Содержание

Введение

. Литературный обзор

.1 Характеристика возбудителя

.2 Клинические формы и эпидемиологические особенности пневмококковой инфекции

.3 Проблемы и механизмы резистентности пневмококков к антимикробным препаратам

.4 Бактериологический метод

. Практическая часть

Выводы

Список литературы

Приложение

Введение

Актуальность проблемы. Пневмококковая инфекция является частой причиной таких опасных заболеваний как менингит, пневмония, сепсис.

Пневмококк вызывает и такие распространенные болезни, как воспаление среднего уха (средний отит) и воспаление пазух носа (синусит). Многие люди являются носителями пневмококка, даже не подозревая об этом. Бактериальное носительство пневмококка особенно распространено в детских садах (до 60%) и начальных классах школы (до 35%).Наиболее опасен пневмококк для маленьких детей из-за особенности строения этой бактерии. Она имеет прочную полисахаридную оболочку, справиться с которой могут только иммунные клетки взрослого человека, но не ребенка. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире заболевания, вызванные пневмококком, уносят 1,6 миллиона жизней, 800 тысяч из них - дети до двух лет и 200 тысяч - дети от 2 до 5 лет.

Пневмококки являются причиной 80% случаев скрытой бактериемии у детей 0-5 лет жизни, которая протекает с высокой лихорадкой без видимого очага инфекции. [3,5].

В России ежегодно пневмококковыми менингитами заболевает 324 ребенка в возрасте от 0 до 2 лет (10 случаев на 100 000 детей), пневмококковой бактериемией (заражение крови) - 3 243 ребенка (100 случаев на 100 000 детей), пневмококковой пневмонией - 38 960 детей (1200 на 100 000), пневмококковыми отитами - 713 460 детей (22000 на 100 000). [6,10].

Именно поэтому проблема носительства пневмококковой инфекции так актуальна в наше время.

Цель работы. Проведение сравнительного анализа лабораторных методов исследования носительства пневмококковой инфекции.

Поставленная цель достигалась решением следующих конкретных задач:

) Составить обзор литературы по проблеме носительства пневмококковой инфекции;

) Провести сравнительный анализ лабораторных методов исследования биологического материала, направленных на диагностику носительства пневмококковой инфекции;

) Изучить распространённость бактерионосительства S.pneumoniae среди населения в городе Ханты-Мансийск с 2007 по 2014 гг.

1. Литературный обзор

.1 Характеристика возбудителя

Streptococcus pnemoniae (пневмококк) впервые описан Р.Кохом в 1871 году.[2].

Морфология и биологические свойства. Пневмококки представляют собой парно расположенные кокки овальной, слегка вытянутой ланцетовидной формы, напоминающие пламя свечи. Они могут располагаться также короткими цепочками, напоминая стрептококки. В организме человека и животных образуют капсулу; при выращивании на искусственных средах она отсутствует. Неподвижны, спор не образуют, грамположительны.

По типу дыхания - факультативные аэробы.[5,8,9] На простых питательных средах не растут или дают скудный рост. Выращивают их на средах с добавлением белка: кровяных, сывороточных, с асцитической жидкостью. На кровяном агаре колонии пневмококков мелкие, напоминающие росинки, прозрачные в проходящем свете, с вдавленным центром, окружены зоной неполного гемолиза, зеленоватого оттенка, сходные с колониями зеленящего стрептококка. На жидких средах дают нежное помутнение, иногда образуя осадок. Биохимически довольно активны: разлагают глюкозу, лактозу, мальтозу, инулин и другие углеводы с образованием кислоты, не разжижают желатина, не образуют индола.[4,5,11] Расщепление инулина является дифференциально-диагностическим признаком, помогающим отличить пневмококки от стрептококков, которые инулин не разлагают. Важным отличительным признаком служит способность пневмококков растворяться в желчи, в то время как стрептококки хорошо в ней сохраняются.[12]

Токсинообразование. Пневмококки содержат эндотоксин, а также гемотоксин, фибринолизин, лейкоцидин, гиалуронидазу. Вирулентность пневмококка связана с веществом капсулы. В ней находится антифагин, препятствующий фагоцитированию лейкоцитами пневмококков.[15,19]

Устойчивость. Пневмококки малоустойчивы во внешней среде. Они быстро теряют жизнеспособность под действием различных дезинфицирующих веществ. При температуре 60°С погибают в течение 10 мин. На искусственных питательных средах сохраняются не более 6- 7 дней. Вместе с тем пневмококки довольно устойчивы к высушиванию: в высушенной мокроте остаются жизнеспособными до 2 мес. Под действием оптохина в концентрации 1 : 1000000 быстро погибают.[1,5,8]

Антигенная структура. У всех пневмококков имеется один общий видовой протеиновый антиген, находящийся в цитоплазме. В капсуле пневмококков имеются различные полисахариды, специфичные для каждого типа. В настоящее время пневмококки делят по капсульному антигену на 80 типов. Считают, что наибольшее значение в патологии человека имеют I, II и III типы, но с каждым годом выявляется патогенность новых типов.[17]

Пневмококки отличаются от других микроорганизмов по ряду свойств (табл.1).

.2 Клинические формы и эпидемиологические особенности пневмококковой инфекции

Фактором патогенности бактерии пневмококка является капсульный полисахарид, который обеспечивает подавление комплимент-зависимой бактериолитической активности крови и фагоцитарной активности лейкоцитов. Капсульный полисахарид является основным антигеном, к которому вырабатываются антитела при заболевании пневмококковой инфекцией или здоровом носительстве пневмококка [1, 2].

Исходя из химического строения и антигенных свойств полисахаридной капсулы бактерии, выделяют 93 серотипа S. pneumoniae. Генетически серотипы существенно различаются и представляют собой изолированные субпопуляции S. pneumoniae. Серотип возбудителя во многих случаях определяет тяжесть заболевания. Результаты исследований серотипового состава пневмококков в различных странах свидетельствуют, что на глобальном уровне более 80% наиболее тяжелых инвазивных заболеваний вызываются 20 серотипами, а 13 серо-типов вызывают 70 - 75% заболеваний [3,4, 5].

Пневмококк является обычным представителем микрофлоры слизистой оболочки верхних дыхательных путей человека, и передается, как правило, воздушно-капельным путем.

Резервуаром и источником возбудителя пневмококковой инфекции является инфицированный человек (больные любой клинической формой и, в первую очередь, здоровые носители). Спектр клинических форм заболевания очень широк, но преобладают заболевания верхних и нижних дыхательных путей.

Уровень носительства S. pneumoniae в человеческой популяции в целом варьирует в зависимости от эпидемических условий от 10% до 80%, а у детей - от 20% до 50%, но в условиях скученности и формирования новых детских коллективов может достигать 80%. Высок уровень носительства пневмококков в детских садах (до 70%), интернатах (до 86%) [3,6].

Дети первых лет жизни являются основными источниками пневмококковой инфекции, заражая окружающих взрослых. Так, при обычной частоте носительства у взрослых в 5-7%, среди проживающих с детьми она может достигать 30%. [6]

При проведении многоцентрового исследования по пневмококковой инфекции в России в 2001 - 2002 году было обследовано 4153 ребенка в возрасте до 7-ми лет в детских садах и детских домах в 11 городах европейской части России (Волгоград, Воронеж, Екатеринбург, Казань, Краснодар, Москва, Нижний Новгород, Санкт Петербург, Смоленск, Уфа, Челябинск) и 8 городах азиатской части страны (Анадырь, Владивосток, Иркутск, Новосибирск, Тюмень, Хабаровск, Ханты-Мансийск, Якутск). Носительство пневмококков было выявлено в среднем у 49,3% детей в детских садах и до 86,7% в детских домах. В обоих случаях преобладали пневмококки 23, 19 и 6 серогрупп: в азиатской части в пропорциях - 38,2% (23 серогруппа), 23,6% (19 серогруппа) и 25,5% (6 серогруппа), в европейской - соответственно 22,2%, 24,1% и 14,8% [7].

