

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Харківський національний медичний університет

МОДУЛЬ 3
Частина 1
ПАТОГЕННІ КОКИ

Методичні вказівки
з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія
та імунологія з мікробіологічною діагностикою"
до практичних занять
для студентів-бакалаврів III–IV курсів
за спеціальністю
"Лабораторна діагностика"

Затверджено
вченою радою ХНМУ.
Протокол № 8 від 19.09.2013.

Харків
ХНМУ
2014

Модуль 3. Частина 1. Патогенні коки : метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсів за спеціальністю "Лабораторна діагностика" / упор. В.В. Мінухін, Н.І. Коваленко, Т.М. Замазій. – Харків : ХНМУ, 2014. – 56 с.

Упорядники В.В. Мінухін
 Н.І. Коваленко
 Т.М. Замазій

Тема: Лабораторна діагностика хвороб, спричинених патогенними коками (стафілококи)

Кількість годин: 4.

Обґрунтування теми. Патогенні коки спричинюють переважно гнійно-запальні процеси, тому їх називають гноєтворними (піогенними). Від хвороб, що супроводжуються гнійно-запальними процесами, кожного року страждають мільйони людей. Однією з причин цього є наявність великої кількості збудників – коків, ентеробактерій (ешерихії, протей, клебсієли та ін.), псевдомонад (синьогнійна паличка), бактероїдів. Однак 70–80 % захворювань спричинюють коки як окремо, так і в асоціаціях з іншими мікроорганізмами.

Гнійно-запальні процеси обумовлюються як патогенними, так і умовно-патогенними коками, що входять до складу нормальної мікрофлори людини, тому здатні зумовлювати екзогенні й ендогенні інфекції. Часто коки є причиною внутрішньолікарняних інфекцій. Особливу загрозу вони становлять у хірургічних стаціонарах, опікових, дитячих лікарнях, а також у пологових будинках.

Мета заняття

– загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою хвороб, спричинених стафілококами.

– конкретна:

а) знати правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599);

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.
2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.
3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на інфекцію, обумовлену патогенними коками.
4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на інфекцію, обумовлену патогенними коками.
5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення патогенних коків.
6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення: музейні мікропрепарати, поживні середовища (ЖСА, КА, цукровий бульйон, середовище Гісса, МПА), патогенний матеріал, бланки направлень, бікс, шпатель для посіву, сірники, маркер, штативи, ріст культури стафілокока на КА, ЖСА, середовищі з манітом, пластинчастому середовищі з паперовими дисками, просякнутими антибіотиками, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

Зміст заняття. Представники родини *Micrococcaceae* *Staphylococcaceae*, що здатні спричиняти захворювання людей, належать до родів *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus*. Мікрококи і стоматококи входять до

складу нормальної мікрофлори слизових оболонок порожнини рота і дихальних шляхів. Інколи в ослабленому організмі вони спричиняють внутрішньолікарняні захворювання (сепсис, бактеріємію) у разі використання забруднених ін'єкційних голок, судинних катетерів. Патогенні бактерії належать до роду *Staphylococcus*.

Таксономія

Родина: *Micrococcaceae*

Рід: *Staphylococcus*

Вид: *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*.

Рід *Staphylococcus* об'єднує 56 видів. За здатністю утворювати плазмокоагулазу стафілококи поділяють на 2 групи: коагулазопозитивні й коагулазонегативні. До коагулазопозитивних відносять *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*; до коагулазонегативних – *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis* та ін. На шкірі та слизових оболонках тіла людей виявляють 14 видів стафілококів, серед яких патогенними є переважно коагулазопозитивні.

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Стафілококи мають геометрично правильну кулясту форму клітин 0,5–1,5 мкм у діаметрі, не утворюють спор, деякі види утворюють капсулу, нерухливі, грампозитивні. У мікропрепаратах здебільшого розміщуються безладно або у вигляді грона винограду.

Культуральні властивості. Стафілококи не вибагливі до поживних середовищ і умов культивування. Вони ростуть на МПА і МПБ. Оптимальними умовами культивування є температура 35–40 °С, рН 7,2–7,4. Стафілококи – факультативні анаероби.

Селективними поживними середовищами є жовтково-сольовий агар (ЖСА) Чистовича, молочно-сольовий агар (МСА) Петровича, середовище Байд-Паркер і сольовий бульйон. Ці середовища містять 8–10 % натрію хлориду, який пригнічує ріст сторонньої мікрофлори. Стафілококи добре ростуть також на середовищах із кров'ю.

На кров'яному агарі вони утворюють зону бета-гемолізу. На середовищі ЖСА утворюються круглі каламутні колонії, забарвлені в молочно-білий, помаранчевий, жовтий або кремовий колір, із рівним краєм, навколо колоній стафілокока утворюється зона лецитинази (лецитовітелаз) – райдужний вінчик, на МСА легко утворюються пігменти, на середовищі Байд-Паркер колонії стафілокока мають чорний колір із райдужним вінчиком. Утворення пігменту відбувається за наявності кисню, найбільш виражене на середовищах, що містять кров, вуглеводи, молоко. Пігментоутворення не є видовою ознакою.

На бульйоні ріст стафілококів характеризується помутнінням і утворенням пухкого осаду.

Ферментативні властивості. Стафілококи продукують каталазу, сахаролітичні, протеолітичні ферменти, плазмокоагулазу, фібринолізин, гіалуронідазу та ін.

Завдяки сахаролітичним ферментам стафілококи розщеплюють вуглеводи (лактозу, глюкозу, маніт, мальтозу, сахарозу, гліцерин тощо) до кислоти і газу. Більшість штамів утворюють ацетон на середовищі з глюкозою (позитивна реакція Фогеса-Проскауера). Відновлюють нітрати до нітритів. Стафілококи в основному оксидазонегативні. Завдяки протеолітичним ферментам вони розщеплюють казеїн, розріджують желатин, утворюють сірководень. Ескулін і крохмаль не утилізують, індол не утворюють.

Родовою ознакою є ферментація глюкози в анаеробних умовах з утворенням кислоти, що відрізняє стафілококи від мікрококів.

Антигенні властивості. У стафілококів розрізняють родові, видові й типоспецифічні антигени. Відомо понад 30 антигенів. До видових належать протеїновий антиген А, який здатний зв'язуватись з Fc-фрагментом IgG, що призводить до порушення імунітету. Окремі штами *S. aureus* розрізняються за чутливістю до стафілококових фагів, що має важливе епідеміологічне значення.

Резистентність. Стафілококи стійкі в навколишньому середовищі, тому їх постійно виявляють у повітрі, ґрунті, воді, на предметах побуту. Стафілококи є санітарно-показовою мікрофлорою для повітря в лікувальних установах. Серед аспорогенних бактерій, поряд із мікобактеріями, стафілококи найстійкіші до висушування, місяцями зберігають життєздатність і вірулентність у висушеному аерозолі. Пряме сонячне світло діє на них згубно протягом 10–12 год, сухий жар (110 °С) – протягом 2 год, 150 °С – 10 хв. Чутливі до дії антисептиків та дезінфектантів, які звичайно використовують, але резистентні до дії 96 % етилового спирту. Нерідко мають множинну лікарську стійкість до ряду антибіотиків, зокрема до бета-лактамних, особливо госпітальні штами.

Фактори патогенності. Стафілококи мають великий арсенал факторів патогенності:

– Фактори адгезії – тейхоєві кислоти, білок А.

– Ферменти агресії і захисту: плазмокоагулаза (основний фактор патогенності), гіалуронідаза, фібринолізин, лецитиназа, каталаза, ліпаза, ДНКаза, фосфатаза, протеїназа, β-лактамаза, та ін. Фермент лецитиназа руйнує мембрани клітин макроорганізму. Ферменти фібринолізин і гіалуронідаза зумовлюють високу інвазивність стафілокока, плазмокоагулаза перетворює протромбін на тромбін, який спричинює зсідання фібриногену, завдяки чому стафілококи вкриваються білковою плівкою, яка захищає їх від фагоцитозу.

– Комплекс екзотоксинів:

1) мембранопшкоджуючі екзотоксини (гемолізینی) руйнують мембрани еритроцитів, лейкоцитів, макрофагів, тромбоцитів та інших клітин;

2) ексфоліатини А і В, з якими пов'язана здатність стафілокока спричинювати пухирчатку у немовлят, синдром "ошпареної шкіри", бульозне імпетиго (від лат. *impeto* – уражати) – гостре запалення шкіри, скарлатиноподібний висип;

3) лейкоцидин вибірково руйнує лейкоцити;

4) токсин синдрому токсичного шоку спричинює підвищення температури тіла, зниження артеріального тиску і розвиток шоку, висипання на шкірі зі злуцненням епітелію на кистях і ступнях, інколи діарею, ураження нирок; цей токсин здатні продукувати більше ніж 50 % штамів *S. aureus*.

– Фактори, що пригнічують фагоцитоз (мікрокапсула, білок А, пептидоглікан, тейхосеві кислоти, токсини), порушують процесинг і активацію Т- і В-лімфоцитів, що пригнічує силу імунної відповіді.

– Ентеротоксини – мають властивості суперантигенів, спричиняють харчову інтоксикацію.

Стафілококи мають перехресно реагуючі антигени до тканин нирок, шкіри, до антигенів еритроцитів А і В, що призводить до аутоімунних хвороб.

Багато компонентів мікробних клітин та їх метаболіти проявляють сенсibiliзуючу дію, яка являється реакціями уповільненого і негайного типу. У зв'язку з цим стафілококи є причиною шкірних і респіраторних алергій (дерматитів, бронхіальної астми).

Епідеміологія. Стафілококи є умовно-патогенними мікроорганізмами та представниками нормальної мікрофлори людини і тварин. Колонізують різні біотопи організму людини: шкіру, слизову оболонку носа, зів, ротової порожнини та ін. Особливо багато стафілококів на шкірних покривах, де вони є домінуючою мікрофлорою, особливо *S. epidermidis*. Спричиняють опортуністичну інфекцію у імуноскомпроментованих осіб.

Джерелом збудника стафілококової інфекції є хворі люди зі стертими формами захворювання або здорові носії, особливо при харчових стафілококових отруєннях і ентероколітах, а також при внутрішньолікарняних спалахах. Значно рідше зустрічаються хворі тварини, наприклад, хворі на мастит корови. Найбільшу епідеміологічну небезпеку становить медичний персонал лікувально-профілактичних закладів, який може бути носієм шпитальних штамів стафілококів.

Оскільки стафілококи, як і інші умовно-патогенні мікроорганізми не мають органного тропізму, при стафілококових інфекціях відмічається багато механізмів, шляхів і факторів передачі. Шлях передачі може бути контактним, наприклад через нестерильний медичний інструмент, руки медперсоналу, аліментарним – з молочними продуктами, кондитерськими виробами (тістечками, кремами та ін.), аерогенним, парентеральним – при ін'єкціях, з судинними катетерами та ін.

Сприйнятливість до стафілококу дуже низька в осіб із нормальним імунним статусом і підвищена у імуноскомпроментованих осіб. Часто інфекція розвивається на фоні вторинних імунодефіцитів, наприклад після перенесеної ГРВІ. Стафілококова інфекція може розвиватися як ендогенна інфекція, оскільки постійно збудник є на шкірі й слизових оболонках у складі нормальної мікрофлори.

Патогенез і клінічна картина. Стафілококи легко проникають до організму навіть через дуже дрібні пошкодження шкіри та слизових оболонок і призводять до найрізноманітніших хвороб – від імпетиго до перитоніту, ендокардиту, сепсису, летальність при яких сягає 80 %. Патогенез захворювання зумовлюють фактори вірулентності мікроорганізму, стан імунної системи макроорганізму, наявність розвитку гіперчутливості та ін. Функціональна недостатність імунної системи та низький рівень IgA у слизовій оболонці верхніх дихальних шляхів зумовлюють тимчасове або постійне стафілококове бактеріоносійство.

Найбільш патогенним є *S. aureus*. Стафілококи можуть спричинювати понад 120 нозологічних форм. Найчастіше трапляються локалізовані гнійно-запальні захворювання шкіри, підшкірної основи, слизових оболонок, лімфатичних вузлів тощо: фурункул (гнійне запалення волосяного мішечка та сальної залози); карбункул (гнійне запалення глибоких шарів шкіри та підшкірної основи навколо групи фурункулів); фолікуліт (гнійне запалення волосяних мішечків); мастит; флегмона (гнійне запалення клітковини без чітких меж); абсцес (обмежене накопичення гною в тканинах та органах унаслідок їх запалення і розплавлення тканин з утворенням порожнини); панарицій (гнійне запалення тканин пальців); лімфаденіт; піодермія (гнійне запалення шкіри – імпетиго, фурункул, фолікуліт); бронхіт (запалення стінки бронхів); пневмонія; плеврит; отит; ангіна (запалення мигдаликів); гайморит (запалення слизової оболонки, а іноді й кісткових стінок верхньощелепної (гайморової) пазухи; кон'юнктивіт; менінгіт – гнійне запалення оболонок головного та спинного мозку; ендокардит (запалення внутрішньої оболонки серця, часто з ураженням серцевих клапанів, що призводить до розвитку вад серця); холецистит; цистит; уретрит (запалення уретри – сечівника); остеомієліт (запалення кістки та кісткового мозку); артрит; ентероколіт (запалення товстої та тонкої кишки); перитоніт (запалення очеревини); апендицит (запалення червоподібного відростка); пієлонефрит (гнійне запалення ниркових клубочків).

Маючи алергізуючі властивості, стафілококи можуть спричинювати геморагічний васкуліт (геморагічний висип на шкірі внаслідок порушення проникності стінок кровоносних судин), неспецифічний поліартрит. Будь-який локалізований процес може стати генералізованим (сепсис, септикопемія).

Стафілококи здатні спричинювати вторинні й змішані інфекції, внутрішньолікарняні хвороби. У пологових будинках вони можуть призвести до розвитку сепсису у породіль та новонароджених. У хірургічних, опікових відділеннях – до гнійного ускладнення ран. Внутрішньолікарняні хвороби частіше спричинюють штами стафілококів, які стійкі до багатьох лікувальних засобів, у тому числі й L-форми.

Харчові інтоксикації спричинюють стафілококи, які розмножуються в харчових продуктах і накопичують у них ентеротоксини.

Інкубаційний період при харчових отруєннях стафілококової етіології триває 2–6 год. Захворювання проявляється нудотою, блюванням, водянистою діареєю, болем у підчеревній ділянці живота, підвищенням температури тіла. Особливу небезпеку становлять забруднені молочні продукти (молоко, сметана, сир, морозиво), тістечка.

Стафілококові хвороби відзначаються схильністю до хронічного перебігу та виникнення рецидиву внаслідок сенсibilізації організму.

S. pidermidis найчастіше колонізує шкіру і слизові оболонки. Мікроорганізм має слабку вірулентність, тому спричинює переважно внутрішньолікарняні інфекції, а також уражає осіб, що хворіють на цукровий діабет, отримують великі дози рентгено- і радіотерапії. Інфікування організму відбувається під час протезування, використання катетерів, дренажу або після хірургічних втручань. Збудник призводить до сепсису, ендокардиту, інфікування ран, кон'юнктивіту, а також є причиною ураження сечовивідної системи в осіб старше 50 років із різною формою уропатології.

S. saprophyticus колонізує шкіру статевих органів і слизову оболонку сечівника. Ці мікроорганізми в основному спричинюють цистит, гострий уретрит, дуже рідко – піелонефрит, ендокардит.

Інші стафілококи переважно спричинюють вторинні внутрішньолікарняні інфекції та інфекції новонароджених.

