

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ПНЕВМОКОККОВОЙ ЭТИОЛОГИИ

Г.Т. МАХКАМОВА, Э.А. ШАМАНСУРОВА

Ташкентский педиатрический медицинский институт, Республика Узбекистан, г. Ташкент

ПНЕВМОКОКК ЭТИОЛОГИЯЛИ КАСАЛЛИКЛАРНИ ЛАБОРАТОР ДИАГНОСТИКАСИ

Г.Т. МАХКАМОВА, Э.А. ШАМАНСУРОВА

Тошкент педиатрия медицина институти, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент

LABORATORY DIAGNOSIS OF PNEUMOCOCCAL DISEASES

G.T. MAHKAMOVA, E.A. SHAMANSUROVA

Tashkent Pediatric Medical Institute, Republic of Uzbekistan, Tashkent

По данным ВОЗ пневмококковая инфекция – самая частая из бактериальных инфекций у человека – ежегодно приводит к смерти 1,6 миллиона человек, в том числе от 0,7 до 1 млн. детей, что составляет 40% смертности детей первых 5 лет жизни [1,2,9,11,12,14].

Пневмококки – наиболее частые возбудители целого ряда болезней органов дыхания: пневмонии, бронхита, трахеита, обострений хронических обструктивных заболеваний легких (ХОЗЛ), ЛОР-органов (синусита, острого среднего отита), а также некоторых опасных инфекций (менингита, перитонита, сепсиса). Большинство этих заболеваний требуют госпитализации ввиду их тяжелого течения и риска летального исхода [5,6,15].

Streptococcus pneumoniae или пневмококк, который (согласно «Определителю бактерий Берджи») входит в состав рода *Streptococcus* (группа стрептококков ротовой полости), включенного в 17-ю группу «Грамположительные кокки».

На плотных питательных средах растут в виде мелких, прозрачных, не склонных к сливанию колоний. На средах с кровью колонии пневмококков окружены зоной альфа-гемолиза (по классификации Браун) серовато-зеленого цвета, вследствие разрушения эритроцитов и превращения гемоглобина в метгемоглобин. Колонии склонны к аутолизу, что связано с активностью внутриклеточных ферментов.

Капсулы пневмококков являются основным фактором вирулентности, защищающим микроб от опсонизации и последующего фагоцитоза. Некапсулированные штаммы авирулентны. Среди других факторов патогенности наибольшее значение имеет уровень активности гиалуронидазы, пневмолизина, гемолизина и др.

На выявлении специфического набухания капсулы возбудителя основана экспресс-диагностика пневмококков в патологическом материале с использованием поливалентной иммунной сыворотки (реакция Нейфельда). После нанесения поливалентной сыворотки на исследуемый материал при микроскопии отмечают значительное увеличение капсулы пневмококков по сравнению с контролем.

По капсульному антигену также проводят типоспецифическую дифференцировку пневмо-

кокков, которых насчитывают не менее 90 серотипов. Серотиповой пейзаж возбудителя зависит от географической области, климатических условий, возраста больных, вида патологии и со временем может меняться. Выявление особенностей циркуляции пневмококков позволяет значительно снизить заболеваемость пневмококковой инфекцией за счет вакцинопрофилактики групп риска [9,10].

Диагностику пневмококковых менингитов проводят согласно общей схеме исследования материала. Идентификацию пневмококков выполняют по следующим тестам:

- обнаружение в нативном материале (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;
- выявление специфического антигена в реакции латекс-агглютинации (экспресс-метод) [4].

Золотым стандартом микробиологической диагностики пневмококковой инфекции является выделение пневмококка из стерильных жидкостей организма (спинно-мозговая жидкость, кровь) – при диагностике инвазивных пневмококковых инфекций и других сред (мокрота, жидкость из полости среднего уха, задняя стенка носоглотки и др.) – при неинвазивных заболеваниях.

Для выделения культуры *Str. pneumoniae* требуются специальные питательные среды с высоким содержанием аминного азота и нативного белка животного происхождения (дефибринированная кровь, сыворотка животных), pH среды 7,0 – 7,8 и инкубация в атмосфере с повышенным содержанием диоксида углерода при температуре 35–37°C. Идентификация возбудителя проводится по характерному росту на средах с кровью (наличие α-гемолиза вокруг колоний), положительных тестов с оптохином и желчными кислотами [4,13].

Скорость получения результатов и чувствительность бактериологического метода являются сравнительно невысокими, в связи с чем разрабатываются и применяются новые диагностические

подходы, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и различные серологические тесты.

Серологическим методом идентификации пневмококков является реакция набухания капсулы при взаимодействии капсулы микробной клетки со специфической сывороткой, содержащей поликлональные антикапсулярные антитела (тест Нейльфида).

Для определения пневмококковых антигенов в крови и ликворе применяется метод латекс агглютинации, который обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Разработаны методики определения пневмококка в клиническом материале с помощью ПЦР, основанные на выявлении фрагментов специфических генов кодирующих ферменты аутолизин (lytA), пневмолизин (ply), поверхностные белки клеточной стенки (PspA, PsaA) и др.

Высокой чувствительностью и специфичностью обладает иммунохроматографический тест для выявления антигена пневмококка в спинномозговой жидкости и моче [14].

Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики и особенности интерпретации их результатов. Микроскопические исследования используют для выявления пневмококков в разных видах биологического материала: мокроте, плевральной жидкости, отделяемом из уха, придаточных пазух, СМЖ, крови. Диагностическая ценность обнаружения в мазке мокроты диплококков «сходных с пневмококками» до сих пор остается дискуссионной.

При наличии роста на чашках проводится обязательная количественная оценка бактериального роста и выделение чистой культуры предполагаемого возбудителя для дальнейшей идентификации.