По данным НЦДЗ РАМН, в 2010г. среди циркулирующих у носителей серотипов пневмококка доминировали серотипы 6А/В (25%), 19F (21%). 23F(12%) и 15В/С (7%) [8].

Пневмококки 23, 19 и 6 серогрупп (серотипы 23F, 19F, 19A, 6B) часто характеризуются повышенной устойчивостью к пенициллину и другим антибактериальным препаратам, а также могут обладать полирезистентными свойствами, что обусловлено генетическими мутациями циркулирующих штаммов.

Спектр антибиотикорезистентности пневмококка зависит как от географического места изоляции, так и от вида материала, из которого изолирован штамм (мазок из носоглотки, спинномозговая жидкость и др.). В России уровень устойчивости пневмококков выделенных их нестерильных локусов к пенициллинам (МПК>0,06 мг/л) составляет в среднем 11%, к макролидам 7%, к тетрациклинам - 25%, котримоксазолу - 39%. Полирезистентностью (устойчивостью к 3 и более классам антимикробных препаратов) обладает 14,5% штаммов пневмококка, большинство из которых (>90%) выделено из респираторных образцов. Это затрудняет лечение пациентов с пневмококковой инфекцией, требует применения дорогих альтернативных антимикробных средств, увеличивает продолжительность госпитализации и медицинские расходы на лечение [7,9,15].

Факторами, способствующими распространению антибиотикорезистентных штаммов является скученность, посещение детских учреждений, отмечена связь между числом детей в группе и частотой выделения таких штаммов [16]. Различают "инвазивные" формы пневмококковой инфекции, при которых возбудитель обнаруживается в жидкостях и тканях организма, стерильных в нормальных условиях (кровь, спинномозговая жидкость, перитонеальная и плевральная жидкости и т.п.), и "неинвазивные" формы, к которым относится "небактериемическая" пневмония (при отсутствии возбудителя в крови), острый средний отит, синусит и т.п.

К "инвазивным" формам пневмококковой инфекции относятся менингит, пневмония с бактериемий, септицемия, септический артрит, остеомиелит, перикардит, эндокардит[2,3,10,17], которые являются наиболее тяжелыми и наиболее исследованными формами пневмококковой инфекции (ИПИ) [2,3,6,10,17]. Выявление и диагностика иных форм пневмококковой инфекции крайне затруднены.

Среди инвазивных форм пневмококковой инфекции около 20% случаев составляет пневмококковый менингит. По расчетной оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на один случай пневмококкового менингита приходится 24 случая пневмококковой бактериемии, 132 пневмококковой пневмонии и 3750 случаев острого среднего отита[17,18].

У детей самыми частыми клиническими формами пневмококковой инфекции являются острый средний отит (до 60%), синуситы (до 45%) и пневмония (до 65-80% случаев). Пневмококковые менингиты составляют 5-26% всех гнойных бактериальных менингитов у детей [11,12,13].

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 [5,10,14].

Дети первых 2 лет жизни не в состоянии вырабатывать антитела на полисахаридные антигены, что делает их практически беззащитными перед возбудителем. Это особенно относится к пневмококкам серогрупп 6 и 19, обладающим наименьшей иммуногенностью и доминирующим среди носителей и заболевших. Группами риска <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D1%80%D1%83%D0%BF%D0%BF%D0%B0\_%D1%80%D0%B8%D1%81%D0%BA%D0%B0> по заболеваемости пневмококковой инфекцией являются:

· лица 65 лет и старше (в первую очередь - постоянно находящиеся в специальных учреждениях по уходу за престарелыми). Прививки против пневмококковой инфекции в этом возрасте являются обязательными во многих странах мира, экономически развитых и развивающихся.

· дети и взрослые с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной систем, сахарным диабетом, циррозом печени, хронической почечной недостаточностью, болезнью Ходжкина;

· дети и взрослые, планирующие или уже подвергшиеся удалению селезенки;

· дети и взрослые с серповидно-клеточной анемией;

· дети и взрослые с онкогематологическими заболеваниями;

· ВИЧ-инфицированные дети и взрослые;

· «Организованные» контингенты (военнослужащие, жители домов инвалидов, заключенные и другие взрослые и дети, пребывающие в условиях скученности);

· имеющие алкогольную зависимость;

· курильщики сигарет.[25]

Показания к обследованию: Пациенты при подозрении на крупозную пневмонию, острый бронхит; отит, синусит; менингит, менингоэнцефалит; септическое состояние; поражения кожи, подкожной клетчатки, соединительной ткани (редкая локализация инфекции); конъюнктивит (редкая локализация инфекции).[25,26]

После перенесенного заболевания у человека остается нестойкий иммунитет, так как пневмония характеризуется рецидивами.[11]

Профилактика сводится к санитарно-профилактическим мероприятиям. Специфической профилактики нет.[11,13]

Для лечения пневмококковой инфекции используют антибиотики- пеницилин, тетрациклин и др. Но в ответ на применение антибиотиков <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B8%D0%BA>, пневмококки выработали ко многим из них устойчивость. Так, в странах с широким применением антибиотиков, уровень резистентности пневмококков к пенициллину составляет до 50 % от всех выделяющихся пневмококков, к тетрациклину и левомицетину - около 30 % <http://www.privivka.ru/info/infections/pneumococcus.php>. [26,28]

1.3 Проблемы и механизмы резистентности пневмококков к антимикробным препаратам

Резистентность к пенициллину. pneumoniae является примером микроорганизма, который в течение длительного времени оставался чрезвычайно высокочувствительным к пенициллину. Поэтому до недавнего времени пенициллин (или ампициллин) был препаратом выбора для лечения инвазивной пневмококковой инфекции. Штаммы со сниженной чувствительностью встречались во всем мире, однако в России (Москва) их количество не превышало 10% всех выделенных от пациентов с менингитом.

Резистентность S.pneumoniae к антибактериальным препаратам резко возросла и начала привлекать пристальное внимание с начала 90-х годов [28, 29]. В некоторых регионах мира встречается до 35% пневмококков, имеющих промежуточную резистентность к пенициллину [30]. Штаммы с резистентностью к трем и более классам антибактериальных препаратов (бета-лактамам, макролидам, тетрациклинам и др.) называются полирезистентными. Они впервые были обнаружены на юге Африки [29], в настоящее время выявляются во многих странах [22-24], их количество может достигать 25% всех выделяемых штаммов [12].

Механизм резистентности к пенициллину связан с изменением пенициллинсвязывающих белков (ПСБ). У S.pneumoniae обнаружены шесть высокомолекулярных ПСБ, изменение трех из них приводит к повышению минимальной подавляющей концентрации (МПК) пенициллина, причем степень изменения ПСБ коррелирует с величиной МПК [25-30]. Изменение ПСБ происходит в результате мозаичных мутаций в хромосоме S.pneumoniae [41]. Имеются доказательства того, что некоторые штаммы пенициллинрезистентных пневмококков (ПРП) стали таковыми в результате передачи трансформированной ДНК от штаммов семейства зеленящих стрептококков [22, 23].

Принципы лабораторной диагностики резистентных штаммов. Заключение о резистентности пневмококков дается на основании лабораторного исследования штамма согласно стандартам National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Имеются два уровня резистентности пневмококков к пенициллину: промежуточный (МПК 0,12-1 мкг/мл) и резистентный (МПК 2 мкг/мл и выше) [24]. Пневмококки с МПК ниже 0,06 мкг/мл считаются чувствительными. Кроме пенициллина, исследуется чувствительность штаммов к цефтриаксону или цефотаксиму. Чувствительные штаммы имеют МПК ? 0,25 мкг/мл, штаммы с промежуточной резистентностью - от 0,5 до 1 мкг/мл, резистентные ? 2 мкг/мл [25]. Недавно внесены изменения в отношении резистентности пневмококков к амоксициллину: чувствительными считаются штаммы с МПК ? 2 мкг/мл, промежуточно резистентными - с МПК 4 мкг/мл и резистентными - с МПК > 4 мкг/мл [26]. В случае использования только диско-диффузионного метода заключение о чувствительности конкретного штамма не может быть окончательным, штамм рассматривается как вероятно резистентный и для уточнения должен быть исследован с помощью метода серийных разведений или Е-теста.