Імунітет. Більшість людей мають природну резистентність до стафілокока, зумовлену анатомо-фізіологічними факторами, фагоцитозом. Постінфекційний імунітет формується завдяки накопиченню антитоксинів, антибактеріальних антитіл, сенсibilізованих лімфоцитів, підвищенню активності фагоцитів. Однак він нестійкий і нетривалий, який пояснюється наявністю в людей і стафілококів перехреснореагуючих антигенів, що зумовлює стан імунологічної толерантності до збудника та його токсинів, а також великою кількістю сероваріантів збудника, до яких не формується перехресний імунітет.

Мікробіологічна діагностика. Матеріал для дослідження: кров, ексудати, гній, мокротиння, спинномозкова рідина, сеча, слиз із носа і зів, блювотні маси, промивні води шлунка, жовч, випорожнення, секційний матеріал (паренхіматозні органи, кров із серця, лімфатичні вузли, судинні тромби, матеріал із вогнищ ураження).

Методи дослідження: бактеріологічний, серологічний.

Лабораторні дослідження з метою виявлення та ідентифікації стафілококів проводять для діагностики захворювань, у разі планових профілактичних обстежень з метою профілактики внутрішньолікарняних інфекцій та за епідеміологічними показаннями.

Для профілактичного обстеження відбирають слиз із носа та зів. Під час збирання матеріалу слід дотримуватись правил асептики і техніки безпеки.

Матеріал засівають на щільні поживні середовища: ЖСА, МСА, КА; кров – на цукровий бульйон у відношенні 1:10. У культури, що виросла на ЖСА, визначають морфологію клітин, наявність пігменту, лецитовітелазу,

каталази, ферментацію 1 % глюкози в напіврідкому середовищі Гісса під вазеліновим маслом, наявність плазмокоагулази і ДНКаз.

Характер пігменту виявляється краще після додаткової добової витримки чашок при кімнатній температурі (20°C) на світлі. Якщо в досліджуваному матеріалі наявна стороння флора, то за зовнішнім виглядом колоній стафілококів може бути важко відрізнити.

Вживання кров'яного агару дає можливість, окрім виявлення пігменту, визначити і гемолітичну активність стафілококів. Використання кров'яного агару для первинного посіву доцільне тільки при обстеженні об'єктів, що не містять сторонньої мікрофлори, і бажано додавати в живильне середовище кров кролика або барана.

Якщо ж проводиться дослідження гною відкритих ран або відокремлювання виразок або свищів, то слід користуватися елективно-диференційним середовищем для стафілококів – жовтково-сольовим агаром (ЖСА) Р.Н. Чистовича. Елективність цього середовища забезпечується високим вмістом хлористого натрію, а доданий яєчний жовток дозволяє виявляти лецитовітелазну активність, яка є одним з показників патогенності стафілококів і через це ЖСА чіткіше диференціює патогенних представників, ніж кров'яний агар.

Слід проводити масивний посів досліджуваного матеріалу на чашки з ЖСА, а інкубацію вести протягом 2 діб при 35–37 °С. Стороння флора різко пригнічується, стафілококи ж на ЖСА ростуть практично в чистій культурі. Безпосередньо під час огляду чашок навколо колоній відбувається утворення райдужних віночків і каламутної зони – лецитовітелазна реакція. Такі колонії, не менше двох з кожного посіву, пересівають на скошений МПА для подальшої перевірки культур, що виростили, в реакції плазмокоагуляції.

Майже зі всіх досліджуваних матеріалів (гній, рановий вміст, ексудат, мокротиння, осад сечі та ін.) за допомогою бактеріологічної петлі готують мазки, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію. З крові й змивів мазки не готують, тому що в них мала кількість мікроорганізмів. У типових випадках стафілококи мають кулясту форму, фіолетовий колір, розташовані несиметричними гронами, але зустрічаються і одиничні клітини, пари або тетради.

Останнім часом у зв'язку з широким використанням антибіотиків морфологія стафілококів змінилася і типового їх розташування в мазках з гною часто не спостерігають. У зв'язку з цим відрізнити стафілококи від стрептококів за їх морфологією і взаємним розташуванням часто практично неможливо. Тому потрібно робити посів, виділяти чисту культуру і ідентифікувати її.

Однак і первинна мікроскопія може дати попередню відповідь у разі виявлення типових грамозитивних коків правильної круглої форми, розташованих гронами і при великій кількості бактерій у полі зору. Вона також дозволяє вибрати необхідне для посіву елективне середовище, провести пряме визначення чутливості до антибіотиків мікрофлори гною ще до виділення чистої культури.

Серологічний метод діагностики використовують в основному при хронічній стафілококовій інфекції. Це важливо, коли хворий отримав антибіотикотерапію і виділити збудника не вдається. З цією метою визначають титр анти- α -токсину в сироватці крові хворих в реакції гальмування гемолізу. В основі цієї реакції лежить нейтралізація гемолітичної активності стафілококового α -токсину антитілами сироватки крові хворого. Для цього до стафілококового токсину, взятому у визначеній дозі, додають сироватку крові хворого (в розведеннях 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 і далі), ретельно перемішують і до суміші додають 0,05 мл еритроцитів кролика. Пробірки або полістиролові панелі інкубують у термостаті при 37 °С, далі при кімнатній температурі по 1 год. За титр сироватки приймають таку кількість, у суміші з якою доза токсину, взята для досліду, викликає затримку гемолізу або слабкий гемоліз. У здорових людей титр стафілококового антитоксину не більше 0,5–4 АО/мл. У хворих на хронічні стафілококові інфекції титр антитіл, як правило, вище.

У штамів *S. aureus*, виділених при харчовій інтоксикації, визначають наявність ентеротоксинів у біологічних й імунологічних тестах. Для виявлення продукції ентеротоксину використовують біопробу на новонароджених кошенятах або визначають токсигенність виділених культур в реакції преципітації в гелі чи ІФА.

Культуру стафілокока, виділену від людей в епідеміологічних вогнищах стафілококової інфекції, фаготипують за допомогою 23 фагів (4 групи) міжнародного набору для проведення епідеміологічного маркування з метою виявлення джерела інфекції.

Для експрес-ідентифікації використовують тест латекс-аглютинації з використанням комерційних наборів частинок латексу, навантажених антитілами.

Профілактика. Профілактичні заходи слід одночасно проводити щодо джерела інфекції, шляхів передачі й сприйнятливих контингенту людей. Із метою ліквідації джерела інфекції проводять виявлення, ізоляцію та лікування хворих, виявлення і санацію бактеріоносіїв. Важливе значення має щоденний огляд медперсоналу, особливо в пологових, реанімаційних та хірургічних відділеннях, з метою виявлення та відсторонення від роботи осіб з гнійно-запальними захворюваннями, а також своєчасне виявлення захворілих на стафілококову інфекцію серед пацієнтів стаціонару та їх ізоляція в спеціальні відділення або окремі палати. Необхідне планове обстеження медперсоналу на носійство стафілококу у верхніх дихальних шляхах і виявлення резидентних носіїв. Із цією метою проводять трикратне бактеріологічне дослідження з інтервалом 7–10 днів. Виявлення при кожному обстеженні одного і того ж фаговару стафілококу дозволяє віднести носія інфекції до резидентних та провести санацію. Санація антибіотиками носіїв стафілококів неприпустима.

З метою розриву шляхів передачі необхідно дотримуватись правил санітарно-гігієнічного режиму в лікувально-профілактичних закладах, на підприємствах харчової промисловості; проводити вологе прибирання з обов'язковим використанням дезінфекційних засобів; працювати в спеціальному одязі; дотримуватись правил передстерилізаційної обробки, стерилізації та зберігання медичних інструментів, перев'язувального і шовного матеріалу, зберігання та реалізації харчових продуктів; дотримуватись правил особистої гігієни. З метою підвищення резистентності сприйнятливого макроорганізму необхідно проводити заходи, спрямовані на зміцнення організму: повноцінне харчування, раціональний режим праці й відпочинку, загартовування.

Для специфічної профілактики використовують бактеріофаг стафілококовий рідкий для обробки свіжих інфікованих ран, його також вводять перорально, ректально, через дренаж. Використовують і стафілококовий анатоксин, але він створює антигтоксичний імунітет тільки проти тих стафілококів, які лізуються фагами I літичної групи (29, 52, 52A, 79, 80).

Отримання високоімуногенної вакцини, ефективної проти багатьох видів патогенних стафілококів, є важливою проблемою сучасної мікробіології.

Лікування залежить від особливостей клінічних форм стафілокової інфекції і базується на комплексі заходів, що включають адекватне оперативне втручання (санація гнійних вогнищ), раціональну антимікробну терапію і імунотерапію. У зв'язку зі значним розповсюдженням антибіотикорезистентних штамів стафілококів необхідно призначати антибіотики за результатами антибіотикограми. До отримання результатів антибіотикограми доцільно використовувати антибіотики широкого спектра дії, наприклад, напівсинтетичні пеніциліни, які стійкі до β -лактамаз. Ефективні також комбіновані препарати, що містять блокатори β -лактамази, наприклад, амоксиклав.

При тяжких і хронічних формах стафілококових інфекцій застосовують специфічну імунотерапію: автовакцину, анатоксин, антистафілококовий імуноглобулін (людський), стафілококову плазму, фаг (у разі виділення штамів, чутливих до фага).

Практичні навички з теми

1. Виготовлення живильних середовищ для культивування стафілококу (ЖСА, скошений МПА, середовище Гісса – маніт).
2. Проведення первинного посіву матеріалу (гній) на середовище ЖСА, пересів на скошений МПА.
3. Виготовлення мазків з характерних колоній, забарвлення за методом Грама.
4. Визначення диференційно-діагностичних ознак стафілококу.
5. Постановка реакції фаготипування.

Алгоритми лабораторної роботи

Алгоритм: "Правила забору матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену стафілококами".

Матеріал для дослідження: гній, кров (при сепсисі), виділення слизових оболонок, мокротиння, запальний ексудат, ліквор, рановий вміст, плевральний випіт, жовч, сечу. У разі підозри на токсикоінфекцію – блювотні маси, промивні води шлунка, випорожнення, залишки їжі (особливо сир, молоко, тістечка, торти, креми, морозиво та ін.). При санітарно-бактеріологічному контролі досліджують змиви з рук, столів та інших предметів. У бактеріоносіїв матеріал забирають тампоном окремо з глотки і носових ходів.

Із відкритих гнійних ран матеріал беруть стерильним ватяним тампоном після видалення верхнього шару гною, в якому може бути сапрофітна мікрофлора з повітря, шкіри та ін. При закритих ураженнях проводять пункцію і виливають гній зі шприца в стерильну пробірку. Слиз з рото- і носоглотки беруть стерильним тампоном. Мокротиння і сечу забирають в стерильні пробірки, банки. Кров (10 мл), узятую з ліктьової вени, і спинномозкову рідину – при пункції, з дотриманням асептики сіють біля ліжка хворого в 100–200 мл цукрового бульйону. Кров рекомендують швидко (до її згортання) вносити прямо зі шприца у флакон з бульйоном, ретельно перемішати, запобігаючи утворенню згустка. Проби крові не можна заморозувати. У 25 % випадків при стафілококовому сепсисі кількість бактерій у крові (КУО) може бути менше 1 КУО/мл. При підозрі на сепсис необхідно сіяти 25–30 мл крові.

Алгоритм: "Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену стафілококами".

Попередня діагностика стафілококів може ґрунтуватися на *бактеріоскопії* препаратів – мазків, забарвлених за Грамом. Патогенні стафілококи, крім гроноподібного розташування, характеризуються правильною сферичною формою клітин. Виявлення стафілококів, що знаходяться усередині клітин, дозволяє дати відповідь про наявність стафілококової інфекції. У більшості ж випадків для точного встановлення патогенності виявлених стафілококів потрібно виділити ці мікроорганізми в чистій культурі шляхом посіву досліджуваного матеріалу на щільні живильні середовища.

Бактеріологічне дослідження. Матеріал від хворих і бактеріоносіїв засівають негайно або не пізніше 3–4 год після узяття за умови зберігання його на холоді. У 1-й день дослідження петлею або шпателем сіють матеріал у чашки з 3–5 % кров'яним, молочно-сольовим і жовтково-сольовим агаром (ЖСА). Чашки з посівами інкубують при 37 °С протягом 48 год, або доби в термостаті й додатково протягом 24 год при кімнатній температурі при належному освітленні.

Для виділення стафілококів використовується сухе елективне середовище, що є сумішшю гідролізіну з терміном придатності, що минув, і амінопептиду (1:1). На цьому середовищі стафілококи розвиваються швидше, ніж на інших живильних середовищах. Можна використовувати його як основу для приготування молочно-жовтково-сольового агару з метою визначення пігментотворення і лецитовітелазної активності.

На 2-у добу дослідження вивчають колонії. На щільних середовищах стафілококи утворюють опуклі, непрозорі колонії середньої величини, гомогенної або дрібнозернистої структури. На кров'яному агарі стафілококи утворюють непрозорі, трохи опуклі колонії середніх розмірів з гладкою, блискучою, немов полірованою поверхнею, чітко окресленим краєм, маслянистої консистенції. Патогенні штами утворюють навколо колоній прозорі зони гемолізу. На елективно-диференційних середовищах, як правило, зростають тільки колонії стафілококів. Зокрема, на жовтково-сольовому агарі вони утворюють колонії із зоною помутніння навколо них і характерним райдужним віночком по периферії (лецитовітелазна реакція). На молочно-жовтково-сольовому агарі виявляють наявність пігменту, який може бути золотистим, палевим, білим, жовтим, оранжевим та ін.

При мікроскопії в мазках виявляють типові грампозитивні стафілококи.

Не менше двох типових або підозрілих відносно стафілококів колоній пересівають на скошений агар. У першу чергу відсівають колонії з гемолізом і ті, які дали позитивну лецитовітелазну реакцію. За відсутності таких колоній досліджують не менше двох колоній, що пігментуються, при мікроскопії яких виявили типові стафілококи. Пробірки з посівами інкубують при 37 °C протягом 18–20 год.

У наступні дні проводять ідентифікацію виділених чистих культур, для чого перевіряють їх морфологічні й тинкторіальні властивості, плазмокоагулазну активність та інші властивості стафілококів.

Патогенні стафілококи, окрім гемолітичної і лецитовітелазної активності, володіють здатністю коагулювати плазму, викликати некроз шкіри у кролика, руйнувати ДНК.

Для виявлення *плазмокоагулази* виділену культуру вносять у пробірку з цитратною плазмою кролика. Для цього 10 мл крові, узяті з серця кролика, наливають у пробірку з 1 мл 5 % розчину натрію цитрату; після центрифугування або відстоювання відокремлюють плазму, розводять її ізотонічним розчином натрію хлориду 1:4 і розливають у стерильні пробірки по 0,5 мл. У даний час випускають суху нітратну плазму, яку перед застосуванням розводять ізотонічним розчином натрію хлориду. Посіви інкубують при температурі 37 °C і, спостерігаючи за ними, відмічають час прояву коагуляції – згортання плазми. Облік результатів проводиться обов'язково двічі: через 2–3 год і 24 год. Враховують згортання плазми і утворення згустків. З цієї ж культури готують суспензію (1 млрд мікроорганізмів у 1 мл) і 0,2 мл її вводять внутрішньошкірно кролику зі світлою шерстю. Через 1–2 доби на місці введення утворюється некроз шкіри.

Для виявлення коагулазної активності у стафілококів, виділених від людей, можна користуватися як нерозведеною кров'ю, так і плазмою кроликів або людини. Можна використовувати також кров або плазму, узятую безпосередньо від людини. Консервована плазма або кров, які використовуються для переливання, непридатні для реакції, оскільки до них часто додаються консерванти, які перешкоджають життєдіяльності стафілококів, прояву коагулазної активності.