Для определения чувствительности к антибиотикам используются несколько методов [7, 15].

Метод серийных разведений в бульоне или агаре. Принцип метода основан на оценке чувствительности возбудителя к серии последовательных разведений тестируемого антибиотика. При этом определяется точное значение минимальной подавляющей концентрации (МПК) препарата для микроорганизма. Однако из-за значительной трудоемкости, метод используется преимущественно в научных лабораториях. Более широкое применение получил модифицированный метод серийных разведений, основанный на использовании пограничных концентраций антибиотика, который не дает точного определения МПК препарата для возбудителя, но позволяет оценить его принадлежность к чувствительным (S), промежуточно устойчивым (I) или резистентным (R) штаммам. Большинство готовых наборов реагентов используют именно этот принцип.

Диско-диффузионный метод – основан на оценке диаметра зоны подавления роста вокруг бумажного диска с антибиотиком, наложенного на растущую на плотной питательной среде культуру исследуемого микроорганизма. Образование зоны ингибирования роста происходит за счет диффузии антибактериального препарата из носителя (диска) в питательную среду, при которой величина диаметра ингибирования роста жестко связана с величиной МПК. Метод не определяет точное значение минимальной подавляющей концентрации антибиотика для микроорганизма, а только позволяет отнести его к одной из категорий чувствительности (S, I, R).

Метод эпилотрии (Е-тест) – в качестве носителя используется полоска полимера, пропитанная различными концентрациями антибиотика, с нанесенными на нее значениями таких концентраций. Интерпретации результатов выполняют в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

Для обнаружения АГ пневмококка в пробах биологических жидкостей пациента применяют методы латекс-агглютинации и ИХА. Чувствительность и специфичность наборов разных производителей составляет 94–100% и 85–98%, соответственно. Для обнаружения специфических генетических фрагментов пневмококка применяют ПЦР, 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 патогена с сохранением высокой чувствительности реакции.

Остается проблемой установление диагностически значимых количественных показателей, позволяющих дифференцировать заболевание от носительства при исследовании материала из нестерильных локусов.

Метод исследования продуктов АНК при мультилокусном секвенировании-типировании для генетического типирования пневмококков основан на секвенировании внутренних фрагментов семи генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes), специфичных для возбудителя. Метод чаще используется для генетического типирования пневмококка, чем для идентификации.

Обнаружение АТ редко используются при проведении лабораторной диагностики пневмококковой инфекции. Это связано с отсутствием надежных доступных методик, имеющих доста-

точную чувствительность и специфичность и роль временного фактора, поскольку для выявления роста титров АТ необходимо значительное время от начала заболевания. В настоящий момент используются определения АТ против четырех АГ пневмококка (С-антигена, капсульных полисахаридов, фосфорилхолина и пневмолизина). Чувствительность метода для С-антигена и капсульных полисахаридов составляет 89% и 97% соответственно. Наиболее распространенные методы определения – ИФА и РИФ (МФА). При применении МФА в качестве АГ рекомендуется использовать аутоштамм пневмококка, выделенный от данного больного. В случае отсутствия аутоштамма применяют смесь штаммов из наиболее часто встречающихся на данной территории серотипов.

Таким образом, диагностика пневмококковой инфекции является трудоёмкой задачей. Выделение, и особенно, идентификация этого микроорганизма сопряжены со значительными трудностями, связанными с отсутствием тест систем и препаратов для идентификации и дифференциальной диагностики, циркуляцией штаммов, нечувствительных к стандартным тестам идентификации близкородственных видов. Разработка экспресс методов диагностики является насущной проблемой как микробиологии, так и медицины в целом.

Литература:

1. Белошицкий Г. В., Королева И. С., Кошкина Н. И. Пневмококковые менингиты в Российской Федерации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009 - №21. – С. 6-10.
2. Козлов Р. С. Пневмококки: прошлое, настоящее и будущее. – Смоленск: Смоленская государственная медицинская академия, 2005. – 128 с.
3. Козлов Р. С. с соавт. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pneumoniae* в России : результаты многоцентровых проспективных исследований ПеГАС-I и ПеГАС-II. // КМАХ. – 2006. – Т.8, №1. – С. 26-31.
4. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005.—48 с.
5. 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
6. Мельникова А. А., Королева И. С., Белошицкий Г. В. Актуальные проблемы пневмококковой инфекции. // Ремедиум. - 2009. – С.15-19.
7. Практические рекомендации «Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*» под редакцией Л. С. Страчунского // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия – 2000 – том 2 - №1 – С. 88 – 98
8. Рекомендации расширенного заседания Совета экспертов на тему «Бремя пневмококковых заболеваний в России». - ВСП, 2009. - Т.8. - №2. – С. 23
9. 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
10. Учайкин В. Ф., Шамшева О. В., Пневмококковая инфекция. Руководство по клинической вакцинологии. - Москва, 2006
11. Black R. E., Cousens S, Johnson HL et al. Global, regional and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. // Lancet 2010. – V.375. – P. 26-31
12. Ishiwada N, Kurosaki T, Terashima I, Kohno Y. The incidence of pediatric invasive pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan (2003 – 2005) // Journal of Infection 2008. – V. 359. – P. 254-258
13. Kaijalanen T, Kharit S. M., Kvetnaya A. S. et al. Invasive infectious diseases caused by *Neisseria meningitidis*, *Hemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* among children in St Petersburg. // Clin Microbiol Infect 2008. – V. 14. – P. 507-510
14. Klugman KP, Madhi SA, Albrich WC. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community-acquired pneumonia. // Clin Infect Dis. – 2008. – V.47(Suppl 3). – S.202–206.
15. Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae* // Clinical Microbiology and Infection. – 2009. - V.15(s3). – P.7-11.