В последнее время предполагается, что МПК к пенициллину возбудителей, выделенных от пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей, могут быть изменены в сторону увеличения: чувствительные ? 1 мкг/мл, промежуточно резистентные = 2 мкг/мл и резистентные ? 4 мкг/мл [47]. Относительно пациентов с менингитом и бактериемией таких предложений не высказывается.

Резистентность к другим бета-лактамным антибиотикам. Механизм действия всех бета-лактамных антибиотиков опосредован взаимодействием с ПСБ. Поэтому все резистентные к пенициллину пневмококки имеют повышенные МПК в отношении и других бета-лактамных антибиотиков. МПК пневмококков с промежуточной резистентностью оказывается в 8-16 раз выше, чем у штаммов, чувствительных к пенициллину. Дополнительное четырехкратное увеличение МПК отмечается у штаммов с высокой степенью резистентности. В то же время различные бета-лактамы отличаются по активности в отношении пневмококков, например, активность цефотаксима и цефтриаксона выше активности цефазолина и цефаклора, поэтому МПК последних выше как в отношении чувствительных штаммов, так и в отношении штаммов с промежуточной резистентностью и резистентных [27]. Выявлена линейная зависимость между активностью цефуроксима, амоксициллина, амоксициллин/клавуланата, цефаклора, лоракарбефа, цефиксима, цефподоксима, цефтриаксона и МПК пенициллина в отношении пневмококков [17]. Другими словами, существует почти полная перекрестная резистентность бета-лактамных антибиотиков в отношении S.pneumoniae.

Резистентность к другим группам антибиотиков. Недавно показано, что S.pneumoniae могут быть устойчивыми и к другим препаратам: 25% штаммов резистентны к триметоприм/сульфаметоксазолу, 19% - к макролидам, 14% - к тетрациклинам, 7% - к хлорамфениколу, 6% - к клиндамицину [28]. Наиболее высокую резистентность к не бета-лактамным антибиотикам проявляли штаммы, имевшие высокую резистентность к пенициллину. Однако эти представления нельзя механически переносить одинаково на все не бета-лактамные препараты, так как их механизмы резистентности различны. Указанные варианты полирезистентности связаны с распространением штаммов, имеющих конкретные биологические особенности, сформированные в результате многих факторов, важнейшим из которых является политика применения пероральных антибиотиков.

До настоящего времени ванкомицин остается высокоэффективным препаратом в отношении S.pneumoniae. Тем не менее недавно был описан клинический изолят с высокой устойчивостью к ванкомицину. Для его подавления требовалась концентрация, в 16-32 раза превышающая МПК [29]. Согласно МПК активность макролидов в отношении S.pneumoniae различна: кларитромицин примерно в 2 раза активнее эритромицина, последний в 2 раза активнее азитромицина [28]. При этом количество штаммов, резистентных к каждому из этих антибиотиков, примерно одинаково. В отсутствие достоверных клинических данных о сравнительной эффективности этих препаратов считается, что кларитромицин более эффективен, чем азитромицин при тяжелых пневмониях, вызванных пневмококками. Резистентность пневмококков к макролидам у 75% штаммов связана с наличием механизма усиленного выброса (эффлюкса) антибиотика из клетки и у 25% - с изменением в рибосомах. Наличие эффлюкса приводит к резистентности со значением МПК 1-32 мкл/мл, а нарушение в рибосомах - к высокому уровню резистентности - МПК ? 64 мкл/мл [48, 50]. Появляются доказательства того, что мутантные штаммы с механизмом инфлюкса могут быть подавлены кларитромицином - макролидом с наибольшей активностью в отношении S.pneumoniae и предпочтительным фармакокинетическим профилем. В настоящее время три препарата группы фторхинолонов могут быть использованы для лечения тяжелых инфекций, вызванных S.pneumoniae: левофлоксацин, гатифлоксацин и моксифлоксацин. Все три препарата имеют одинаковый фармакокинетический профиль, in vitro активность моксифлоксацина в 2 раза выше гатифлоксацина, а последний - в 2 два раза активнее левофлоксацина [21-30]. Эти препараты предназначены почти исключительно для лечения инфекций дыхательных путей.

Новыми препаратами, которые могут найти применение в лечении инвазивной пневмококковой инфекции, являются хинупристин/дальфопристин (синерцид)- препарат группы стрептограминов для парентерального применения [23, 24] и линезолид - препарат группы оксазолидинонов [25, 26]. Высокая активность в отношении S.pneumoniae была показана у обоих препаратов, однако клинический опыт их применения остается ограниченным.

Клиническое значение резистентности S.pneumoniae. Наибольшее количество резистентных штаммов пневмококков выделяется от пациентов с острым средним отитом и гайморитом, самое низкое количество резистентных изолятов было получено от пациентов с инвазивной инфекцией из крови и нормально стерильных полостей организма [28]. При анализе возрастного состава пациентов было показано, что наибольшее количество резистентных штаммов было выделено от пациентов раннего детского и пожилого возраста. Антимикробная резистентность пневмококков широко варьировала в зависимости от географического региона, где проводилось исследование.

Большинство резистентных штаммов S.pneumoniae относится к одному из капсульных серотипов (B6, 9V, 14, 19f, 23F) [27-30]. Серотипы, имеющие более низкие порядковые номера (1, 3, 4, 5), обычно были чувствительны к бета-лактамным и другим группам антибактериальных препаратов, причем именно эти штаммы наиболее часто вызывают инвазивные жизнеугрожающие инфекции.

Проблема лечения инвазивной и неинвазивной пневмококковой инфекции тесным образом связана с распространенностью резистентных штаммов. Публикаций, посвященных обобщению клинического значения резистентности пневмококков, до настоящего времени немного [27, 30]. Важнейшей проблемой является выбор препаратов для эмпирической терапии пневмококков с промежуточной резистентностью или резистентных. Такими препаратами могут быть те препараты, которые обычно рассматриваются как альтернативные. В отношении пациентов с инвазивной пневмококковой инфекцией возникает вопрос о необходимости эмпирического применения ванкомицина и рифампицина. Существующее деление пневмококков по отношению к пенициллину на чувствительные, промежуточно резистентные и резистентные однозначно не отвечает на вопрос, как использовать эти данные для лечения пациентов с менингитом? Это связано с тем, что применение пенициллина, даже в массивных ("менингитных") дозах при инфекциях, вызванных пневмококками с промежуточной резистентностью и резистентностью будет приводить к неэффективности этиотропной терапии. Легко представить, что снижение пенетрации пенициллина в субарахноидальное пространство на фоне уменьшения воспаления оболочек мозга может приводить к такому уровню препарата, который не сможет ингибировать рост пневмококков со значительно повышенной МПК.

В отношении пневмококковой бактериемии необходимо заметить, что пациенты, инфицированные штаммами с МПК ниже 2 мкг/мл, удовлетворительно отвечают на лечение обычными дозами пенициллина (1-2 млн ЕД внутривенно через 4 ч). Однако однозначных рекомендаций по лечению бактериемий, вызванных резистентными штаммами нет, как и в отношении пациентов с эмпиемой плевры.

Необходимо отметить, что факторы риска развития пневмококковой инфекции одновременно могут играть роль факторов прогноза исхода тяжелой инвазивной инфекции. Может быть, поэтому появляются ограниченные данные, указывающие на одинаковую летальность пациентов с инвазивной пневмококковой инфекцией, вызванной чувствительными и резистентными к пенициллину штаммами в случае применения как пенициллинов, так и цефалоспоринов [12-25].

Тактика антибактериальной терапии инвазивной инфекции S.pneumoniae. Многие резистентные к пенициллину пневмококки могут быть также резистентными к другим антибактериальным препаратам (эритромицин, цефалоспорины, фторхинолоны, триметоприм/сульфаметоксазол). Высокий уровень резистентности к пенициллину и полирезистентность являются реальной проблемой лечения инфекции. Пациенты с инфекцией, вызванной резистентными штаммами пневмококков, могут потребовать применения более дорогостоящих антимикробных препаратов, большей продолжительности лечения, что приводит к росту затрат, связанных с лечением. Тем более, что ответа на вопрос о влиянии резистентности пневмококков на летальность от этой инфекции пока не получено.