Стафілококи, що дають позитивну коагулазну пробу, повинні розглядатися як потенційно патогенні, незалежно від наявності або відсутності у них гемолітичних властивостей і характеру пігменту, їх відносять до виду *S. aureus* і надалі піддають фаготипуванню, перевірці на чутливість до антибіотиків.

Для визначення ДНК-азної активності в чашку Петрі з живильним агаром і ДНК засівають добуву культуру стафілокока маленькими бляшками. На підсушене середовище в одній чашці можна засівати смужками до 16–20 культур. Через добу в чашку вносять 5 мл соляної кислоти. Через 7–10 хв кислоту зливають і проводять облік. Соляна кислота, реагуючи з ДНК, утворює непрозорий білий преципітат. Якщо культура продукує ДНК-азу, остання деполімерізує ДНК і при додаванні соляної кислоти навколо смужок культур виникає прозора зона, що свідчить про наявність ферменту ДНК-аз.

Ферментацію маніту в анаеробних умовах можна визначати, використовуючи стандартне сухе середовище з манітом й індикатором ВР. Після його виготовлення і регенерації в пробірці додають по 1 мл стерильного вазелінового масла і засівають культуру уколком у стовпчик. Посіви витримують у термостаті протягом 5 діб. При розщепленні маніту середовище синіє. Ця проба позитивна у 94–96 % штамів *S. aureus*.

Лізоцимну активність стафілококів вважають додатковою ознакою патогенності. Для її виявлення засівають бляшками добуву агарову культуру стафілокока на щільне живильне середовище з бактерійною суспензією *Micrococcus lysodeicticus*. При виділенні лізоциму навколо колонії стафілококів утворюються зони лізису (прояснення агару).

Визначення фаговару культур має важливе епідеміологічне значення для виявлення джерела інфекції. Основний міжнародний набір стафілококових фагів складається з 23 типів, розділених на 4 групи. Для типування використовують стафілококові фаги у двох робочих розведеннях: 1 ТР (тест-розведення), яке повинне бути не нижче 10^{-3} , і 100 ТР – не нижче 10^{-1} . Фаготипування починають з 1 ТР, у разі негативного результату використовують розведення 100 ТР.

Обов'язковим також є визначення чутливості виділених стафілококів до антибіотиків для направленої лікування конкретного хворого.

Для виділення гемокультури стафілококів посів крові в цукровому бульйоні витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 18–24 год. Стафілокок викликає рівномірне помутніння середовища. На 2-у добу

дослідження з гемокультури готують мазки, потім пересівають її на скошений МПА і в чашку з кров'яним агаром для виявлення гемолітичної активності стафілококів. На 3-ю добу дослідження культуру стафілокока, одержану на скошеному агарі, вивчають так само, як культуру, виділену з гною або інших матеріалів.

При харчових отруєннях досліджуваний матеріал мікроскопують, а потім сіють в чашки з МПА і в бульйон, що містить 1 % глюкози (для збагачення). Матеріал, забруднений сторонніми мікроорганізмами, сіють на кров'яний агар, що містить 6–7 % натрію хлориду. На цьому середовищі стафілококи добре ростуть і проявляють гемолітичну дію (вони можуть розмножуватися за наявності 12 % солі й 50 % цукру), розвиток ентеробактерій і бацил затримується, а протеї не дає суцільного зростання у вигляді плівки.

Посіви інкубують при температурі 37 °С. Наступного дня вивчають колонії, виділяють чисту культуру стафілококу й ідентифікують її. Патогенні стафілококи, що спричиняють харчові отруєння, утворюють золотистий, рідше білий пігмент, розріджують желатин, викликають гемоліз і коагулюють плазму.

При визначенні масивності обсіменіння стафілококами слизистої носа тампон з досліджуваним слизом вносять у пробірку з 0,5 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію, прополіскують його в рідині струшуванням протягом 10 хв, віджимають об стінки і видаляють. Рідину багато разів перемішують піпеткою. Окремо піпеткою наносять 0,1 мл змиву на чашку з ЖСА і ретельно розтирають шпателем. Чашки з посівами інкубують при 37 °С протягом 48 год, після чого підраховують кількість колоній. Якщо з 50 колоній *S. aureus*, що виростили, дві віднесені до одного і того ж фаготипів, правомірно вважати, що і решта колоній, ідентичних за морфологією і пігментом, належать до *S. aureus* аналогічного фаготипу.

Приклад для розрахунку: після посіву 0,1 мл змиву виросло 50 колоній *S. aureus*. Так, у 0,5 мл буде $50 \cdot 5 = 250$ колоній або $2,5 \cdot 10^2$. Масивність стафілококового обсіменіння, яке виражається числом 10^2 мікробних клітин, є помірною, при ній збудник у навколишнє середовище не виділяється. При виділенні 10^3 бактерійних клітин рівень обсіменіння визначають як високий, при якому збудник виділяється в зовнішнє середовище не тільки при кашлі й чханні, а й при спокійному диханні. За таких обставин потрібно обов'язково проводити санацію бактеріоносців.

Біологічне дослідження. Для виявлення продукції ентеротоксину культуру стафілокока сіють у спеціальне живильне середовище. Посіви поміщають в ексикатор з 20 % CO_2 і інкубують при температурі 37 °С протягом 3–4 діб, а потім фільтрують через мембранні фільтри № 3 і 4. Одержаний фільтрат об'ємом 10–15 мл змішують із рівною кількістю теплого молока і згодують кошенятам у віці 1–2 міс або ж вводять фільтрат їм в шлунок за допомогою зонда. За наявності ентеротоксину через 30–60 хв

у кошенят виникає блювання – основна ознака отруєння, а через 2–3 год з'являється пронос, що триває протягом 2–3 днів, у важких випадках можливий летальний результат. Фільтрат можна вводити кошенятам внутрішньоочеревинно, після попереднього нагрівання його при температурі 100 °С протягом 30 хв для інактивації термолабільних фракцій токсину. В даний час токсигенність виділених культур стафілококів визначають у досліді *in vitro* за допомогою реакції дифузної преципітації в гелі або ІФА.

Визначення стафілококового антитоксину в сироватці крові набуває великого значення при діагностиці хронічних стафілококових інфекцій (остеомиєліт, септикопіємія та ін.), коли бактеріологічні дослідження, що проводяться на фоні масивної антибіотикотерапії, як правило, залишаються безрезультатними. В основі реакції лежить метод пригнічення гемолітичної активності стафілококового токсину антитоксином сироватки хворого. Для цього до стафілококового токсину, взятого в певній дозі, додають сироватку хворого, розведення 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 та ін., ретельно перемішують і до суміші додають 0,05 мл еритроцитів кролика. Результати реакції враховують після перебування пробірок у термостаті при температурі 37 °С протягом години і потім протягом години при кімнатній температурі.

Кількість сироватки, в суміші з якою доза токсину, взята в дослід, дає затримку гемолізу або слабкий гемоліз, приймають за титр сироватки.

У практично здорових дітей, так само як і у осіб, що перенесли стафілококову інфекцію шкіри або що ускладнила хірургічне захворювання, титр стафілококового антитоксину не перевищує 0,5–4 АО/мл. У хворих із хронічними стафілококовими інфекціями титр, як правило, вище.

Серологічне дослідження. При стафілококових інфекціях проводиться лише тоді, коли збудника виділити не вдається, наприклад, при хронічних процесах (остеомиєліт, септикопіємія), особливо якщо вони тривало лікуються антибіотиками. Серед сучасних серологічних реакцій часто використовують РНГА і ІФА.

Дослідження на бактеріоносійство серед медичного персоналу проводиться двічі на рік. При планових бактеріологічних обстеженнях обов'язково досліджують слиз з носа. Дослідження слизу з ротоглотки проводять вибірково, за наявності запальних процесів у зіві. Матеріал беруть з передніх відділів носа стерильним ватяним тампоном і сіють на ЖСА не пізніше, ніж через 2 год після відбору. Виділення й ідентифікацію *S. aureus* проводять так само, як і при дослідженні інших матеріалів.

Термінологія: *Micrococcaceae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus epidermidis.*

Запитання для контролю знань

1. Загальна характеристика патогенних коків. Поширення коків у навколишньому середовищі. Класифікація патогенних коків.

2. Стафілококи. Морфологія і біологічні властивості. Токсини і ферменти. Стійкість до чинників навколишнього середовища. Класифікація.

3. Захворювання, що спричиняються стафілококами. Піодермія як професійне захворювання. Стафілококові інфекції у пологових будинках. Харчові стафілококові токсикоінфекції. Особливості імунітету проти стафілококових захворювань. Специфічна профілактика і лікування.

4. Правила взяття і доставки матеріалу до лабораторії; супровідна документація. Методи лабораторної діагностики.

Тестові завдання

1. Який основний метод лабораторної діагностики інфекцій, викликаних стафілококами?

- A. Мікроскопічний. C. Біологічний. E. Алергічний.
 B. Бактеріологічний. D. Серологічний.

2. У хірургічному стаціонарі почастишали випадки гнійних післяопераційних ускладнень стафілококової природи. Яким чином можна виявити джерело стафілококової інфекції в стаціонарі?

- A. Визначення антибіотикочутливості. D. Визначення біоварів.
 B. Визначення гемотоксинів. E. Визначення фаговарів.
 C. Визначення ферментів агресії.

3. Який патологічний матеріал слід доставити до бактеріологічної лабораторії при підозрі на стафілококову інфекцію?

- A. Гній. D. Кров.
 B. Сечу. E. Усе перераховане.
 C. Блювотні маси, промивні води шлунка.

4. Проведіть облік реакції плазмокоагуляції. Який варіант можна вважати позитивним?

	Дослід	Контроль № 1	Контроль № 2
	Плазма + культура, яка досліджується	Плазма + плазмо- коагулюючий штаб	Не засіяна плазма
A.	+	+	+
B.	+	+	-
C.	-	+	+
D.	-	-	-
E.	+	-	-

5. У лікарню поступила дитина з діагнозом: стафілококовий сепсис. На яке поживне середовище необхідно посіяти кров хворої дитини, щоб виділити збудника?

- A. Плоскірева. D. Цукрово-печінковий бульйон.
 B. М'ясо-пептонний бульйон. E. Бучіна.
 C. Жовтково-сольовий агар.

6. Для визначення гемолітичних властивостей золотистого стафілококу використовують:

- A. Жовтково-сольовий агар. D. Кров'яний агар.
 B. Молочно-сольовий агар. E. Правильно A і B.
 C. М'ясо-пептонний агар

Тема: Лабораторна діагностика хвороб, спричинених патогенними коками (стрептококами)

Кількість годин : 8.

Обґрунтування теми. У минулому столітті стрептококи стали причиною смерті багатьох людей. *Streptococcus pyogenes* був найголовнішою причиною положової лихоманки (сепсис новонародженого). Скарлатина була серйозним ускладненням стрептококової інфекції, але зараз завдяки лікуванню антибіотиками це лише стрептококовий фарингіт, що супроводжується висипом. У наші дні патогенні стрептококи викликають інтерес переважно через випадки швидко прогресуючої хвороби, а також ризику серйозних ускладнень при невилікуваних інфекціях. Ці хвороби залишаються головною міжнародною медичною проблемою, а зусилля спрямовані на роз'яснення ризику і механізмів цих ускладнень й ідентифікації ревматогенних і нефрогенних впливів стрептококів. Гостра інфекція стрептокока може проявитися у вигляді фарингіту (гострий фарингіт), скарлатини (висип), імпетиго (інфекція поверхневих шарів шкіри) або целюліт (інфекція глибоких шарів шкіри). Агресивна, токсигенна інфекція може призвести до некротизуючого фасціїту, міозиту і синдрому стрептококового токсичного шоку. У пацієнтів після гострої стрептококової інфекції можуть також розвинутися імунно-обумовлені післястрептококові ускладнення, такі як гострий ревматизм і гострий гломерулонефрит.

Мета заняття

– загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою хвороб, спричинених стрептококами.

– конкретна:

а) знати:

– правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.
2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратури.

3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на інфекцію, обумовлену патогенними коками.

4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на інфекцію, обумовлену патогенними коками.

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення патогенних коків.

6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення: музейні мікропрепарати, живильні середовища (КА, цукровий бульйон, середовище Гісса), тампони для зів, шпатель для зів, бланки направлень, бікс, шпатель для посіву, сірники, маркер, штативи, ріст культури стрептококу на КА, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

Зміст заняття. Стрептококи вперше були виявлені Т. Більротом (1874) при захворюванні на бешиху та ранову інфекцію; Л. Пастером (1878) при післяпологовому сепсисі; в чистій культурі були виділені Ф. Фелейзенем (1883) і О. Розенбахом (1884).

Їх назва пов'язана з характерною формою і розміщенням клітин (від грец. *streptos* – ланцюг і *kokkos* – зерно).

Окрім патогенних в групу стрептококів входять і непатогенні для людини види, які є представниками резидентної мікрофлори порожнини рота, носа, шкіряних покривів, харчового і генітального тракту.

Таксономія

Родина: *Streptococcaceae*.

Рід: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*.

Вид: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, зеленяві стрептококи.

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Стрептококи мають клітини кулястої, овоїдної або ланцетоподібної форми, діаметр яких становить 0,5–2 мкм, не утворюють спору, утворюють фімбрії, патогенні види утворюють капсулу, нерухливі, грампозитивні. У препараті розміщуються у вигляді ланцюга різної довжини або у вигляді диплококів. На рідких середовищах ланцюжки довші, на щільних – коротші.

Культуральні властивості. Стрептококи, на відміну від стафілококів, вибагливі до живильних середовищ і умов культивування. На простих живильних середовищах не ростуть. Для їх культивування використовують цукровий бульйон, сироватковий і кров'яний агар.

На щільних живильних середовищах стрептококи утворюють в'язкі, дрібні колонії, що нагадують краплю води; шорсткі (R-форма) колонії утворюють патогенні штами, що містять М-антиген.

На кров'яному агарі стрептококи можуть утворювати зону бета- і альфа-гемолізу.

У рідкому живильному середовищі стрептококи дають пристінковий або придонний ріст у вигляді зернистого осаду, бульйон залишається прозорим.

Стрептококи – факультативні анаероби, деякі – мікроаерофіли, краще ростуть за наявності 5 % CO₂ за температури 25–45 °С, оптимальна температура 37 °С.

Ферментативні властивості. У стрептококів добре виражені сахаролітичні властивості, вони розщеплюють лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу і деякі інші вуглеводи до кислоти без газу, за винятком *S. kefir*, який розщеплює вуглеводи до кислоти і газу. Ферменти гіалуронідаза,

фібринолізин, стрептокіназа зумовлюють високу інвазивність стрептококів. Каталазонегативні.

Антигенні властивості. Стрептококи мають складну антигенну структуру. Вони містять групоспецифічні полісахаридні антигени, що локалізуються в клітинній стінці. Їх визначають у реакції преципітації. У гемолітичних стрептококів виявлені типові білкові антигени, головним є білок М, який визначають у реакції аглютинації. За М-антигеном існує 100 сероваріантів стрептококів, що має епідеміологічне значення.

Стрептококи, як і стафілококи, мають перехреснореагуючі антигени, спільні з антигенами шкіри, вилочнової залози, що може спричинити ауто-імунні хвороби.

У клітинній стінці стрептококів, як і стафілококів, виявлений також антиген, здатний взаємодіяти з Fc-фрагментом молекули IgG, що зумовлює порушення імунітету, призводить до запальних процесів і індукує цитотоксичні реакції.

