патогенности с сохранением высокой чувствительности реакции.
- Для исследования используют также методы **РНК-ДНК и ДНК-ДНК гибридизации**, в основе которых лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации (TaqMan принцип).



Лечение и профилактика

- 
- Активность «новейших» фторхинолонов (левофлоксацина, спарфлоксацина) высока, к ним редко формируется устойчивость. Активность *левофлоксацина, моксифлоксацина и спарфлоксацина* превышает активность ципрофлоксацина и офлоксацина в 2–4 раза, к ним редко формируется устойчивость. Эти антибиотики активны в отношении пневмококков, устойчивых к пеницилину, макролидам и ранним фторхинолонам.
 - В детском возрасте, однако, фторхинолоны не разрешены из-за опасности поражения суставов.
 - В настоящее время для профилактики пневмококковых инфекций сертифицированы принципиально отличающиеся по составу и тактике применения две вакцины — *полисахаридная и конъюгированная*.
 - **Пневмо 23** содержит очищенные полисахариды пневмококков 23 наиболее распространенных серотипов
 - В отличие от полисахаридных вакцин, *конъюгированная полисахаридная вакцина*, получившая название **Превенар** (Prevenar, PCV7) (семивалентная конъюгированная вакцина содержит капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* серотипов 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F, 23F) вызывает Т-зависимый иммунный ответ у детей младше 2 лет.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ:

1. Бактериологическое исследование гноя на стафилококк:
 - I этап: а) бактериоскопия мазков (окр. метиленовым синим)
 - б) посев материала на 1/2 чашки с ЖСА.
2. Бактериологическое исследование испражнений:
 - I этап: а) посев материала на 1/2 чашки с ЖСА.
3. Выявление носительства гемолитических стрептококков и стафилококков среди студентов:
 - I этап: а) посев слизи из зева тампоном на 1/4 чашки с кровяным агаром.
4. Оформление и защита протоколов.