С учетом всех противоречий, связанных с резистентностью пневмококков, по-видимому, необходимо придерживаться определенных принципов лечения пациентов с инвазивной пневмококковой инфекцией, приведенных в таблице.

Помимо этого, в связи с быстротечным развитием заболевания (2-3 дня), времени на специальное определение чувствительности к антибиотикам, как правило, нет и пациенты с тяжелыми инфекциями нередко погибают несмотря на введение стандартных антибактериальных препаратов. Поэтому целью моей работы является провести сравнительный анализ лабораторных методов исследования носительства пневмококковой инфекции и выявить наиболее информативный и доступный метод.

Сравнительный анализ лабораторных методов исследования носительства пневмококковой инфекции.

Материал для исследования:

· Мокрота, пунктаты (при подозрении на пневмонию); гнойное отделяемое, пунктаты (средний отит, синусит); кровь (менингит, менингоэнцефалит); кровь (септические состояния); отделяемое из раны (кожные поражения); секционный материал - культуральные исследования, выявление ДНК микроорганизма;

.4 Бактериологический метод

пневмококковый инфекция антимикробный лабораторный

«Золотым стандартом» является выделение возбудителя. Следует помнить, что материал необходимо исследовать быстро, т.к. бактерии склонны к быстрому аутолизу, обусловленному активностью внутриклеточных ферментов. Материалом для исследования является мокрота, плевральный выпот и прочие экссудаты, спинномозговая жидкость, кровь, слизь из носа и зева, отделяемое глазных изъязвлений, выделения из уха, моча, кусочки органов (в случае смерти больного). Сигнальный ответ на пневмококковую инфекцию может быть выдан при обнаружении в мазках из мокроты нейтрофилов и грамположительных ланцетовидных диплококков (не менее 10 в поле зрения). В противном случае прибегают к выделению возбудителя.[11]

Первый этап исследования. Патологический материал подвергают предварительной бактериоскопии (кроме крови). Мокроту помещают в стерильную чашку Петри, отмывают, петлей захватывают гнойно-слизистый комочек, растирают на предметном стекле, высушивают и красят по Граму. В мазке обнаруживают грамположительные ланцетовидной или овальной формы кокки, окруженные капсулой (капсулообразование наблюдается только у пневмококков, выделенных от больных и зараженных животных). Выявление капсул пневмококков можно проводить по методу Бурри-Гинса. Посев патологического материала производят на 5-10% кровяной или сывороточный агар и на среду обогащения (8-10% сывороточный бульон). При подозрении на сепсис пневмококковой природы 5-10 мл крови больного засевают на 45-90 мл сывороточного бульона.[24,26] Спинно-мозговую жидкость, если она прозрачна, центрифугируют и несколько капель из осадка засевают на питательные среды. В качестве среды обогащения используют полужидкий сывороточный агар. Посевы инкубируют при 37 °С 24 часа. Лучшим методом выделения чистой культуры пневмококков является заражение белых мышей патологическим материалом.[24] Мокроту, отмытую в чашке Петри стерильным физиологическим раствором, растирают в стерильной ступке стерильным пестиком или битым стеклом при добавлении физиологического раствора в отношении 1:2-1:5. Взвесь отстаивают, надосадочную жидкость в количестве 0,5-1 мл вводят белым мышам внутрибрюшинно. При наличии в материале пневмококков мыши погибают в течение 72 часов. В мазках из органов и крови обнаруживают типичные пневмококки. Также производят посев органов и крови на сывороточный бульон и на чашки Петри с кровяным или сывороточным агаром.[24-28] Второй этап исследования. Изучают характер роста на питательных средах. На кровяном агаре колонии пневмококков мелкие, круглые, с ровными краями, нежные, окруженные зоной позеленения среды (что весьма напоминает рост зеленящих стрептококков). На сывороточном агаре колонии нежные, полупрозрачные и прозрачные. При бактериоскопии мазков, окрашенных по Граму. обнаруживают грамположительные диплококки без капсул. После бактериоскопии колонии, подозрительные на пневмококки пересеивают на скошенный сывороточный или кровяной агар или на сывороточный бульон. При микроскопии мазков со среды обогащения наряду с различной микрофлорой можно обнаружить грамположительные кокки, располагающиеся парами или короткими цепочками. Материал со среды обогащения пересеивают на плотные питательные среды. Посевы инкубируют при 37°С 24 часа.[24-28]

Третий этап исследования. Па скошенном кровяном агаре пневмококки образуют нежный тонкий полупрозрачный налёт. На сывороточном бульоне пневмококки вызывают помутнение и легкий осадок. В мазках с плотных питательных сред пневмококки могут иметь различный вид. Наряду с диплококками удлиненной формы с заостренными наружными концами, напоминающими пламя свечи, встречают клетки правильной овальной и круглой формы. В бульонной культуре пневмококки часто располагаются цепочками. На основании морфологических и культуральных свойств пневмококки трудно отличить от зеленящих стрептококков, поэтому для их дифференцировки предложен набор специальных тестов:

•растворимость в желчи (дезоксихолатная проба);

•способность разлагать инулин;

•чувствительность к оптохину;

•реакция агглютинации со специфическими антипневмококковыми сыворотками;

•способность разлагать глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, маннит, сорбит и салицин.

Наиболее доступными методами, дифференцирующими пневмококки от прочих стрептококков являются проба с оптохином (угнетает их рост); от зеленящих стрептококков их отличает способность ферментировать инулин, а также чувствительность к желчи.[23-30]

Дезоксихолатная проба. После предварительной бактериоскопии в пробирку с 5 каплями стерильной бычьей желчи вносят 10 капель, выделенной чистой культуры (лучше бульонной). Контролем служит культура, внесённая в пробирку с 5 каплями физиологического раствора. Через 30-60 минут инкубации при 37 °С наблюдают полный лизис культуры в виде просветления в пробирке с желчью, в контрольной пробирке смесь остаётся мутной. Следует помнить, что авирулентные культуры пневмококка устойчивы к желчи.

Устойчивость к желчи также можно проверять посевом в 10% желчный бульон. В среду вносят исследуемый материал, при этом бульон мутнеет. После 24 часовой инкубации при 37 °С на наличие пневмококков укажет просветление бульона в результате лизиса бактерий.

Также можно использовать диски, пропитанные 20% раствором желчи. Диски помешают на выросшую культуру в чашке и инкубируют 1-2 часа при 37 °С. При наличии пневмококков колонии лизируются вокруг диска на расстоянии 1 -2 мм.[11]

Проба на инулин. Культуру пневмококка засевают на среду с инулином. Для этого к 100 мл прогретой при 56 °С в течение 30 мин бычьей сыворотки прибавляют 200 мл стерильной дистиллированной воды, 18 мл лакмусовой настойки и 3 г инулина, стерилизуют текучим паром 30 минут. Посевы инкубируют при 37 °С 24 часа. Пневмококк разлагает инулин, в результате чего среда краснеет. Зеленящий стрептококк не вызывает покраснения среды.[11]

Проба с оптохином. Испытуемую культуру пневмококка засевают на сывороточный бульон с оптохином в разведении 1:100000 или 1:200000. Пневмококк на такой среде не растёт. Также можно определить чувствительность к оптохину и посевом на 10% кровяной агар, содержащий оптохин в разведении 1:50000. Контролем является посев культуры на кровяной агар. Пневмококки не растут на среде с оптохином, на контрольной среде наблюдается рост пневмококков. Можно использовать диски, пропитанные 6 мкг оптохина, которые накладывают после посева на поверхность среды. У пневмококков вокруг диска образуется зона задержки роста не менее 18 мм диаметром.[11]

Проба на вирулентность. Суточную культуру пневмококка, выращенную на сывороточном бульоне разводят 1% стерильной пептонной водой (рН - 7,6) или слабощелочным бульоном до 1:10. Разведённую культуру вводят внутрибрюшинно белым мышам весом 16-20 гр в объёме 0,5 мл и наблюдают в течение 72 часов. Из органов погибшей мыши делают высевы на питательные среды и микроскопируют мазки-отпечатки. К высоковирулентным культурам относят пневмококки, вызывающие гибель мышей после введения культуры в разведении 1:10. Авирулентные культуры не вызывают гибели мышей.[12,14 ]

Несмотря на очевидные преимущества бактериологического метода исследования, скорость получения результата и его чувствительность являются сравнительно невысокими, что явилось стимулом разработки новых диагностических подходов, включая полимеразную цепную реакцию(ПЦР) и различных модификаций серологических тестов[23].