Найбільш проста класифікація була запропонована в 1919 році Брауном, згідно з якою стрептококи поділяли на 3 групи: альфа-гемолітичні, бета-гемолітичні й гама-негемолітичні.

Альфа-гемолітичні стрептококи спричинюють утворення зеленої зони гемолізу, їх називають *S. viridans* – стрептококи віриданс; β-гемолітичні стрептококи зумовлюють утворення прозорої зони гемолізу навколо колоній, γ-негемолітичні стрептококи гемоліз не спричиняють.

Цю класифікацію використовують у лабораторній практиці.

Найбільш раціональною є класифікації стрептококів, яка ґрунтується на їх антигенній структурі. Практичне значення набула серологічна класифікація, яку запропонувала Ребекка Ленсфілд у 1933 р. Згідно з цією класифікацією стрептококи поділяють за допомогою реакції преципітації на 20 серологічних груп (А, В, С, D і т.д. до V) за наявністю специфічних полісахаридів у клітинній стінці. Патогенні для людей стрептококи (*S. pyogenes*) належать переважно до групи А, але є патогенні і серед інших груп.

Резистентність. Стрептококи стійкі до дії низьких температур, висушування, особливо у білкових субстратах (кров, гній, слиз), у пилу і на поверхні предметів зберігаються декілька місяців. У разі нагрівання до 56 °С стрептококи гинуть через 30 хв, а при дії дезінфекційних розчинів – через 20 хв.

Патогенні стрептококи чутливі до дії практично всіх антибіотиків, крім аміноглікозидів і більшості фторхінолонів.

Фактори патогенності. До основних факторів патогенності належать такі:

– Білок М – головний фактор патогенності *S. pyogenes*, входить до складу фімбрії. Білок М зумовлює адгезію, пригнічує фагоцитоз, визначає антигенну типоспецифічність, має властивості суперантигену.

– Капсула пригнічує фагоцитоз. До її складу входить гіалуронова кислота, аналогічна тій, що міститься в сполучній тканині людського організму, внаслідок чого фагоцити не розпізнають капсульні стрептококи як чужорідні.

– Еритрогенін – скарлатинозний токсин. Він діє як алерген спричинює підвищення температури тіла, пригнічує імунітет, руйнує тромбоцити, тому у хворих зумовлює появу яскраво-червоного висипу на шкірі й слизових оболонках.

– Стрептолізини O і S (гемолізینی) руйнують еритроцити, проявляють цитотоксичну дію.

– Стрептокіназа руйнує фібрин, що підвищує інвазивні властивості стрептокока. Очищена стрептокіназа використовується в медичній практиці для розсмоктування тромбів, фібринозних і гнійних ексудатів.

– Гіалуронідаза – фактор інвазії, сприяє поширенню бактерій через сполучну тканину.

– Протеази руйнують різні білки, у тому числі з ними пов'язана тканинна токсичність.

– ДНКаза спричинює гідроліз ДНК.

– Алергени призводять до сенсibiliзації організму.

Епідеміологія. Інфекція може бути як ендогенною, так і екзогенною. Джерелом екзогенної інфекції є люди, хворі на гострі стрептококові інфекції (ангіна, скарлатина, пневмонія), а також реконвалесценти. Основний механізм передачі – повітряно-краплинний, а також контактний, і дуже рідко фекально-оральний (через молоко та інші харчові продукти).

Патогенез і клінічна картина. Альфа-гемолітичні стрептококи *S. viridans* спричинюють ендокардит. Основними збудниками хвороби у людей є бета-гемолітичні стрептококи – *S. pyogenes* (від грец. *pyon* – гній і *genesis* – походження). Серед населення поширене гостре і хронічне носійство *S. pyogenes*. 15–20 % здорового населення виділяють збудника місяцями і навіть роками. При ендогенній і екзогенній інфекції стрептококи проникають через пошкоджені шкіру і слизові оболонки в лімфатичну і кровоносну системи. У разі зараження повітряно-краплинним і повітряно-пиловим шляхом найчастіше уражаються регіонарні лімфатичні вузли, внаслідок чого розвивається тонзиліт (від лат. *tonsillae* – мигдалеподібні залози), фарингіт (від грец. *pharynx* – глотка), звідки збудник потрапляє в лімфатичні й кровоносні судини. Стрептококи, як і стафілококи, спричиняють у людей різні гострі й хронічні захворювання з утворенням гною, часто змішаної стафіло-стрептокової етіології.

Основний шлях передачі при гострих респіраторних інфекціях – повітряно-краплинний. Передача інфекції від хворих з іншою локалізацією вогнищ ураження не так активна, оскільки обмежені можливості потрапляння збудника в навколишнє середовище (відсутність кашлю або чхання). Не виключається зараження при прямому контакті з ураженою шкірою, зі

слизом та іншими виділеннями, або забрудненими предметами вжитку та іграшками, а також при вживанні інфікованих збудником харчових продуктів.

Широке розповсюдження стрептококових інфекцій обумовлене високою чутливістю до стрептококу, особливо у дітей та підлітків за відсутності або слабого розвитку протистрептококового імунітету, що набувається з віком.

Захворюваність на стрептококові інфекції характеризується сезонними підйомами, які найбільш виражені в осінньо-зимовий період і ранньою весною – для респіраторних і влітку – для шкірних інфекцій.

Стрептококи здатні зумовлювати хвороби і без накопичення гною, які виділені в самостійні нозологічні форми: скарлатину, бешиху, гостру ревматичну лихоманку, стрептококовий синдром токсичного шоку.

Скарлатина (від давньолат. *scarlatium* – яскраво-червоний колір) – гостра інфекційна хвороба, яка клінічно проявляється ангіною, лімфаденітом, дрібним яскраво-червоним висипом на шкірі й слизовій оболонці з відшаровуванням епідермісу, а також загальною інтоксикацією і схильністю до гнійно-септичних і алергічних ускладнень. Скарлатину спричиняють стрептококи групи А, що здатні продукувати еритрогенний токсин.

Хворіють переважно діти дошкільного віку, які відвідують дитячі заклади. Хвороба поширюється в основному повітряно-краплинним шляхом у разі тривалого контакту з хворим або носієм. Можливі аліментарний і контактано-побутовий шляхи передачі (через брудні руки, предмети побуту). Стрептокок потрапляє на слизові оболонки носоглотки і зівя, де адгезується і продукує еритрогенний екзотоксин. Інкубаційний період триває 1–10 днів. Після проникнення в кров токсин спричиняє розширення дрібних судин, що клінічно проявляється гіперемією і утворенням висипу. Яскрава гіперемія розвивається на мигдаликах, дужках, язичку, м'якому піднебінні, задній стінці глотки ("палаючий зів"). Спостерігається регіонарний лімфаденіт. Язик стає яскраво-червоним, об'єм сосочків збільшується – "малиновий язик". Висипання з'являється спочатку на шкірі шиї, верхньої частини тулуба, потім поширюється і локалізується на згинальних поверхнях грудної клітки і живота, а також внутрішніх поверхнях стегон. Епідерміс просочується ексудатом з розвитком потовщення й ороговіння клітин, що призводить до його відшарування. Захворювання також характеризується підвищеною температурою тіла, загальною слабкістю. Внаслідок алергенних властивостей збудника може розвиватися гломерулонефрит, артрит, ендокардит. Накопичення збудника в крові, різних органах і тканинах може призвести до появи гнійних некротичних процесів.

Бешиха. Збудники проникають через рани, тріщини, подряпини, поприлості на шкірі й слизових оболонках. В основі патогенезу бешихи лежить схильність до неї, яка може бути генетично зумовленою або набутою. Інкубаційний період триває 3–5 днів. Хвороба починається ознаками загальної інтоксикації: висока температура тіла, головний біль, болем

у м'язах і суглобах, при тяжкій формі можливі блювання, судоми, марення; через декілька годин або на 2-у добу на обмеженій ділянці шкіри з'являється відчуття розпирання, печіння, свербіжу, помірного болю. На ураженій ділянці виникають яскраво-червона пляма з чіткими межами у вигляді "язиків полум'я", гаряча на дотик, набряк, інфільтрація шкіри; розвивається регіонарний лімфаденіт. Як ускладнення може розвинутися флегмона, флебіт (від грец. *phleps* – вена), глибокий некроз шкіри. Внаслідок лімфо-венозної недостатності формуються лімфостаз (застій лімфи) і слоновість (збільшення окремих частин тіла, частіше ніг, через хронічне запалення лімфатичних судин і застій лімфи).

Гостра ревматична лихоманка розвивається протягом 1–5 тиж після фарингіту. Клінічно вона проявляється гострим мігруючим поліартритом, підшкірними вузлами на кістках, ендокардитом зі зміною клапанів серця, міокардитом, гострою серцевою недостатністю.

Стрептококовий синдром токсичного шоку розвивається як ускладнення стрептококового сепсису. Клінічно проявляється високою температурою тіла (38,8 °C і вище), блюванням, діареею, скарлатинозним висипом, зниженням артеріального тиску, знепритомнінням. Летальність сягає 30 %.

S. agalactiae – представник нормальної мікрофлори. Виявляють у жінок у піхві і цервікальному каналі, у чоловіків – на слизовій оболонці уретри. Інфікування немовлят відбувається, як правило, через матір під час пологів, у дорослих – при сексуальних контактах. Можливе виникнення внутрішньо-шпитальної інфекції, яка передається новонародженим і немовлятам через немиті руки матері або обслуговуючий персонал. Клінічно проявляється як бактеріємія, ураження легенів, менінгіт, лихоманка. Найчастіші післяпологові інфекції: ендометрити, пуерперальний сепсис, наслідком якого можуть бути абсцеси в тазовій ділянці й септичний шок. У дорослих частіше інфекції виникають на фоні тяжких супутніх хвороб, таких як злоякісні новоутворення, діабет, імунодефіцитні стани, алкоголізм. Найбільш розповсюджені клінічні прояви в таких випадках: тонзиліт, пневмонія, бактеріємія, ендокардит, артрит, остеомієліт, а також інфекції шкіри та м'яких тканин.

Патогенез інфекцій, обумовлених зеленявими стрептококами, у більшості випадків залишається недостатньо вивченим. Різні види зеленявих стрептококів викликають бактеріємію, зтяжний септичний ендокардит, який частіше виникає у осіб з попереднім ураженням або після протезування клапанів. Як ускладнення можливий гломерулонефрит внаслідок циркуляції імунних комплексів. У хворих із травмами або дефектами, що обумовлюють потрапляння респіраторної мікрофлори в ЦНС, можуть розвинути менінгіти.

Ентерококи виявляються при захворюваннях дванадцятипалої кишки, жовчного міхура, сечових шляхів. Наявність їх у зовнішньому середовищі є критерієм фекального забруднення питної води, стічних вод і харчових продуктів.

Імунітет. Основну роль у його формуванні відіграють антитоксини і типоспецифічні М-антитіла. Після скарлатини формується стійкий тривалий антитоксичний імунітет, повторні випадки захворювання трапляються у 2–16 % перехворілих.

При інших стрептококових інфекціях формується нестійкий і нетривалий антибактеріальний імунітет, як при всіх опортуністичних інфекціях.

Мікробіологічна діагностика. Матеріал для дослідження: кров, гній, слиз із зів'я, наліт із мигдаликів, виділення з ран.

В основі лабораторної діагностики стрептококових інфекцій є бактеріологічний метод дослідження – посів патологічного матеріалу на живильні середовища з наступним виділенням чистої культури стрептококів і визначенням її серологічної групи за Ленсфілд або ідентифікація за низкою біохімічних і прискорених серологічних тестів, а також визначення їх антибіотикорезистентності.

Стрептококи слід диференціювати з ентерококами, для яких характерні такі відмітні ознаки: здатність зростати в діапазоні температур від 10 до 45 °С, стійкість до високих концентрацій натрію хлориду, стійкість до пеніциліну, стійкість до лужного середовища (рН 9,6).

Серологічний метод діагностики стрептокової інфекції використовують в основному при хронічній інфекції, особливо коли хворий отримав масивну попередню антибіотикотерапію і виділити збудника не вдається. Найчастіше з цією метою визначають в крові стрептококовий антиген у РЗК і специфічні стрептококові антитіла до токсинів, а саме до стрептолізину О або стрептодорнази. Антистрептолізин О визначають у реакції нейтралізації. Серологічні дослідження дозволяють виявити носіїв. Слід пам'ятати, що антитіла до стрептолізину О не утворюються при шкірних інфекціях, обумовлених стрептококами групи А.

Профілактика. Для профілактики стрептококових інфекцій проводять неспецифічні заходи: виявлення, ізоляцію і лікування хворих, дотримання правил санітарно-гігієнічного режиму, особистої гігієни. Ослабленим дітям, що перебували у контакті з хворим, вводять імуноглобулін. Специфічна профілактика не розроблена.

Лікування. Для лікування використовують бета-лактамі антибіотики (пеніциліни, цефалоспорины, карбопенемі), макроліди (еритроміцин, олеандоміцин, кларитроміцин, флуритроміцин), аміноглікозиди (стрептоміцин, канаміцин, гентаміцин, сизоміцин, тобраміцин, амікацин та ін.). Для профілактики ревматизму використовують біциліни. При тяжких формах хвороби вводять антитоксичну сироватку.

Для профілактики і лікування останнім часом широко використовують бактеріофаг стрептококовий рідкий, який вводять підшкірно або внутрішньом'язово.

Пневмококи. Особливе положення в роді *Streptococcus* має вид *S. pneumoniae* (від грец. *pneumon* – легені). Вперше він був виявлений Л.Пастером у 1881 році, його роль в етіології крупозної пневмонії довели А. Френкель і А. Вейксельбаум у 1884 році. *S. pneumoniae* викликає пневмонію, бронхіти, запальні процеси верхніх дихальних шляхів і пазух носа, отити, сепсис, менінгіт, ендокардит, перитоніт, артрити, але може бути виявленим і на слизовій оболонці носоглотки здорових носіїв.

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Пневмококи мають клітини овальної або ланцетоподібної форми (нагадує полум'я свічки) близько 1 мкм у діаметрі. У мазках, виготовлених із патологічного матеріалу, розміщуються парами (диплококи), оточеними товстою капсулою; в мазках, виготовлених із чистої культури, розміщуються короткими ланцюгами. В організмі звичайно утворює захисну капсулу. На збагачених білком живильних середовищах утворюють капсулу. Спор не утворюють, нерухливі, грампозитивні.

Культуральні властивості. Пневмококи не ростуть на простих живильних середовищах, добре ростуть на кров'яних середовищах або середовищах з додаванням сироватки і 0,1 % розчину глюкози. Аероби або факультативні анаероби краще ростуть у капнофільних умовах (5–10 % CO₂); оптимальна температура 37 °С, рН 7,8. На щільному живильному середовищі утворюють дрібні (1 мм у діаметрі), ніжні, напівпрозорі колонії. На кров'яному агарі навколо колоній утворюють зону альфа-гемолізу (середовище зеленіє). У рідкому живильному середовищі утворюють рівномірне помутніння.

Ферментативні властивості. Схожі на властивості *S. pyogenes*, але відрізняються тим, що не ферментують маніт, а ферментують інулін і розчиняються за наявності жовчі. Зростання *S. pneumoniae* пригнічується за наявності оптохіну. Оксидазу та каталазу не продукує.

Антигенні властивості. Пневмококи мають O-соматичний білковий спільний для всього виду і полісахаридні капсульні типоспецифічні антигени. За полісахаридним антигеном вони поділяються на 90 сероваріантів (патогенними для людей є I, II, III, інші слабкопатогенні).

Резистентність. *S. pneumoniae* на відміну від *S. pyogenes* менш стійкі у навколишньому середовищі, але у висушеному мокротинні можуть зберігатися до 2 міс. Стійкі до низьких температур. Під дією дезінфекційних засобів звичайної концентрації гинуть через декілька хвилин; надто чутливі до оптохіну, який діє на нього у розведенні 1:100 000.

Фактори патогенності. Капсула – основний фактор патогенності, захищає збудника від фагоцитозу й антитіл. Штами, що втратили капсулу, авірулентні.

Фактори адгезії та колонізації. Роль адгезинів виконують поверхневі структури – тейхоева і ліпотейхоева кислоти, холінзв'язуючі білки. Тей-

хоєва кислота клітинної стінки, що містить холін, називається субстанція С. Вона здатна з'єднуватися з С-реактивним білком. Цей комплекс активує комплемент, що призводить до вивільнення медіаторів гострої фази запалення. Холінзв'язуючі білки здатні інактивувати комплемент, що дозволяє пневмококу «ухилитися» від фагоцитів, опосередкованого опсонінами.

Штами пневмококу, виділеного від бактеріоносіїв, як правило, не утворюють капсулу, але володіють високою адгезивною активністю.

Ферменти патогенності: лізоцим (мурамідаза), протеаза, нейрамідіаза, гіалуронідаза, пневмолізін.

Епідеміологія. Джерелом інфекції є хворі люди та носії. Вхідні ворота – носоглотка. Носійство поширене як серед дітей дошкільного віку (20–50 %), так і серед дорослих (20–25 %). Основний шлях передачі – контактний, а в період епідемічних спалахів – повітряно-краплинний. Пік захворювання припадає на холодний сезон року. У більшості випадків клінічні форми інфекції розвиваються на фоні зниження резистентності макроорганізму через переохолодження, алкоголізм, наявність іншої патології (цукровий діабет, хірургічне втручання, грип, ВІЛ-інфекція).

Патогенез і клінічна картина. Потрапляючи у вхідні ворота – верхні дихальні шляхи – разом із крапельками мокротиння, слизу, слини, пневмокок починає колонізувати слизову оболонку. За допомогою лізоциму пневмокок пригнічує оточуючу нормальну мікрофлору, за рахунок нейрамідіази розріджує поверхневий слиз та потрапляє на мембрану епітелію. Далі адгезує та колонізує епітелій. Подальше пересування пневмококу по бронхіальному дереву в легені, додаткові пазухи носа, порожнину середнього вуха, а також у кров і ЦНС залежить від резистентності організму, а також і від важливіших факторів патогенності – капсули, гіалуронідази, пневмолізину.

Пневмококи є основними збудниками бактеріальної пневмонії, що виникає поза лікувальними закладами. Кожного року на пневмококову пневмонію хворіють не менше ніж 500 000 людей, що призводить до інвалідизації і смертності населення.

Клінічно пневмококова пневмонія починається гостро: висока температура тіла, кашель із виділенням гнійного мокротиння, біль у грудній клітці, що посилюється під час спроби глибокого вдихання повітря, загальна слабкість, озноб, задишка на фоні звичайного фізичного навантаження. В осіб ослаблених і похилого віку пневмонія розвивається повільно, з незначною лихоманкою, порушенням свідомості та ознаками легенево-серцевої недостатності.

Крім пневмонії пневмококи можуть спричинювати менінгіт, сепсис, повзучу виразку рогівки, отит, ендокардит, перитоніт та інші хвороби.

Імунітет типоспецифічний, гуморальний, нестійкий.

Мікробіологічна діагностика. Матеріал для дослідження: мокротиння, гній, виділення з вуха, виразки, слиз із зів'я, спинномозкова рідина, кров, плевральна і перикардіальна рідина, біопсійний і бронхосептичний матеріал. Для виявлення бактеріоносіїв досліджують фарингальні мазки. Матеріал потрібно досліджувати якомога швидше (не пізніше ніж через 1–1,5 год), дозволяється зберігати у холодильнику при температурі 4 °С до 12 год.

Основні методи діагностики: *мікроскопічний, бактеріологічний, біологічний*. Під час мікроскопії патологічного матеріалу підтвердженням діагнозу є наявність грампозитивних ланцетоподібних коків – не менше ніж 10 у полі зору.

Для виділення чистої культури із матеріалу, забрудненого сторонньою мікрофлорою, використовують білих мишей, в організмі яких пневмококи накопичуються дуже швидко, через 6–8 год, або засівають патологічний матеріал на кров'яний чи шоколадний агар, що містить гентаміцин (антибіотик, що пригнічує сторонню мікрофлору).

Для диференціації пневмокока від інших стрептококів використовують пробу з оптохіном (він пригнічує ріст пневмокока). Для визначення сероваріанту ставлять реакцію аглютинації на склі з типовими сироватками або використовують феномен "набухання капсул" (за наявності гомологічної сироватки капсула пневмококів різко набухає).

Профілактика. Для специфічної профілактики пневмококових інфекцій використовують полівалентну вакцину "Пневмо-23". Це комбінована вакцина, що містить очищені капсульні полісахариди *S. pneumoniae* 23 типів. Імунізацію проводять групам підвищеного ризику: дітям віком понад 2 роки, особам понад 65 років, ослабленим або тим, кого часто госпіталізують (хворі на цукровий діабет, хронічний бронхіт). Проводять її дворазово з 5–10-річним інтервалом.

Лікування аналогічне такому, що здійснюють при інших стрептококових інфекціях. Частіше використовують антибіотики амоксицилін (клавуланат), кларитроміцин, цефуроксин, цефазолін, оспен.

Практичні навички з теми

1. Виготовлення живильних середовищ для культивування стрептококу (КА, цукровий бульйон).

2. Проведення первинного посіву матеріалу (мазок з зів'я) на середовище цукровий бульйон та 3–5 % кров'яний агар.

3. Виготовлення мазків із характерних колоній, забарвлення за методом Грама.

4. Визначення диференційно-діагностичних ознак зеленявих стрептококів та *S. pneumoniae*.

5. Проведення серологічної ідентифікації *S. pyogenes*.

Алгоритми лабораторної роботи

Алгоритм: "Правила забору матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену стрептококами".

При захворюваннях, викликаних патогенними стрептококами (*Streptococcus pyogenes*), матеріалом для дослідження є гній, кров, сеча, відокремлювання слизової оболонки, мокротиння, спинномозкова рідина.

Кров для бактеріологічного дослідження об'ємом 5–10 мл забирають із ліктьової вени стерильним шприцом і засівають на цукровий бульйон «біля ліжка хворого» у співвідношенні 1:10–1:20. Оптимальні строки доставки патологічного матеріалу в бактеріологічну лабораторію не повинні перевищувати 2 год.

Проби зі слизової оболонки задньої стінки глотки і зіва слід забирати до ранкового туалету порожнини рота, натще або через 2 год після їжі.

Для отримання проб з носа тампон вводять на глибину 1–2 см у кожен ніздрю і забирають відокремлення зі слизової оболонки носа. Якщо слизова суха, тампон змочують стерильною дистильованою водою або ізотонічним розчином натрію хлориду.

Проби з везикул на шкірі отримують після промивання поверхні шкіри 70 % спиртом їх пунктуванням з дотриманням асептики. Якщо є кірочки (імпетиги), ділянку ураження протирають 70 % спиртом, а кірочку видаляють голкою. Далі з основи цієї ділянки беруть пробу вологим тампоном. Можна натягнути шкіру по краю кірочки (не видаляючи її) і видавити з-під неї краплю серозної рідини. Краплю збирають на кінчик сухого тампону, не торкаючись шкіри. Бажано отримувати матеріал зі свіжих уражень, які мають чисті культури стрептококів.

Гній забирають стерильним шприцом та негайно доставляють до лабораторії. Якщо доставити неможливо, клінічний матеріал треба зберігати в холодильній камері при +4 °С.

Алгоритм: "Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену стрептококами".

Бактеріоскопія. У мазках із гною, відокремлювання слизової оболонки, забарвлених за Грамом, стрептококи розташовуються короткими ланцюжками, іноді у вигляді диплококів або одиничних коків. В останньому випадку стрептококи не можна відрізнити від стафілококів, тому роблять бактеріологічне дослідження для вивчення інших властивостей виявлених коків.

Бактеріологічне дослідження. Гній, відокремлювання слизової оболонки, сечу, мокротиння, спинномозкову рідину сіють в чашку Петрі з 5 % кров'яним агаром та неоміцином (краще використовувати дефібриновану кров) і в пробірку з цукровим бульйоном.

Посів проб з тампона на кров'яний агар. Пробу з тампона ретельно переносять на 1/6 поверхні чашки Петрі з кров'яним агаром (приблизно 2×3 см навколо бортика). Далі матеріал стерильною петлею штрихом роз-

носять через першу ділянку приблизно на поверхні чашки Петрі, чашку обертають на 90° і стерильною петлею проводять посів штрихом через ділянку вторинної інюкуляції на третій квадрат. Чашку знову обертають на 90° і стерильною петлею розсівають матеріал з третього квадрату на четвертий, останніми декількома штрихами не повертаючись до третього квадрату. Для отримання окремих колоній використовують 3–4 серії штрихів. Розсів на кожен нову ділянку чашки завершують посівом у глибину агару декількома уколами. Це утворює наближення до анаеробних умов і обумовлює формування більш чітких зон β -гемолізу у штамів, які є слабкогемолітичні при аеробному культивуванні. Для успішного вирощування стрептококів чашки з кров'яним агаром повинні бути не дуже сухі. Посіви утримують у термостаті протягом 18–20 год при 36 °С, за відсутності колоній з β -гемолізом залишають ще на добу при кімнатній температурі.

Наступного дня після інкубації в термостаті при температурі 37 °С вивчають колонії і ріст в цукровому бульйоні. *S. pyogenes* розвивається з утворенням дрібних, плоских, сухуватих колоній зернистої структури.

Стрептококи, які продукують β -гемотоксин (стрептолізин), утворюють навколо колоній зону гемолізу, а для стрептококів, що продукують α -гемотоксин, характерна поява зон позеленіння навколо колоній внаслідок утворення метгемоглобіну. За відсутності гемотоксину гемоліз не відбувається. У цукровому бульйоні піогенний стрептокок дає придонний або пристінковий ріст у вигляді пластівців або зерен, усе середовище залишається прозорим. *S. agalactiae* викликає інтенсивне помутніння бульйону з утворенням невеликого гомогенного осаду.

Із колоній, схожих на стрептокок, готують мазки, забарвлюють за Грамом і проводять мікроскопію з метою диференціації з грамнегативними гемофільними мікроорганізмами, ріст яких на кров'яному агарі подібний росту гемолітичних стрептококів. У мазках із колоній стрептококів не відзначається типового розташування коків у вигляді ланцюжків. Клітини розташовуються поодинокі, попарно або невеликими скупченнями. У мазках із культури в рідкому середовищі виявляють типові ланцюжки стрептококів.

Для отримання чистої культури колонії стрептококів зі щільного середовища пересівають на кров'яний агар або поживний бульйон.

Після перевірки чистоти виділеної культури проводять вивчення біохімічних властивостей. Найбільше диференційно-діагностичне значення мають наступні тести: визначення виду гемолізу на кров'яному агарі, проба на каталазу, чутливість до бацитрацину і сульфаніламідів, САМР-тест, гідроліз гіпурату натрію, жовчо-ескуліновий тест, ріст у бульйоні з 6,5 % натрієм хлоридом.

Проба на каталазу. Тест заснований на здатності мікроорганізмів, які продукують каталазу, розщеплювати перекис водню з утворенням кисню і води. Для постановки цього тесту чисту культуру штаму додають скляною

паличкою до краплі 3–10 % розчину перекису водню на предметному склі й розтирають коловими рухами. У позитивних випадках спостерігають виділення пухирців газу. На відміну від стафілококів стрептококи не продукують фермент каталазу.

СAMP-тест. Більша частина стрептококів групи В (*S. agalactiae*) продукують екстрацелюлярний протеїн (СAMP-фактор), який при взаємодії з бета-лізином золотистого стафілококу викликає синергічне посилення лізису еритроцитів. Для постановки тесту через центр чашки з кров'яним агаром суцільною лінією наносять добову бульйону культуру продукуючого бета-лізину *S. aureus*. Дослідні штами стрептококів наносять перпендикулярно до лінії посіву стафілококу. Як контроль використовують штами *S. agalactiae* (позитивний контроль) і *S. pyogenes* (негативний контроль). При виявленні у місці перетину посівів стрептококів і стафілококів після 18 год інкубації при температурі 37 °С зони синергічного збільшення гемолізу у вигляді "крила метелика" роблять висновки про наявність у пробі *S. agalactiae*.

Тест на гідроліз гіпурату натрію. Петлю чистої культури дослідного штаму суспендують у 0,4 мл 1 % водного розчину гіпурату натрію. Після 2 год інкубації при температурі 37 °С додають 0,2 мл 3,5 % розчину нінгідрину в суміші бутанолу і ацетону (1:1). При позитивному результаті після повторної інкубації протягом 10 хв з'являється пурпурне забарвлення.

На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що виділений *S. pyogenes*. На подальших етапах дослідження визначають групу і серовар стрептокока.

Групи стрептокока (за Ленсфільд) класифікують за наявністю полісахаридного антигену, для виявлення якого використовують реакцію преципітації з груповими сироватками (А, В, С та ін.).

Серовари стрептококів (за Гріффітсом) характеризуються наявністю специфічного протеїнового антигену, який визначають за допомогою реакції аглютинації на склі з типовими аглютинуючими сироватками. Для цього добову бульйонну культуру виділеного стрептокока центрифугують і розводять осад в 0,5–1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. На предметному склі змішують краплю сироватки з краплею дослідної культури. Більшість патогенних стрептококів належать до групи А.

Для виявлення β-гемолітичного стрептококу групи А можна застосовувати реакцію імуофлюоресценції. У цьому випадку готують мазок з виділеної культури стрептокока, фіксують його впродовж 15 хв 95 % спиртом, після чого забарвлюють упродовж 15 хв флюоресцуючою сироваткою, промивають проточною водою, висушують і проводять мікроскопію в люмінесцентному мікроскопі.

Дослідження крові. Посів крові в цукровий бульйон роблять так само, як при стафілококових захворюваннях. За наявності стрептокока на дні флакона з'являються пластівчастий придонний осад і гемоліз. У мазках

виявляються довгі ланцюжки стрептококів. Мікроскопія дозволяє дати попередню відповідь про наявність або відсутність стрептокока. Для виявлення гемотоксину роблять пересівання в чашку з кров'яним агаром. Через добу (3-й день дослідження) з'являються типові дрібні колонії, оточені зоною гемолізу або ореолом зеленуватого кольору. Отримані дані дозволяють зробити висновок про наявність *S. pyogenes*.

Для виділення анаеробних стрептококів (*Peptostreptococcus anaerobius*), які населяють слизову оболонку статевих органів і можуть викликати післяпологовий сепсис, кров засівають у середовище Кітта–Тароци. У рідких середовищах деякі штами анаеробних стрептококів утворюють газ.

Патогенні стрептококи добре ростуть на середовищі Гарро – МПА (рН 7,4), до якого додають 5 % кров і 0,1 % водний розчин генціану фіолетового (0,2 мл на кожні 100 мл МПА). Зростання сапрофітної повітряної мікрофлори і ентерококів на середовищі Гарро пригнічується.