Серотипирование пневмококков. 18-часовую культуру проверяют в реакции микроагглютинации по Сэбину. На предметное стекло наносят 4 капли культуры пневмококка. К 1 капле добавляют каплю антипневмококковой сыворотки типа 1, ко 2-й - сыворотку типа II, к 3-й - сыворотку - 111, к 4-й - каплю нормальной сыворотки. Смеси на стекле перемешивают петлей и рассматривают под лупой или под микроскопом при малом увеличении. В положительном случае в одной из первых трех капель наблюдается агглютинация.[23] Тип пневмококка определяют в реакции агглютинации со специфическими агглютинирующими сыворотками первых трёх фиксированных типов. Культуры, которые не агглютинируются указанными типами сывороток, относят к Х-группе. Реакцию ставят следующим образом. Разливают 18 - часовую бульонную культуру по 0,5 мл в пробирки. Затем вносят в равном объёме сыворотки, разведённые физиологическим раствором в соотношении 1:5. Контролями служат 2 пробирки, одна из которых содержит испытуемую культуру в смеси с нормальной кроличьей сывороткой, а другая - только исследуемую культуру. Содержимое пробирок тщательно встряхивают и ставят на 2 часа в термостат при температуре 37 °С, после чего проводят предварительный учет реакции. Окончательные результаты отмечают после дополнительного выдерживания при комнатной температуре в течение 20 часов. Агглютинацию оценивают на четыре плюса, если содержимое пробирок полностью просветляется, а агглютинационная культура представляет собой плотную пленку, не разбивающуюся при встряхивании; на три плюса если при полном просветлении содержимого пробирки агглютинирующая культура легко разбивается на части; на два плюса - если просветления не наступает, в мутном содержимом пробирки хорошо видны невооруженным глазом частицы агглютинированной культуры; при агглютинации на один плюс в пробирке обнаруживают мелкозернистую смесь склеенных пневмококков. При отрицательной реакции, видимой глазом, агглютинации не наблюдают; содержимое пробирок после встряхивания представляет собой равномерную муть.[23,28 ]

Типирование пневмококков Х-группы проводят с помощью групповых сывороток, содержащих смесь типовых агглютинирующих сывороток, взятых в равных объёмах. Готовят следующие групповые сыворотки путем смешивания равных объемов неразведенных типовых диагностических сывороток (Lund, I960):

· А -1, II, IV, V, XVIII серовары;

· В - VI, VIII, XIX серовары;

· С - VII, XX. XXIV, XXXI, XLсеровары;

· D - IX, XI, XVI, XXXVI. XXXVII серовары;

· Е - X, XXI. XXXIII, XXXIX серовары;

· F- XII. XVII. XXII, XXXVII, XXXII, XLI серовары;

· G- XIII, XXV. XXIX, XXXIV, XXXV, XXXVIII, XLII, XLVII серовары;

· J-XLIII. XLIV, XLV, XLVI серовары.[23]

Агглютинирующую сыворотку III типа используют perse(без смешивания с другими типовыми сыворотками) из-за трудности ее получения в достаточно высоком титре. Типирование проводят в два приёма: сначала с помощью групповых сывороток, а затем с индивидуальными сыворотками той группы, с которой была получена положительная реакция. Серотипирование пневмококков применяют преимущественно для эпидемиологических исследований результатов специфической серотерапии и серопрофилактики.[11-17]

Микроагглютинацию пневмококков по методу Сэбина можно получить при смешивании антипневмококковых сывороток с экссудатом из брюшной полости мыши, зараженной мокротой больного. Уже через четыре часа после заражения в экссудате обнаруживают чистую культуру пневмококков, дающую положительную агглютинацию по Сэбину.[11-17]

Ускоренные методы обнаружения и типирования пневмококков.

1. Метод Нойфельда или феномен набухания капсулы пневмококка. По одному комочку свежевыделенной мокроты больного наносят на три покровных стекла, к каждому из них прибавляют каплю неразведенной специфической антипневмококковой сыворотки (1, II, IIIтипов) и каплю синьки Лёффлера. Капли тщательно смешивают, покрывают предметным стеклом с лункой, смазанной по краям вазелином. Через две минуты рассматривают висячие капли под микроскопом с иммерсионной системой. При положительном случае видно резкое увеличение капсул пневмококков. При отрицательном результате капсулы едва заветны. Реакция набухания специфична и не даёт положительного результата с другими капсульными бактериями. Её не применяю г для исследования мокроты от больных, леченных сульфаниламидами и антибиотиками, т.к. в этом случае могут выделяться безкапсульные пневмококки. [11,15]

К преимуществам данной методики относится ее быстрота, а к недостаткам- необходимость выделения чистой культуры и недостаточная чувствительность( не все штаммы имеют капсулу) [23].

. Метод преципитации. 5-10 мл мокроты кипятят в водяной бане до получения плотного сгустка. Сгусток растирают и добавляют небольшое количество физиологического раствора, вновь кипятят несколько минут для извлечения специфического полисахарида из пневмококков. Взвесь центрифугируют, с полученной прозрачной жидкостью и специфическими типовыми сыворотками в преципитационных пробирках ставят реакцию кольцепреципитации. Появление кольца на границе соприкосновения жидкостей указывает на положительный результат[ 11,15].

. Определение капсул пневмококков по Бурри. На конец предметного стекла наносят каплю исследуемого материала и каплю туши. Смесь перемешивают и делают мазок, высушивают на воздухе и, не фиксируя, микроскопируют. Фон препарата - тёмно-дымчатый, микробные тела и их капсулы не окрашиваются. Препарат, изготовленный по Бурри, можно зафиксировать смесью Никифорова, промыть водой, окрасить фуксином Циля, разведенным 1:3 в течение 3-5 минут. На тёмном фоне мазка выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых находятся бактерии ярко малинового цвета (метод Гинса) [ 11,16].

Существуют также разработки выявления пневмококковых антигенов с помощью встречного иммуноэлектрофореза, иммунофлюоросцентного и иммуноферментного анализов. Хотя эти методы имеют определенные достоинства, их стоимость, трудоемкость и сравнительно низкая чувствительность и специфичность являются основными ограничениями к их широкому использованию в рутиной практике [23]. Методики выявления пневмококковых аутолизина и пневмолизина в клиническом материале с поощью ПЦР находятся на стадии разработки. В недавно опубликованном исследовании чувствительность ПЦР на аутолизин и пневмолизин составила, соответственно, 82% и 89%, а специфичность - 38% и 27% [23]. Вследствие низкой специфичности ПЦР, данный метод в настоящее время рассматривается только как перспективный, но требующий дальнейшего усовершенствования[23].

В последние годы все большую популярность приобретает иммунохроматографический экспресс-тест для выявления пневмококкового клеточного полисахарида (С- полисахарида) в моче. Он представляет собой нитроцеллюлозную мембрану с абсорбированными на ней кроличьими антипневмококковыми антителами и имеет диагностический порог 0.5 нг/ мл. Выполнение исследования занимает около 15 мин; чувствительность теста составляет 86% и специфичность- 94%. Ряд международных обществ уже рекомендует его в качестве дополнительного метода диагностики пневмококковой пневмонии [23].