Для визначення патогенних властивостей стрептокока вивчають токсиноутворення, зокрема наявність *фібринолізину* (стрептокінази). У досліді використовують плазму крові людини, для отримання якої до 10 мл крові додають 1 мл 2 % розчину натрію цитрату. Після відстоювання відділяють незабарвлену плазму, розводять її 1:3, а потім додають 0,5 мл 18–20-годинної культури випробовуваного стрептокока і 0,5 мл 0,25 % розчину кальцію хлориду. Пробірки обережно струшують і поміщають у водяну баню при температурі 42 °С на 20–30 хв. У цей час відбувається утворення згустку фібрину. Пробірки залишають на 20 хв у водяній бані. Якщо культура стрептокока виділяє фібринолізин, згусток розчиняється упродовж 20 хв.

У зв'язку з тим, що деякі штами стрептококів повільно розчиняють фібрин, через 2 год пробірки переносять з водяної бані в термостат і результати враховують наступного дня.

Методом оцінки вірулентності культур стрептокока можна вважати визначення кількості поверхневого М-білка, властивого тільки патогенним штамам. Із молодих культур отримують солянокислі екстракти і в них визначають вміст М-білка.

Для діагностики скарлатини, як правило, лабораторні дослідження не застосовують. В окремих випадках висівають відокремлення слизової оболонки зіву і виділяють стрептококи різних серогруп.

Гемолітичні стрептококи, що виділяють β - і α -токсини, можуть знаходитися в повітрі різних лікарняних приміщень. Для їх виявлення роблять посіви повітря на середовище Гарро з наступним виділенням і ідентифікацією чистої культури.

Серологічна діагностика. Стрептококовий антиген в сироватці крові хворих визначають за допомогою РЗК на холоді. Для реакції використовують антистрептококову імунну сироватку, отриману шляхом гіперімунізації кроликів культурою стрептокока серологічної групи А. За титр

антигену приймають найбільше розведення досліджуваної сироватки, що викликає затримку гемолізу не менше ніж на ++.

Визначення антистрептолізину О, що міститься в сироватках хворих, засновано на здатності його нейтралізувати гемолітичну активність стрептолізину О. Для цього проводять кратні розведення сироватки хворого і до них додають стрептолізин О (виробничий препарат). Суміш витримують у термостаті при температурі 37 °С впродовж 15 хв і додають в усі пробірки по 0,2 мл суспензії еритроцитів кролика. Пробірки знову поміщають в термостат на 1 год, а потім враховують результати реакції.

Для серологічної діагностики застосовуються також методи визначення антитіл до інших токсинів, що виділяються стрептококами, наприклад, до стрептогіалуронідази. Для проведення дослідження використовують парні сироватки хворих, взяті з інтервалом у 7–10 днів. Визначення титру антигіалуронідази широко використовують у діагностиці активності ревматичного процесу.

Алгоритм: *"Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену пневмококами".*

Бактеріоскопічний метод. Із матеріалу (окрім крові), що вивчається, готують два мазки, один із яких забарвлюють за Грамом, а інший (для виявлення капсул) – за Буррі або за Козловським: мікроорганізми і краплю туші, нанесені на поверхню скла, змішують круговими рухами для отримання звичайного мазка. Туш заздалегідь розводять ізотонічним розчином натрію хлориду у співвідношенні 1:4. Мазок висушують на повітрі, не фіксують і забарвлюють впродовж 2–3 хв формолгенціановим фіолетовим (10 мл 40 % формаліну і 1,5 г генціанового фіолетового). Замість формолгенціанового фіолетового можна застосовувати 0,33 % водний розчин фуксину і 3 % лужний розчин метиленового синього. При мікроскопії на чорно-сірому фоні видно незабарвлені капсули, в яких розташовуються клітини бактерій фіолетового кольору. Пневмококи розташовані попарно, клітини їх мають витягнуту форму у вигляді полум'я свічки і оточені капсулою. Таким чином, на підставі мікроскопії можна судити про наявність збудника. Проте достовірніші дані отримують при бактеріологічному дослідженні.

Бактеріологічний метод дослідження. Для виділення чистої культури 5–10 мл крові засівають у сироватковий бульйон (1 частина сироватки і 3 частини МПБ, рН 7,2–7,4) або в цукровий бульйон, або в спеціальне середовище, в 100 мл якого міститься 1,8–2,0 мл агар-агару, 70–75 мл гідролізату за Хоттингером або гідролізату казеїну (1,8–2,0 г/л азоту аміну), 20–25 мл гідролізату бичачих сердець (1,40–1,60 г/л азоту аміну), 4–5 мл дефібринованої крові коня, 0,5–0,7 мл екстракту пекарських дріжджів. Після 18–24-годинної інкубації в термостаті проводять пересів у чашку з 10 % кров'яним агаром. Спинномозкову рідину центрифугують і осад засівають на кров'яний агар. Колонії пневмокока нагадують колонії стреп-

токока: дрібні, майже плоскі, непрозорі, з ореолом зеленого кольору, рідше відмічається гемоліз. Характерне вдавнення в центрі колонії. Вивчають колонії за допомогою луни.

Біологічний метод дослідження. Безпосередній посів матеріалу на живильні середовища (мокротиння, гній) зазвичай не дає позитивного результату, оскільки за наявності сапрофітів, особливо гнильних мікроорганізмів, ріст пневмококів пригнічується. Тому гній і мокротиння заздалегідь обробляють – вибирають грудочки, розтирають їх у фарфоровій ступці, додаючи 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, і вводять внутрішньочеревинно білим мишам. Миші дуже чутливі до пневмокока, вони гинуть від пневмококової септицемії через 18–72 год. Труп миші розтинають, кров із серця, шматочки внутрішніх органів і перитонеальну рідину сіють у чашку з кров'яним агаром і в пробірку з сироватковим бульйоном.

Використання біологічного методу обмежено його трудомісткістю, неекономічністю, тривалістю виділення чистих культур пневмококу. Крім того, нерідко циркулюючі в теперішній час штами пневмококу характеризуються низькою вірулентністю і їх не вдається виділити на мишах.

На підставі морфологічних і культуральних властивостей важко диференціювати пневмококи від зеленявих стрептококів. Для цього застосовують реакцію розчинення пневмококів жовчю: 1 мл бульйонної культури вносять у стерильну пробірку і додають 0,5 мл бичачої жовчі. Через 10–15 хв перебування в термостаті відбувається повний лізис пневмококів (прояснення середовища). Контролем є пробірка з бульйонною культурою пневмокока без жовчі. Зелений стрептокок, колонії якого схожі на колонії пневмокока, не лізується жовчю. За наявності лізису проводять посів у середовище «строкатого» ряду. На відміну від стрептокока, пневмокок розщеплює інулін з утворенням кислоти і утворює аміак з аргініну.

Антигенну структуру пневмококів вивчають у реакції аглютинації на склі або в реакції Найфельда з застосуванням набору сироваток до капсульних полісахаридів.

На підставі проведеного дослідження можна остаточно визначити вид виділеного мікроорганізму. Враховується ланцетоподібна форма диплококів, наявність капсули в нативному матеріалі, висока вірулентність для білих мишей, розчинення жовчю і розщеплювання інуліну.

Серологічний метод дослідження. Для визначення рівня антипневмококових антитіл у сироватці крові хворого використовують непрямий варіант метода флюоресуючих антитіл (МФА) і імуноферментний аналіз (ІФА).

Методи експрес-діагностики. Важливість цих методів особливо помітна при проведенні діагностики на фоні антибіотикотерапії, коли бактеріологічний метод стає неефективним. Імуноіндикація пневмококових антигенів проводиться за наявності відповідних реагентів і тест-систем за допомогою реакції ко- і латекс-аглютинації, імуноферментного аналізу і зустрічного імуноелектрофорезу.

Алгоритм: "Постановка реакції набухання капсули за Найфельдом".

Для постановки тесту готують мазок із дослідного матеріалу з додаванням краплі полівалентної пневмококової антикапсульної сироватки і краплі метиленового синього, після чого накривають покривним склом і проводять мікроскопію. У позитивних випадках спостерігається guellung-ефект; капсула навколо клітин пневмококу значно збільшується в розмірі та стає чітко видимою. Цей феномен дозволяє легко виявити і диференціювати пневмококи від інших стрептококів.

Алгоритм: "Проведення оптохінового тесту".

Тест заснований на різноманітній чутливості пневмококу і зеленявих стрептококів до оптохіну. Ріст пневмокока інгібується концентраціями оптохіну не більш 5 мкг/мл. Паперові диски, імпрегновані оптохіном, накладають на інкульовані штрихом чашки з кров'яним агаром. Зона інгібування росту *S. pneumoniae* після 18-годинної інкубації, значно перевищує зону інших стрептококів.

Термінологія: *Streptococcaceae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*.

Запитання для контролю знань

1. Стрептококи. Морфологія і біологічні властивості. Антигенна структура. Класифікація. Стійкість до чинників навколишнього середовища.

2. Інфекційні хвороби, що спричиняються стрептококами. Роль стрептокока піогенного в етіології скарлатини, ревматизму. Імунітет. Профілактика та лікування стрептококових інфекцій.

3. Правила взяття та доставки матеріалу в лабораторію; заходи безпеки; супровідна документація. Методи лабораторної діагностики. Постанова реакції преципітації за Ленсфільд.

4. Стрептококи пневмонії (пневмококи). Морфологія і біологічні властивості. Антигенна структура. Стійкість до чинників навколишнього середовища.

5. Роль у патології людини. Імунітет. Профілактика та лікування пневмококових інфекцій.

6. Правила відбору матеріалу та доставка його в лабораторію для дослідження; супровідна документація. Лабораторна діагностика.

Тестові завдання

1. У забарвлених за Грамом мазках студенти виявили стрептококи. Які морфологічні й тинкторіальні властивості характерні для стрептокока?

А. Спорогенні грампозитивні бактерії.

В. Рухливі грампозитивні бактерії.

С. Нерухомі грамнегативні бактерії.

Д. Нерухомі, аспорогенні грампозитивні бактерії кулястої форми.

Е. Нерухомі, аспорогенні грамнегативні бактерії кулястої форми.

2. У хворого на крупозну пневмонію виділений пневмокок. Охарактеризуйте ріст збудника на кров'яному агарі.

- A. Колонії із зоною гемолізу.*
- B. Зона гемолізу відсутня.*
- C. Колонії зеленувато-сірого кольору, оточені зеленою зоною.*
- D. Каламутні колонії з райдужним вінчиком.*
- E. Пігментовані жовті колонії.*

3. Який тест використовується для того, щоб диференціювати гемолітичний стрептокок від пневмокока?

- A. Реакція плазмокоагуляції.*
- B. Ферментація маніту в анаеробних умовах.*
- C. Визначення індолоутворення.*
- D. Перевірка на жовчостійкість.*
- E. Оксидазний тест.*

4. Нині відомі 20 груп стрептококів. У якій серологічній реакції визначається належність до однієї з груп?

- A. Аглотинації.*
- B. Преципітації.*
- C. РНГА.*
- D. РГА.*
- E. РЗК.*

5. Які методи діагностики використовують у діагностиці стрептококової інфекції?

- A. Бактеріоскопічний.*
- B. Бактеріологічний.*
- C. Біологічний.*
- D. Серологічний.*
- E. Усі відповіді правильні.*

6. Відмітьте, який варіант тестів є типовим для пневмокока і використовується при ідентифікації?

	<i>Ферментація інуліну</i>	<i>Розчинна дія 10% жовчі</i>	<i>Капсулоутворення в організмі</i>
<i>A.</i>	–	–	–
<i>B.</i>	–	–	+
<i>C.</i>	+	+	+
<i>D.</i>	+	–	+
<i>E.</i>	+	–	–

**Тема: Лабораторна діагностика хвороб,
спричинених патогенними коками (менінгококи)**

Кількість годин: 2.

Обґрунтування теми. Менінгококова інфекція є важливою проблемою охорони здоров'я. Це пов'язано з високим рівнем захворюваності й летальності. Щорічно у світі реєструють близько 500 тис. випадків менінгокової інфекції, з яких майже 50 тис. закінчуються летально. Хоча рівень захворюваності на цю інфекцію відносно невисокий, летальність від неї складає майже 10 %. У осіб, які перенесли менінгококову інфекцію, можуть виникати такі важкі ускладнення, як глухота, показання для ампутації кінцівок, затримка фізичного і розумового розвитку. Щороку в Україні від менінгокової інфекції помирає близько 40 дорослих і 100 дітей. У 2005 р летальність при менінгококовій інфекції в Україні складала 12,5 %.

Мета заняття

– загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою хвороб, спричинених менінгококами;

– конкретна:

а) знати:

– правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.

2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.

3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на інфекцію, обумовлену патогенними коками.

4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на інфекцію, обумовлену патогенними коками.

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення патогенних коків.

6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення: музейні мікропрепарати, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

Зміст заняття

Таксономія

Родина: *Neisseriaceae*

Рід: *Neisseria*

Вид: *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*.

Грамнегативні коки належать до родини *Neisseriaceae*, названої на честь дослідника А. Нейссера. Рід *Neisseria* включає 14 видів, серед них патогенних для людей два: *N. meningitidis* – збудник менінгокової інфекції і *N. gonorrhoeae* –

збудник гонореї. Інші 12 видів нейсерій є коменсалами і в складі нормальної мікрофлори населяють слизові оболонки верхніх дихальних шляхів. В ослаблених хворих вони можуть спричинити вторинні інфекції – менінгіт, ендокардит, сепсис, пневмонію, отит, бронхіальну астму.

N. meningitidis (від грец. *meninx* – мозкова оболонка) – збудник менінгококової інфекції, яка характеризується локальним ураженням слизової оболонки носоглотки з подальшою генералізацією процесу, що призводить до менінгококового сепсису (менінгококцемія) і запалення м'яких оболонок головного і спинного мозку (цереброспінальний менінгіт).

Останнім часом у хворих на менінгіт часто виділяють також *S. pneumoniae*, гемофільну паличку типу b (*Haemophilus influenzae* типу b, або Hib), лістерії, ентеробактерії, стафілококи, мікоплазми, патогенні гриби та ін.

Менінгококи вперше були виявлені в 1884 році Е. Маркіафавою і Е. Челлі, у чистій культурі були виділені в 1887 році А. Вейсельбаумом.

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Менінгококи мають форму кульки діаметром 0,6–1 мкм у діаметрі. У мазках, виготовлених із патологічного матеріалу хворого, вони перебувають всередині лейкоцитів і мають форму кавових зерен, які розташовуються попарно і повернуті один до одного увігнутою поверхнею. У мазках із культури вони мають правильну круглу форму, різні за розміром (поліморфні), розташування може бути безладним (ефект «розсипаного гороху») або тетрадами. Для кращого диференціювання використовують забарвлення за Грамом у модифікації Каліни Г.П. Спорю не утворюють, більшість утворюють капсулу, нерухливі, мають фімбрії, грамнегативні.

Культуральні властивості. Облігатні аероби, краще ростуть у капнофільних умовах (8–10 % CO₂); потребують підвищеної вологості. Менінгококи вибагливі до живильних середовищ і умов культивування. Для їх росту необхідна сироватка крові, кров, молоко, жовток яйця, амінокислоти. Культивують менінгококи на сироватковому або шоколадному середовищі. Оптимальними є рН 7,2–7,4, температура 37 °С, при температурі нижче 24 °С не ростуть.

На щільному сироватковому живильному середовищі менінгококи утворюють ніжні прозорі з блакитним відтінком, рівним краєм, гладенькою поверхнею, маслянистої консистенції колонії розміром 0,5–1,5 мм. На відміну від умовно-патогенних нейсерій не утворюють пігмент. На кров'яному агарі утворюють ніжні округлі колонії сіруватого кольору з блискучою поверхнею. Не дають гемолізу, на відміну від колоній стафілококу, стрептококу і гемофілів. У сироватковому бульйоні менінгококи утворюють помутніння і невеликий осад на дні, а через 2–3 дні на поверхні бульйону утворюється плівка.

При первинному посіві дуже вибагливі до умов культивування, тому за відсутністю росту на безсироватковому агарі при 37 °С, на сироватко-

вому агарі при 20 С і середовищі з 5 % жовчі диференціюють менінгококи від умовно-патогенних нейсерій.

Ферментативні властивості. Менінгококи ферментують тільки два вуглеводи: глюкозу і мальтозу до кислоти без газу; протеолітичні властивості не проявляють (не розріджують желатин, молоко, не утворюють індол і сірководень, не відновлюють нітрати), утворюють фермент оксидазу, каталазу. Менінгококи також продукують ферменти, з якими пов'язані їхні патогенні властивості: плазмокоагулазу, гіалуронідазу тощо.

Антигенні властивості. Менінгококи містять родові білкові й полісахаридні антигени, протеїновий видовий антиген, групоспецифічні, типоспецифічні (білки поверхневої мембрани), полісахаридний капсульний антиген. Залежно від полісахаридного капсульного антигену менінгококи поділяють на 13 серогруп: А, В, С, D, X, Y, Z, ₂₉E, H, W₁₃₅, I, K, L. Штами серогрупи А спричиняють епідемічні спалахи, В-, С- і Y-спорадичні випадки.

Резистентність. Менінгококи надто нестійкі до факторів навколишнього середовища, що слід враховувати під час транспортування патологічного матеріалу в лабораторію. Поза організмом людини швидко гинуть, а при низькій температурі втрачають здатність до утворення колоній. За оптимальних умов на щільних і рідких середовищах культура гине через 48–72 год, на напівщільних середовищах зберігається до місяця. Менінгококи гинуть під впливом прямих сонячних променів, ультрафіолетового опромінення і під час кип'ятіння через 30 с. Чутливі до дезінфікуючих засобів, під впливом яких вони гинуть протягом 1 хв. Чутливі до більшості антибіотиків, які використовуються в клініці, але в останні роки відмічається тенденція до зростання кількості резистентних штамів.

Фактори патогенності

- ✓ фактори адгезії і колонізації – фімбрії і білки поверхневої мембрани;
- ✓ фактори інвазії – гіалуронідаза, нейрамінідаза, протеази (розщеплюють молекули IgA), фібринолізин, гемолізін;
- ✓ капсула – основний фактор патогенності, захищає збудника від фагоцитозу;
- ✓ ендотоксин виявляє токсичну, пірогенну, некротичну і летальну дію; він уражає судини, спричиняє крововиливи у внутрішні органи і появу геморагічного висипу на шкірі;
- ✓ алергени призводять до сенсibilізації організму; утворені циркулюючі імунні комплекси осідають на стінках дрібних судин і посилюють токсичну дію ендотоксину.

Епідеміологія. Особливість епідеміології менінгокової інфекції полягає в значному поширенні "здорового" носійства (від 3 до 30 % здорового населення). Однією з причин цього є перетворення менінгокока на L-форму під впливом антитіл, комплементу, антибіотиків. Це підтримує циркуляцію менінгококів серед населення і створює постійну загрозу спа-

лаху інфекції. У період епідемії рівень носійства досягає 95 %, але хворіють менше ніж 1 % інфікованих осіб.

Менінгококова інфекція поширена повсюдно, але класичний регіон епідемічного поширення – Екваторіальна (Центральна) Африка – "менінгітний пояс". Якщо збудник заноситься на території, де хвороба раніше не реєструвалася (наприклад, регіони Крайньої Півночі), хворіє населення будь-якого віку переважно на генералізовану форму інфекції.

Відмічено циклічні підвищення захворюваності кожні 10–12 років, які тривають протягом 4–6 років. Спорадичні випадки захворюваності (1:100 000 міського населення) реєструються кожного року. Найбільш висока захворюваність відмічається серед дітей віком до 5 років. Вони становлять 70 % всіх хворих; до 85 % випадків захворювання припадає на вік до 14 років, частіше і важче хворіють особи чоловічої статі. Найбільш високий рівень захворюваності зберігається у дітей віком до 1 року. Захворюваність має сезонний характер, збільшуючись в осінньо-зимовий період.

Джерело захворювання – хвора людина або носій. Механізм передачі – повітряно-краплинний (під час експіраторного акту: видих, кашель, чхання; або через заражені слиною предмети (іграшки, ложки, посуд). Зараження можливе під час близького спілкування з хворим або носієм на відстані до 0,5 м. Захворювання висококонтагіозне.

Патогенез і клінічна картина. Вхідними воротами інфекції є носоглотка, звідки менінгококи проникають по закінченням нюхового нерва або гематогенно на оболонки мозку. Важлива роль у патогенезі відводиться ендотоксину, який бере участь у розвитку токсичного шоку і пригнічення активності нейтрофілів. Патогенез захворювання включає ураження токсичного і септичного характеру в сполученні з алергічними реакціями. Інкубаційний період триває 2–10 днів, частіше 2–4 дні. Менінгококова інфекція може клінічно проявлятися у декількох формах: первинно-локалізованій, генералізованій та змішаній.

До первиннолокалізованої належать менінгококоносійство і назофарингіт; до генералізованої – менінгококцемія, епідемічний цереброспінальний менінгіт, ендокардит, артрит, поліартрит, пневмонія. У тяжких випадках трапляється змішана форма – менінгоенцефаліт.

Назофарингіт характеризується яскравою гіперемією і набряком задньої стінки глотки, у той час як піднебінні дужки, мигдалики і м'яке піднебіння майже не змінюються або слабо гіперемовані; головним болем, підвищеною температурою тіла, збільшенням підщелепних лімфатичних вузлів. Захворювання триває 3–5 днів і закінчується одужанням.

Менінгококцемія (менінгококовий сепсис) розвивається після проникнення менінгококів у кров. Захворювання починається гостро, протягом декількох годин температура тіла підвищується до 40–41 °С, що супроводжується головним болем, блюванням, болем у м'язах спини, кінцівках,

появою висипу на шкірі. Типова менінгококцемія характеризується ураженням внутрішніх органів (серця, надниркових залоз, нирок, мозку тощо), утворенням крововиливів, тромбів, що призводить до розвитку менінгокового ендокардиту, гострої серцево-судинної, наднирковозалозної і ниркової недостатності, набухання і набряку мозку. Масивна бактеріємія та інтенсивна загибель збудника призводять до вивільнення ендотоксину (токсемія). Це спричинює розвиток у короткий термін інфекційно-токсичного шоку, який часто призводить до летального наслідку.

Із крові менінгококи проникають у спинномозкову рідину і призводять до запалення м'яких оболонок спинного і головного мозку – цереброспинального менінгіту. Захворювання починається гостро, характеризується високою температурою тіла, головним болем, блюванням, судомами, ригідністю (від лат. *rigidus* – твердий) м'язів потилиці. Оскільки мозкові оболонки і мозкова речовина анатомічно тісно пов'язані, запальний процес може перейти на мозкову тканину, тоді розвивається менінгоенцефаліт (від грец. *meninx i enkephalos* – головний мозок). Це зумовлює порушення психіки, сонливість, розвиток стійких парезів і паралічів. Різноманітність клінічного прояву хвороби визначається станом специфічного імунітету і ступенем вірулентності менінгокока. За відсутності лікування захворювання характеризувалося високою летальністю – до 85 %. Вона залишається достатньо високою і нині, що пов'язано з резистентністю збудника до лікарських препаратів.

Імунітет. Новонароджені діти захищені від менінгокової інфекції материнськими антитілами, які зберігаються протягом 6–10 міс. Після перенесеної інфекції, у тому числі в легкій формі, формується тривалий напружений імунітет, але він має гуморальний і групоспецифічний характер.

Мікробіологічна діагностика. Матеріалом для дослідження є виділення слизової оболонки носоглотки, спинномозкова рідина, кров, гній з мозкових оболонок, інколи – зскрібки петехій (плям висипу). Враховуючи низьку стійкість менінгококів у навколишньому середовищі, взятий на аналіз матеріал необхідно обкласти ватою, грілками або помістити в ізоtermічний ящик чи термос, де підтримується температура близько 37 °С, і якомога швидше (не пізніше 2 год) доставити в лабораторію в теплому стані.

Методи дослідження: бактеріоскопічний, бактеріологічний, серологічний, експрес-діагностика.

Бактеріоскопічне дослідження ліквору і крові дозволяє визначити наявність збудника. Секційний матеріал досліджують тільки бактеріоскопічно внаслідок низької життєздатності менінгокока. У носоглотковому слизу є умовно-патогенні нейсерії, морфологічно схожі з менінгококом, тому мікроскопія не проводиться.

Бактеріологічне дослідження проводять з метою виділення та ідентифікації чистої культури менінгокока. Бактеріологічному дослідженню

підлягає носоглотковий слиз, кров, ліквор. Посів матеріалу для отримання чистої культури проводять на щільні або напіврідкі живильні середовища з сироваткою, кров'ю або асцитною рідиною. Культури інкубують протягом 18–24 год при 37 °С за умов підвищеного вмісту вуглекислоти.

Серологічне дослідження проводять з метою виявлення менінгококових антигенів і антитіл – використовують РПГА, ІФА, РІА, імуноелектрофорез та ін.

Останнім часом використовують *молекулярно-генетичне дослідження*, за допомогою якого можна виявити фрагменти нуклеїнових кислот багатьох збудників.

Профілактика. Специфічна профілактика проводиться вакциною "Менінго А+С", яка містить високоочищені ліофілізовані полісахариди менінгококів груп А і С (полісахарид менінгокока групи В виявився неімунногенним, але пошуки вакцини проти цієї групи менінгококів тривають). Вакцина застосовується для профілактики менінгококової інфекції, спричиненої менінгококами груп А і С у дітей з 18-місячного віку і дорослих. Вакцинацію проводять в ендемічних районах, а також у разі епідемії. Поствакцинальний імунітет триває 3 роки. У вогнищі інфекції проводиться пасивна імунізація дітей дошкільного віку імуноглобуліном (однократно в дозі 1,5–3,0 мл) не пізніше 7-го дня після реєстрації першого випадку захворювання.

Лікування проводять антибіотиками. Найбільш ефективними є бензилпеніцилін і його напівсинтетичні аналоги (амоксиклав, ампіцилін, оксацилін), цефуроксим, можна призначати левоміцетин, рифампіцин. Нечутливі менінгококи до сульфаніламідних препаратів.

Практичні навички з теми

1. Виготовлення живильних середовищ для культивування менінгококу (сироватковий агар).
2. Проведення первинного посіву матеріалу (мазок з зіву) на середовище сироватковий агар.
3. Виготовлення мазків з характерних колоній, забарвлення за методом Грама.
4. Визначення морфотинкторіальних і біохімічних властивостей менінгококу.
5. Визначення диференційних ознак менінгокока (*N. meningitidis*) і катарального диплокока (*N. catarrhalis*) на сироватковому і м'ясо-пептонному агарах при різних температурах.

Алгоритми лабораторної роботи

Алгоритм: "*Правила забору матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену менінгококами*".

Для діагностики назофарингітів і виявлення бактеріоносійства досліджують слиз із носоглотки, менінгіту – ліквор, при підозрі на менінгококцемію та інші форми генералізованої інфекції – кров.

Спинномозкову рідину збирають у стерильну пробірку й відразу ж сіють на живильні середовища, або негайно, не допускаючи охолодження, відправляють у лабораторію.

Відокремлення слизової оболонки носоглотки знімають спеціальним тампоном, вигнутим під кутом (135°). Найбільш результативним є негайний посів носоглоткового слизу на щільні живильні середовища. Для максимального роз'єднання бактеріальних клітин використовують 2–3 чашки із середовищем. Якщо матеріал буде досліджуватися через 3–5 год після забору, його засівають у рідке живильне середовище (казеїновий гідролізат ферментативного розщеплення із вмістом 1,5 г/л амінного азоту й додаванням 250 ОД/мл ристоміцину), а потім інкубують при температурі 37 °С. Після цього його висівають на сироватковий агар й інкубують.

Кров (5–10 мл) забирають із вени і засівають у бульйон з 0,1 % глюкозою (у співвідношенні 1:10). Кров беруть до лікування, натще або не раніше 3–4 год після їжі.

Трупним матеріалом є гній із мозкових оболонок, кров і заражена шкіра, трупний матеріал забирають у першу годину.

Алгоритм: *"Взяття носоглоткового слизу при підозрі на менінгокову інфекцію"*:

- запропонуйте пацієнту сісти обличчям до джерела світла;
- візьміть зі штативу в ліву руку пробірку з тампоном, напишіть на пробірці номер аналізу;
- вийміть правою рукою із пробірки тампон, зігніть його об край отвору пробірки під кутом 135° на відстані 2–3 см від кінця.

Увага! Щоб не допустити розтріскування скла пробірки і травми рук, великий палець лівої руки тримайте на краю отвору пробірки, а великим пальцем правої руки натисніть на дріт тампона!

- поставте у штатив пробірку, зігнутий тампон тримайте у правій руці;
- візьміть у ліву руку стерильний шпатель для зів'я;
- запропонуйте пацієнту відкрити широко рота;
- натисніть шпателем на корінь язика;
- уведіть тампон зігнутих кінцем догори за м'яке піднебіння в носоглотку, проведіть 2–3 рази тампоном по задній стінці глотки;

Увага! Під час введення і виведення тампон не повинен торкатися зубів, слизової оболонки щік, язика і язичка!

- виведіть тампон із ротової порожнини, опустіть його у пробірку, розгинаючи тампон об край пробірки.

Увага! Якщо тампон потрібно відправити до лабораторії, то перед взяттям матеріалу його зволожують. Якщо матеріал відбирається сухим тампоном, то його опускають у середовище накопичення.

Алгоритм: "Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену менінгококами".

Бактеріоскопічне дослідження спинномозкової рідини й крові дає можливість визначити наявність збудника. Якщо спинномозкова рідина має вигляд гною, то мазки готують без її попередньої обробки; при незначній каламутності спинномозкову рідину центрифугують, і з осаду готують мазки. Фарбують аніліновими барвниками (водний розчин основного фуксину, метиленовий синій), тому що при фарбуванні за Грамом формені елементи спинномозкової рідини змінюються, відзначається велика кількість артефактів. Менінгококи мають вигляд диплококів бобоподібної форми, розташованих усередині цитоплазми лейкоцитів і стикаються увігнутими краями. Часто виявляється ніжна капсула. При менінгококсемії менінгококи можна виявити в мазках крові. У цьому випадку готують препарат товстої краплі, фарбують його 2–3 хв водним розчином метиленового синього без фіксації, зайву фарбу змивають водопровідною водою й висушують препарат на повітрі. На блакитному фоні препарату видні пофарбовані в темно-синій колір лейкоцити, а між ними безліч дрібних, темно-синіх коків, розташованих у вигляді купок, парно або поодиночі.

Експрес-діагностика здійснюється за допомогою реакції преципітації в гелі, зустрічного імуоелектрофорезу з груповими преципітуючими антисироватками або радіоімунологічного методу й заснована на виявленні в спинномозковій рідині або крові хворого специфічного антигену. Також застосовується реакція імуофлюоресценції, реакція ензиммічених антитіл; реакція латекс-аглютинації. Реакцію латекс-аглютинації з нативним ліквором проводять за наявності ознак гнійного запалення і/або при бактеріоскопічному виявленні збудника. Використання реакції дозволяє в короткий термін (15–20 хв) виявити специфічні антигени менінгококів розповсюджених серогруп (А, В, С, Y, W-135). Реакція зустрічного імуоелектрофорезу дозволяє за допомогою специфічних антисироваток (преципітуючих) до різних серогруп менінгококів протягом 30 хв виявити полісахаридний антиген збудника в спинномозковій рідині й сироватці крові, взятих у хворих у перший день надходження в стаціонар.