Современные подходы к профилактике пневмококковых инфекций. В 1911 году группа А.Райта разработала неочищенную цельноклеточную пневмококковую вакцину, которая была использована для иммунизации золотоискателей в Южной Африке. Результаты показали некоторые снижение частоты пневмонии и летальных исходов от неё вакцинированных по сравнению с неиммунизированными лицами. После описания в 1923г. М.Хейдельбергом и О.Эвери полисахаридного строения капсулы, уже в 1927г. О.Шиманном и В.Каспером было установлено на животной модели, что введение пневмококковых полисахаридов стимулирует иммунитет. Позднее к 1945г. Стало возможно проведение С.Мак Леодом первого успешного клинического исследования тетравалентной пневмококковой вакцины в военном тренировочном лагере. Примерно в это же время в клиническую практику были внедрены антимикробные препараты, активные в отношении пневмококков, что привело к значительному улучшению исходов терапии.

Работы в области создания пневмококковых вакцин были приостановлены до клинического описания Р.Аустрианом и Дж.Голдом в 1964г. Не смотря на повышение выживаемости пациентов с пневмококковыми пневмониями летальность оставалось на уровне 25% при наличии бактериемии и была самой высокой у пожилых и лиц с хроническими заболеваниями. Непосредственным результатом этих исследований стало возобновление работ по разработке поливалентных полисахаридных пневмококковых вакцин, которые были оценены в двойных слепых, рандомизированных исследованиях у золотоикателей в Южной Африке. Их результаты подтвердили эффективность вакцинации для профилактики пневмонии, что привело к лицензированию в 1974г. 14-валентной вакцины, содержащей 50 мкг капсулярного полисахарида каждого серотипа, в неё входящего. В 1981г. Эта вакцина была заменена на 23-валентную, содержащую по 25 мкг очищенных капсулярных полисахаридных антигенов серотипов 1,2,3,4,5, 6B, 7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15B,17F,18C,19A,19F,20,22F,23F,33F,которая используется ив настоящее время. Пневмококки этих серотипов по данным эпидемиологических исследований в различных странах мира вызывают до 90% инвазивных инфекций у взрослых.

Пневмококковые капсулярные полисахаридные антигены стимулируют выработку сератипоспецифичных антител, которые, в свою очередь, повышают эффективность опсонизации, комплементзависимый фагоцитоз и разрушение пневмококков лейкоцитами и другими фагоцитирующими клетками. Концентрации этих антител начинают возрастать в течение первой недели после вакцинации и, для большинства входящих в вакцину антигенов, превышают допрививочные титры у здоровых взрослых в течение > 5 лет.

Иммунный ответ ко всем 23 серотипом входящим в вакцину, в значительной степени является вариабельным. Не смотря на то, что адекватный иммунный ответ на вакцину отмечается и у пациентов в возрасте ≥ 85 лет, её более низкая эффективность может быть связана с функциональными различиями антител у пожилых и более молодых лиц. Важная роль в иммунном ответе на полисахаридные антигены принадлежит и генетическим фактором. Клиническую значимость поствакцинальных титров антител сложно определить вследствие отсутствия четкого определения защитных уровней. Кроме того, при измерении концентрации антител не принимается во внимание функциональная активность антител. Лабораторные методы, оценивающие функциональность иммунного ответа, например, опсонофагоцитарную активность и разновидность антител, потенциально могут являться более значимыми и достоверными для оценки защищенности по сравнению с простым измерением уровня антител.

Постлицензионные эпидемиологические исследования подтвердили эффективность пневмококковых полисахаридных вакцин для профилактики инвазивных инфекций (бактериями и менингита) у пожилых лиц и пациентов  2 лет определенными хроническими заболеваниями.

На основании 25-летнего клинического опыта использования пневмококковые полисахаридные вакцины в целом считаются безопасными.

Согласно рекомендациям Комитета советников по иммунизационной практике (ACIP), вакцинация рекомендуется лицам ≥ 65 лет с высоким риском развития пневмококковых инфекций, а также от 2 до 64 лет с наличием определенных хронических заболеваний. Вакцинация также рекомендована лицам с неизвестным иммунизационным статусом.

Как отмечалось ранее, частота инвазивных пневмококковых инфекций является самой высокой у детей в возрасте до 2 лет. К сожалению, пневмококковая полисахаридная вакцина представляет собой Т-независимые антигены, и, как следствие, недостаточно стимулирует иммунный ответ у детей в этом возрасте.

Многообещающим альтернативным подходом к профилактике пневмококковых инфекций является разработка вакцин к некапсульным антигеном, общим для всех пневмококковых серотипов. Белковыми антигенами, используемыми для подобной цели, являются: нейраминидаза, аутолизин, пневмолизин, пневмококковые поверхностные протеины, А и С (PspA и PspC), пневмококковой поверхностной адгезин А (PsaA). Эти белки теоретически могут обеспечивать не только защиту против всех пневмококковых серотипов, но и приводить к стимуляции Т-зависимого ответа с развитием иммунологической памяти.

Таким образом, необходимо отметить, что в настоящее время существуют эффективные пути специфической профилактики инвазивных пневмококковых инфекций у взрослых и детей. Однако перед широким использованием полисахаридной вакцины в РФ, необходимо проведение многоцентровых эпидемиологических исследований по определению преобладающих серотипов пневмококков, вызывающих инвазивные и неинвазивные инфекции в различных регионах. Только такие результаты позволят определить возможную эффективность вакцин с точки зрения принципов доказательной медицины.

Эпидемиологический надзор за инвазивными пневмококковыми инфекциями - комплексное слежение за эпидемическим процессом на определенной территории и в конкретный период времени в целях организации профилактических, противоэпидемических и лечебных мероприятий. Эта работа осуществляется при совместном участии эпидемиологов, клиницистов, врачей-бактериологов, медицинских статистиков и организаторов здравоохранения.

Основными задачами эпидемиологического надзора за инвазивными пневмококковыми инфекциями являются оценка эпидемиологической ситуации, ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости инвазивными пневмококковыми инфекциями, создание условий для адекватного проспективного слежения за заболеваемостью пневмококковым менингитом и другими формами инвазивных пневмококковых инфекций; выработка рекомендаций для проведения наиболее рациональных мер борьбы с ИПИ. Поскольку наиболее радикальной мерой борьбы с инвазивными и неинвазивными пневмококковыми инфекциями, является вакцинопрофилактика, эпидемиологический надзор должен послужить основанием для решения вопроса о проведении вакцинопрофилактики, выборе места, времени и порядка ее проведения, и, в случае принятия решения, должен позволить контролировать изменение эпидемиологической ситуации в результате выполнения программ вакцинации.

Организация системы эпидемиологического надзора за инвазивными пневмококковыми инфекциями предусматривает понимание актуальности проблемы пневмококковых инфекций, клинических и эпидемиологических особенностей клиницистами и эпидемиологами, совершенствование диагностики ГБМ у детей, в том числе за счет внедрения некультуральных методов диагностики.

Санитарно-просветительные мероприятия в системе профилактики пневмококковой инфекции. Информирование специалистов о возможности и целесообразности вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции должно основываться на фактах и принципах, изложенных в данных методических рекомендациях, и осуществляться в различных формах и на различных уровнях: федеральном (организация научных конференций, секций на съездах и конгрессах, издание монографий и пособий, публикаций в медицинской периодике), региональном (проведение совещаний с участием специалистов различного профиля, проведение обучающих школ и семинаров для организаторов здравоохранения, бактериологов, инфекционистов, педиатров и иммунологов).

Рекомендуется усиление общих санитарно-просветительных и информационно-разъяснительных мероприятий, при которых родители получают информацию о пневмококковой инфекции и возможности ее вакцинопрофилактики непосредственно на приеме у врача-педиатра, а также через средства массовой информации, наглядные пособия и раздаваемые информационные материалы в детских поликлиниках и прививочных кабинетах. Должны быть разъяснены: общераспространенность пневмококковой инфекции, многообразие и тяжесть ее клинических проявлений; наличие возможности предотвращения заболевания пневмококковой инфекцией, безопасность и эффективность вакцинации, показания, противопоказания и схема применения пневмококковой вакцины. Следует довести до сведения родителей, что вероятность заболевания пневмококковой инфекцией повышена: у детей из многодетных семей, особенно если у новорожденного есть брат/сестра на 1-4 года старше; у детей, проживающих в общежитиях и/или коммунальных квартирах, особенно если совместно с новорожденным проживает ребенок на 1-4 года старше; у детей с хроническими заболеваниями, а также у часто и длительно болеющих детей и у детей с неврологически отягощенным фоном (родовая травма, гипертензионный и судорожный синдром, парезы, отставание в развитии) [5].

. Практическая часть

Для бактериологического исследования в качестве патологического материала я использовала музейный штамм S.pneumoniae.

Первый этап исследования.

Сделала мазок на предметное стекло и покрасила по Граму. В мазке обнаружила грамположительные ланцетовидной или овальной формы кокки, окруженные капсулой . Произвела посев материала на 5-10% кровяной и на среду обогащения (8-10% сывороточный бульон). Посевы инкубировала при 37 °С 24 часа.

Второй этап исследования. Изучила характер роста на питательной средах. На кровяном агаре колонии пневмококков мелкие, круглые, с ровными краями, нежные, окруженные зоной позеленения среды (что весьма напоминает рост зеленящих стрептококков). При бактериоскопии мазков, окрашенных по Граму, обнаружила грамположительные диплококки без капсул. После бактериоскопии колонии, подозрительные на пневмококки, пересеивают на скошенный сывороточный или кровяной агар. При микроскопии мазков со среды обогащения наряду с различной микрофлорой обнаружила грамположительные кокки, располагающиеся парами или короткими цепочками. Материал со среды обогащения пересеила на плотные питательные среды. Посевы инкубировла при 37°С 24 часа.

Третий этап исследования. На скошенном кровяном агаре пневмококки образовали нежный тонкий полупрозрачный налёт. На сывороточном бульоне пневмококки вызывали помутнение и легкий осадок. В мазках с плотных питательных сред пневмококки имели различный вид. Наряду с диплококками удлиненной формы с заостренными наружными концами, напоминающими пламя свечи, встретились клетки правильной овальной и круглой формы.

В бульонной культуре пневмококки часто располагаются цепочками. На основании морфологических и культуральных свойств пневмококки трудно отличить от зеленящих стрептококков, поэтому для их дифференцировки я выполнила набор специальных тестов:

•растворимость в желчи (дезоксихолатная проба);

•способность разлагать инулин;

•чувствительность к оптохину;

•реакция агглютинации со специфическими антипневмококковыми сыворотками;

•способность разлагать глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, маннит, сорбит и салицин.

Дезоксихолатная проба. Устойчивость к желчи также можно проверять посевом в 10% желчный бульон. В среду вносят исследуемый материал, при этом бульон мутнеет. После 24 часовой инкубации при 37 °С на наличие пневмококков укажет просветление бульона в результате лизиса бактерий.

Также можно использовать диски, пропитанные 20% раствором желчи. Диски помешают на выросшую культуру в чашке и инкубируют 1-2 часа при 37 °С. При наличии пневмококков колонии лизируются вокруг диска на расстоянии 1 -2 мм.

Проба на инулин. Культуру пневмококка засевают на среду с инулином. Для этого к 100 мл прогретой при 56 °С в течение 30 мин бычьей сыворотки прибавляют 200 мл стерильной дистиллированной воды, 18 мл лакмусовой настойки и 3 г инулина, стерилизуют текучим паром 30 минут. Посевы инкубируют при 37 °С 24 часа. Пневмококк разлагает инулин, в результате чего среда краснеет. Зеленящий стрептококк не вызывает покраснения среды.

Проба с оптохином. Испытуемую культуру пневмококка засевают на сывороточный бульон с оптохином в разведении 1:100000 или 1:200000. Пневмококк на такой среде не растёт. Также можно определить чувствительность к оптохину и посевом на 10% кровяной агар, содержащий оптохин в разведении 1:50000. Контролем является посев культуры на кровяной агар. Пневмококки не растут на среде с оптохином, на контрольной среде наблюдается рост пневмококков. Можно использовать диски, пропитанные 6 мкг оптохина, которые накладывают после посева на поверхность среды. У пневмококков вокруг диска образуется зона задержки роста не менее 18 мм диаметром.

Проба на вирулентность. Суточную культуру пневмококка, выращенную на сывороточном бульоне разводят 1% стерильной пептонной водой (рН - 7,6) или слабощелочным бульоном до 1:10. Разведённую культуру вводят внутрибрюшинно белым мышам весом 16-20 гр в объёме 0,5 мл и наблюдают в течение 72 часов. Из органов погибшей мыши делают высевы на питательные среды и микроскопируют мазки-отпечатки. К высоковирулентным культурам относят пневмококки, вызывающие гибель мышей после введения культуры в разведении 1:10. Авирулентные культуры не вызывают гибели мышей.

Выводы

. Распространённость бактерионосительства S.pneumoniae в городе Ханты-Мансийск с 2007 по 2014 гг.

. Выбрав в качестве исследования бактериологический метод, я пришла к выводу, что он наиболее информативный метод диагностики, он имеет такие преимущества, как невысокая стоимость, хорошая чувствительность и высокую достоверность результатов. Но не стоит пренебрегать и другими методами диагностики, например, иммунохроматографический тест представляется одним из наиболее перспективных.

Список литературы

1. Баранов А.А., Намазова Л.С., Таточенко В.К. «Пневмококковая инфекция и связанные с ней заболевания серьёзная проблема современного здравоохранения» // Педиатрическая фармакология. -2008.-Т.5,№1 -С.2-7.

. Баранов А.А., Таточенко В.К., Намазова Л.С. Нужно ли защищать детей от пневмококковой инфекции? // Вопр. современ. педиатрии.-2008.-Т.7, №1.-С.13-16.

. Брико Н.И., Ещина A.C., Ряпис JI.A. Лабораторная диагностика стрептококковых инфекций: пособие для врачей и научных работников.-М.: Экоплан, 1998. 15с.

. Белошицкий Г.В. Эпидемиологическая характеристика пневмококковых менингитов: Автореф. дис.... канд. мед. наук. - М., 2005. - 24 с.

. Белошицкий Г.В., Королева И.С., Кошкина Н.И. Пневмококковые менингиты в Российской Федерации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2009- №21 -с. 6-10.

. Геппе Н.А., Малахов А.Б. Пневмококковая инфекция респираторной системы в детском возрасте. Практическое руководство для врачей.-М.: Медицина, 2005.-120с.

. Гланц С. Медико-биологическая статистика.-М.:Практика, 1999.-459 с.

. Гольдштейн А.В. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции // Вакцинация.-2004.-№2 (32).-С.10-11.

. Гучев И.А., Клочков О.И. Антибиотикопрофилактика вспышек внебольничной пневмонии в гомогенной популяции// Качественная клиническая практика.- 2003.-№1.-С.24-29.

. Иващук В.В. Особенности стрептококковых инфекций верхних дыхательных путей у детей: дис.канд. мед. наук / Иващук Владимир Владимирович.-Владивосток, 2003.-23 с.

. Кречикова О.И., Козлов Р.С., Богданович Т.М. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам Streptococcus pneumoniae (методические рекомендации)//Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.- 2000.-Т.2,№2.- С. 88-98.

. Козлов Р.С. Пневмококки: прошлое, настоящее и будущее. Смоленск:Смоленская государственная медицинская академия,2005-128 с.

. Козлов Р.С. с соавт. Антибиотикорезистентность Streptococcus pneumoniae в России в 1999-2005 гг: результаты многоцентровых проспективных исследований ПеГАС-I и ПеГАС-II. // КМАХ, 2006, том 8, №1.

. Конъюгированная пневмококковая вакцина для иммунизации детей - рекомендации ВОЗ. // Педиатрическая фармакология 2007, т.4 - №5 - с.1 -3.

. Козлов Р.С., Чагарян А.Н., Козлова Л.В., Муравьев А.А. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей в возрасте до 5 лет в отдельных регионах Российской Федерации. Клин микробиол и антимикроб химиотер 2011; 2: 177-187.

. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Катосова Л.К., Гречуха Т.А., Пинелис В.Г., Намазова-Баранова Л.С. Вопросы диагностики в педиатрии, 2010, №6, с.6-10

. Мельникова А.А., Королева И.С., Белошицкий Г.В. Актуальные проблемы пневмококковой инфекции. // Ремедиум 2009. - август-сентярь - с. 18 - 20

. Макинтош Д. Д. Международный опыт применения 7-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины // Педиатрическая фармакология 2009 - т.6 - №2 - с. 8 - 10

. Миронов О.К., Платонов А.Е., Козлов Р.С. Идентификация и серотипирование российских штаммов Streptococcus pneumoniae с применением методик, основанных на ПЦР. Клин микробиол и антимикроб химиотер 2011; 4: 304-313.

. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Катосова Л.К., Гречуха Т.А. Определение капсульных серотипов пневмококка методом мультиплексной ПЦР. Вопр диагн педиатр 2010; 6: 6-10.

. Очкасов А.В. Рациональная антибактериальная терапия тяжелых форм острых средних гнойных отитов у детей: Автореф. дис. … канд. мед. наук. М 2006.

. Рекомендации расширенного заседания Совета экспертов на тему «Бремя пневмококковых заболеваний в России», ВСП, 2009,Т.8, №2

. Сидоренко С.В., Лобзин Ю.В., Харит С.М., Королева И.С., Таточенко В.К. Пневмококковая инфекция и современные возможности ее профилактики - эпидемиологический обзор ситуации в мире и в России.// Вопросы современной терапии 2010, т.9 - №1 - с. 54 - 61

. Таточенко В.К. Клинические проявления пневмококковой инфекции в разных возрастных группах. Бюллетень "Вакцинация" 2009; 2: 3-7.

. Учайкин В.Ф., Шамшева О.В., Пневмококковая инфекция. Руководство по клинической вакцинологии, Москва, 2006.

. Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А. Микробиология.-М:Альянс,2012.-512с.,ил.

. Чучалин А.Г. Предисловие//Пневмония. Под ред. Чучалина А.Г., Синопальникова А.И., Черняховский Н.Е.- М.:Экономика и информация,2002, с.7-8.

. Эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекции, вызываемой Streptococcus pneumoniae: методические рекомендации 3.3.1.0027-11. М: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 2011.

Приложение

Таблица №1. Биохимические свойства пневмококков

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Тест-субстрат | Результат | Тест-субстрат | Результат |
| Рост при 100° С | - | Лактоза | + |
| 45" С | - | Маннит | (-) |
| РН 9.6 | - | Раффиноза | + |
| Среда с 6,5% Nad | - | Рибоза | - |
| 40% желчь | - | Салицин | - |
| а-гемолиз | + | Сорбит | - |
| В-гемолиз | (-) | Трегалоза | + |
| Аргинин | (+) | Фосфатаза | - |
| Гиппурат | - | в-галактозидаза | d |
| Эскулин | D | VP | - |
| Инулин | D | Адонит | - |
| Глицерин | - |  |  |
| Инозит | - |  |  |
| Обозначения: «+» - 90% или более штаммов положительные; (+) - 80-89% штаммов положительные; d- 21-79% штаммов положительные; (-) - 11-20% штаммов положительные; «- - 90% или более штаммов отрицательные. |

Таблица № 2.Количество случаев обнаружения пневмококка в г. Ханты-Мансийск с 2007 по 2014 гг.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1 | Биологический материал | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 |
| 2 | Кровь  | 10 | 7 | 10 | 8 | 2 | 3 | 5 | 4 |
| 3 | Мокрота | 48 | 18 | 48 | 17 | 8 | 31 | 30 | 41 |
| 4 | Моча | 1 | - | 1 | 2 | - | 1 | 6 | - |
| 5 | Зев  | 3 | 61 | 3 | 19 | 5 | 12 | 4 | 7 |
| 6 | Нос | - | 2 | - | - | - | - | 2 | 1 |
| 7 | Ухо | 1 | - | 1 | - | - | - | 2 | - |
| 8 | Гинеколог. мазки | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 |
| 9 | Рана | - | 3 | - | 2 | - | 3 | - | 1 |
| 10 | Глаз | 2 | 3 | 2 | - | 2 | 3 | - | 2 |
| 11 | Секц.материал | 3 | - | 3 | - | - | - | - | 1 |
| 12 | Плевр.жидкость | - | 1 | - | - | - | - | 2 | - |
| 13 | Рвотн.массы | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | Пром.воды бронхов | - | 5 | - | 5 | 2 | 7 | 3 | 10 |
| 15 | Сок простаты | - | - | - | - | 3 | - | 1 | - |
| 16 | Ликвор  | - | - | - | 2 | 4 | 1 | 2 |  |
| 17 | ВСЕГО | 70 | 101 | 70 | 56 | 27 | 65 | 57 | 68 |



Таблица № 3. Дифференцированная антибактериальная терапия инвазивной пневмококковой инфекции с учетом вероятности резистентных S.pneumoniae.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показание или условие | Комбинация препаратов | Примечание |
| Менингит, эмпирическая терапия |
| В ликворе грамположительные диплококки | Цефтриаксон 2 г внутривенно через 12 ч или цефотаксим 2 г внутривенно через 4-6 ч + ванкомицин 15 мг/кг внутривенно через 6-12 ч 1 | При тяжелой аллергии на бета-лактамы: ванкомицин + рифампицин 600 мг внутривенно 1 раз в сутки Рекомендуется к основной комбинации добавлять дексаметазон 0,4 мг/кг внутривенно через 6 ч в течение 2 сут 2 |
| Менингит, целенаправленная терапия |
| МПК пенициллина < 0,1 мкг/мл | Пенициллин 4 млн ЕД внутривенно через 4 ч | При тяжелой аллергии на бета-лактамы: ванкомицин 15 мг/кг внутривенно через 6-12 ч + рифампицин 600 мг внутривенно 1 раз в сутки |
| МПК пенициллина > 1,0 мкг/мл или МПК цефтриаксона >0,5 мкг/мл | Дети: цефтриаксон 100 мг/кг внутривенно через 6 ч или цефотаксим 50-75 мг/кг через 6 ч + ванкомицин 15 мг/кг внутривенно через 6 ч 3 Взрослые: цефтриаксон 2 г внутривенно через 12 ч или цефотаксим 2 г внутривенно через 6 ч + ванкомицин 15 мг/кг внутривенно через 6 ч | Рекомендуется к основной комбинации добавлять дексаметазон 0,4 мг/кг внутривенно через 6 ч в течение 2 сут Рекомендуется к основной комбинации добавлять дексаметазон 0,4 мг/кг внутривенно через 6 ч в течение 2 сут |
| Бактериемия, эмпирическая терапия |
| Клинические данные характерные для грамположительной инфекции и наличие факторов риска инфекции S.pneumоniae | Цефотаксим 50 мг/кг внутривенно через 6 ч или цефтриаксон 100 мг/кг внутривенно 1 раз в сутки или цефуроксим 50 мг /кг внутривенно через 8 ч |  |
| Бактериемия, целенаправленная терапия |
| МПК пенициллина < 0,1 мкг/мл | Пенициллин 4 млн ЕД внутривенно через 6 ч | Ампициллин, амоксициллин |
| МПК пенициллина > 2,0 мкг/мл | Ванкомицин 15 мг/кг внутривенно через 6-12 ч + рифампицин 600 мг внутривенно 1 раз в сутки | Новые хинолоны, линезолид, хинупристин/дальфопристин |
| 1 Низкое или непредсказуемое проникновение ванкомицина в ликвор. Поэтому рекомендуется доза 15 мг/кг внутривенно через 6 ч. Имеется ограниченный клинический опыт применения этой дозы (в 2 раза превышающей обычную). Однако в регионах с высокой вероятностью развития инфекции, вызванной резистентным к пенициллину пневмококком, эмпирическое применение ванкомицина оправдано. 2 Дексаметазон не снижает проникновение ванкомицина в ликвор у детей. Целесообразность применения дексазона у взрослых подтверждается результатами экспериментальных работ. 3 При экспериментальном пневмококковом менингите показан синергидный эффект комбинации ванкомицина и цефтриаксона даже у пневмококков с высокой МПК цефтриаксона. Клинический опыт меропенема пока недостаточен для формулирования определенных рекомендаций.  |