Бактеріологічне дослідження. Одночасно з бактеріоскопією проводять посів спинномозкової рідини або її осаду. Менінгокок росте на спеціальних живильних середовищах з нативним білком (сироватковий бульйон і агар). Можна використовувати агар Хоттингера, що містить 0,15 % нерозчинного крохмалю. Краще спинномозкову рідину сіяти після центрифугування при 35 000 об/хв протягом 5 хв. Із дна беруть 0,3–0,5 мл матеріалу й засівають 2–3 краплі на поверхню підігрітого середовища. Посів культивують при температурі 37 °С і підвищеному вмісті вуглекислоти. Для цього в кришку стерильної чашки Петрі кладуть аркуш фільтрувального паперу, просоченого 1,5–2,0 мл 10 % розчину пірогалолу, а зверху другий аркуш, змочений 1,5–2,0 мл 20 % розчину натрію гідрокарбонату.

Чашку з посівом закривають кришкою з аркушами паперу й перевертають її (кришкою донизу). Залишок спинномозкової рідини використовують для реакції зустрічного імуноелектрофорезу.

На 2-й день після інкубації при температурі 37 °С вивчають культуральні властивості. Менінгококи утворюють невеликі, круглі, опуклі, прозорі колонії. У мазках, приготовлених із цих колоній, виявляють поліморфні диплококи й тетракоки. Мікроскопічна картина настільки строката, що створює враження нечистої культури. Колонії пересівають на скошений сироватковий агар. Якщо в чашках зі спеціальними середовищами ріст відсутній, культуру виділяють зі спинномозкової рідини, залитої напіврідким агаром.

На 3-й день дослідження виділену культуру аглютинують менінгоковими сироватками.

Визначення серовару менінгококів проводиться з епідеміологічною метою, використовуючи реакцію аглютинації за Ноблем. По 3 краплі густої суспензії мікроорганізмів наливають у 3 пробірки, потім вносять по 3 краплі нерозведеної або розведеної 1:10 менінгокової сироватки сероварів А, В і С. Суміш збовтують протягом 2–4 хв, після чого в кожен пробірку доливають 10–20 крапель ізотонічного розчину NaCl й ураховують результати.

Для визначення сахаролітичної активності чистої культури проводять посів на середовища з лактозою, глюкозою, мальтозою, сахарозою, фруктозою. Менінгококи ферментують глюкозу й мальтозу з виділенням кислоти. Також проводять посів на 5 % жовтковий агар і сироватковий агар з 5 % цукру. Через 48 год інкубації на поверхню виростилих колоній наносять 1 краплю розчину Люголя. Поява бурого фарбування свідчить про розщеплення полісахариду. Нейсерії ідентифікують за допомогою оксидазної реакції. Для цього на колонію, що сформувалася на сироватковому агарі, наносять краплю 1 % розчину солянокислого парадіетилфенілендіаміну. Колонії з оксидазною активністю, рожевіють, а потім чорніють. Такі колонії відсіюють на сироватковий агар для подальшого дослідження.

Для диференціації менінгокока й непатогенних нейсерій (*Neisseria catarrhalis*) використовують властивість останніх рости на простих живильних середовищах і здатність утворювати колонії при кімнатній температурі (22 °С).

Для виявлення менінгокока в крові у флакони з 50 мл бульйону, що містить 0,1 % агар-агару, засівають 5–10 мл венозної крові. Через добу проводять пересів культури на сироватковий агар. Виділення й ідентифікація культури проводиться так само, як і при дослідженні спинномозкової рідини.

Для серологічної діагностики застосовують РНГА з еритроцитами, сенсibiliзованими групспецифічними полісахаридами.

Реакція непрямой гемаглютинації з "парними" сироватками крові виявляє динаміку росту титрів специфічних антитіл до менінгокока і дозволяє визначити належність збудника до найбільш поширених серогруп менінгококів (А і С). Використання методу дає можливість провести ретроспективну лабораторну діагностику генералізованих форм менінгокової інфекції, оскільки остаточну відповідь отримують тільки через 12–14 днів

після початку захворювання. Переважними можливостями методу є лабораторне підтвердження менінгококцемії, при якій використання інших методів лабораторної діагностики, як правило, малоефективні.

Алгоритм: "Фарбування за Грамом в модифікації Каліни".

Склад барвників:

1. 0,5 % спиртовий розчин діамантового зеленого.
2. Основний реактив (0,5 % спиртовий розчин йодистого калію – 96 мл; 5 % спиртовий розчин йоду – 2 мл).
3. 30 % розчин етилового спирту.
4. Водний розчин фуксину: основний фуксин Циля – 1 мл, дистильована вода – 9 мл.

Спочатку готують 0,5 % спиртовий розчин йодистого калію, підігріваючи на водяній бані до повного розчинення, далі додають розчин основного фуксину і йоду. Розчин зберігають у темному флаконі з притертою або резиною пробкою.

Методика забарвлення: на знежирене скло наносять краплю води і дослідну культуру. До краплі мікробної суспензії додають краплю діамантового зеленого, розподіляючи у вигляді мазка, висушують на повітрі й фіксують у полум'ї пальника. На препарат наносять основний барвник на 1,5–2 хв, далі краску змивають водою. Препарат промивають 30 % розчином спирту до відходження хмарин фарби. Далі знову промивають водою і забарвлюють розчином фуксину протягом 2 хв. Під мікроскопом грамнегативні бактерії – рожеві, грампозитивні – зеленувато-чорні.

Алгоритм: «Проведення реакції аглютинації на склі з метою визначення серогрупи менінгокока».

Реакцію проводять тільки з чистою культурою менінгококів, після ідентифікації. Менінгококи серогруп А, В і С найчастіше є причиною виникнення генералізованих форм менінгокової інфекції. Тому в першу чергу реакцію проводять з антисироватками до менінгококів цих серогруп. На предметне скло, розділене маркером на три частини, наносять фізіологічний розчин (по краплі на кожну частину). Далі стерильною петлею, дерев'яною паличкою або будь-яким іншим аплікатором з поверхні агарового середовища знімають культуру менінгококів і ретельно розчиняють у краплях фізіологічного розчину на склі. Після цього, якщо не виявлено спонтанної аглютинації з фізіологічним розчином, в три підготовлені частини додають антисироватки А, В і С (по краплі) і перемішують. Облік реакції проводять через 1–2 хв. Утворення великих пластівців на тлі повного прояснення аглютинаційного поля вказує на позитивну реакцію специфічної взаємодії антигена і антитіла і дозволяє визначити серогрупу менінгококів. Відсутність реакції з однією з основних серогрупових антисироваток, вказує на необхідність продовження проведення аналогічних досліджень з іншими специфічними антисироватками (Х, Y, Z, W – 135, 29E). Тільки у тому випадку, якщо підтверджений усіма тестами штам менінгокока не показав позитивного результату в реакції аглютинації з повним

набором аглютинуючих антисироваток, його слід віднести до категорії неаглютинуючого штаму (НА).

Термінологія: *Neisseriaceae, Neisseria meningitidis, Neisseria catarrhalis.*

Запитання для контролю знань

1. Менінгококи. Морфологія і біологічні властивості. Антигенна структура. Стійкість до чинників навколишнього середовища.

2. Роль у патології людини. Патогенез менінгококової інфекції. Імунітет.

3. Правила взяття матеріалу при різних формах менінгококової інфекції, доставка його до лабораторії. Заходи безпеки. Лабораторна діагностика. Профілактика менінгококової інфекції.

Тестові завдання

1. Що стимулює ріст менінгокока на живильному середовищі і підвищує достовірність виділення мікробів?

A. Додавання жовчі.

B. Підвищення концентрації CO_2 .

C. Внесення жовткової суспензії в живильне середовище.

D. Додавання гліцерину.

E. Додавання телуриту калію.

2. Які сахаролітичні властивості характерні для *N. meningitidis*?

	Глюкоза	Сахароза	Лактоза	Маніт	Мальтоза
A.	+	-	-	-	+
B.	-	-	-	+	-
C.	+	+	+	+	+
D.	+	-	+	+	+
E.	+	-	+	-	-

3. Який матеріал досліджується для виявлення менінгококового носійства?

A. Слиз із носа.

D. Зскрібок зі шкіри.

B. Слиз із зівя.

E. Зскрібок із кон'юнктиви.

C. Слиз із задньої стінки глотки.

4. Хворій дитині лікар поставив діагноз «менінгококовий назофарингіт». Який метод лабораторної діагностики найбільш раціональний для підтвердження діагнозу?

A. Мікроскопічний.

C. Біологічний.

E. Алергічний.

B. Бактеріологічний.

D. Серологічний.

5. Охарактеризуйте ріст менінгокока у бульйоні з сироваткою.

A. Ніжна блакитна плівка.

D. Легка муť і невеликий осад.

B. Суха, зморшкувата плівка.

E. Великий пластівчастий осад.

C. Дифузне помутніння.

6. З якою метою в сироватковий агар додається ристоміцин?

A. Покращує ріст нейсерій.

B. Пригнічує супутню мікрофлору.

C. Для визначення чутливості нейсерій до цього антибіотика.

D. Для визначення культуральних властивостей.

E. -.

Тема: Лабораторна діагностика хвороб, спричинених патогенними коками (гонококи)

Кількість годин : 2.

Обґрунтування теми. Гонокок уперше був відкритий А. Нейссером у 1879 році. Термін "гонорея" запропонував Гален у II ст. н. е., але описання захворювання згадується ще в грецьких, вавилонських і ассирійських міфах. У наш час гонорею відносять до найбільш поширених інфекційних хвороб. За частотою захворюваності в багатьох розвинених країнах вона перебуває на другому місці після грипу. За даними ВООЗ, на кінець XX ст. кожного року хворіли понад 200 млн людей планети; в деяких країнах Центральної Африки та Азії вона набула характеру пандемії. Відмічається постійне зростання захворюваності серед осіб віком від 15 до 18 років.

Мета заняття

– загальна: оволодіти мікробіологічною діагностикою хвороб, спричинених гонококами;

– конкретна:

а) знати:

1. Правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом (Державні санітарні правила – ДСП 9.9.5.03599).

б) вміти:

1. Підготувати робоче місце лаборанта.

2. Дотримуватися правил роботи і техніки безпеки з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, апаратурою.

3. Відбирати та транспортувати матеріал для дослідження при підозрі на інфекцію, обумовлену патогенними коками.

4. Готувати матеріал, який надійшов від хворого з підозрою на інфекцію, обумовлену патогенними коками.

5. Досліджувати матеріал за допомогою методів, призначених для виявлення патогенних коків.

6. Давати оцінку результатам дослідження та заповнювати відповідну лабораторну документацію.

Матеріальне та методичне забезпечення: музейні мікропрепарати, мікроскоп, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, таблиці, атлас.

Зміст теми. *N. gonorrhoeae* (від грец. *gonos* – сім'я і *rhoe* – витікати) – збудник венеричної хвороби, яка характеризується запаленням слизових оболонок переважно сечостатевої системи та кон'юнктиви очей.

Морфологічні та тинкторіальні властивості. Клітини гонокока нагадують за формою кавове зерно, біб або нирку, розміщені попарно, інколи у вигляді коротких ланцюжків, повернені один до одного увігнутою поверхнею; поліморфні, їх розміри становлять у середньому від 0,7–0,8 до 1,6–1,8 мкм, можуть утворювати паличкоподібні форми. Вони не мають спор, утворюють капсулу, нерухливі, грамнегативні. Капсула за-

хищає гонокок від фагоцитозу, антитіл і відіграє суттєву роль у патогенезі хронічної гонореї. Під впливом пеніциліну легко переходять у L-форму, розміри яких можуть бути від 6–8 мкм до гігантських – 600–800 мкм. При хронічній гонореї виявляються клітини різного розміру, форми та інтенсивності забарвлення (диплококи типу Аша).

Культуральні властивості. Гонококи вибагливі до живильних середовищ, розмножуються на середовищах, що містять сироватку крові, відвар кролячого м'яса або свіжих бичачих сердець, автолізат дріжджів, гемогідролізат, жовток свіжих курячих яєць, асцитичну рідину, кров. Оптимальною температурою росту є 36–37 °С, рН 7,6–7,8. Гонококи – облигатні аероби, в первинних посівах потребують капнофільних умов (10–20 % CO₂) і підвищеної вологості.

На щільних живильних середовищах гонококи утворюють дрібні, безбарвні, блискучі колонії, мають вигляд краплини. На кров'яному агарі гонококи не спричиняють гемоліз. У рідких живильних середовищах дають дифузний ріст і плівку на поверхні.

Ферментативні властивості. Ферментативна активність низька і непостійна. Типові гонококи розщеплюють тільки один вуглевод – глюкозу до кислоти без газу, продукують оксидазу, каталазу, не проявляють протеолітичних властивостей.

Антигенні властивості. Антигенна структура у гонокока неоднорідна і змінюється у дочірніх популяціях. Мають соматичний і капсульний антигени. За білковим антигеном поверхневої мембрани гонококи поділяють на 16 серотипів. Виявлені перехреснореагуючі антигени з людським В-антигеном еритроцитів. Останнє пояснює специфічну цитопатогенну дію гонококів на еритроцити людей з III (B) і IV (AB) групами крові, а також тяжкі ускладнення в осіб цих груп крові у разі їх лікування гоноковакциною.

Резистентність. Гонококи малостійкі в навколишньому середовищі; вони швидко гинуть під дією прямих сонячних променів, ультрафіолетового опромінювання, висушування, підвищеної температури (швидко втрачають життєздатність при температурі 40 °С), але в гною, на вологій білизні можуть зберігатися до їх висихання. На поверхні предметів (рушник, туалетний папір, ватні тампони) за кімнатної температури зберігаються життєздатними протягом 3–4 діб, що відіграє суттєву роль у побутовій передачі гонореї.

Дезінфекційні розчини діють згубно протягом декількох хвилин. Чутливі до пеніцилінів, тетрациклінів, стрептоміцину.

Фактори патогенності:

- фімбрії (пілі) – фактор адгезії і колонізації, основний фактор патогенності; гонококи, які втратили їх, стають авірулентними;
- ліпополісахарид клітинної стінки – ендотоксин;

- білки поверхневої мембрани виконують функцію адгезії, інвазії, пригнічують фагоцитоз;
- капсула пригнічує фагоцитоз;
- протеаза – фермент, який розщеплює молекули IgA; це послаблює захисну функцію слизових оболонок, зумовлену секреторними IgA.

Епідеміологія. Джерелом інфекції є інфікована людина (хворий, носій). Шляхи передачі – переважно прямий контакт (статевий, рідко під час поцілунків), а також контактано-побутовий (через білизну, рушник та ін.). У разі перенесення збудника руками, забрудненими виділеннями із сечостатевих органів (наприклад, перенесення збудника на кон'юнктиву), може виникнути аутоінфекція.

Патогенез і клінічна картина. Вхідними воротами для збудника є слизові оболонки сечівника, піхви, шийки матки, кон'юнктиви і прямої кишки. Інкубаційний період триває 3–5 діб, але може коливатися від 1 до 15 діб і більше. Після проникнення через епітелій статевих органів гонококи поширюються в навколишні тканини: залози, яєчники, матку, маткові труби, яєчка (ураження статевої системи призводить до безплідності). Потім вони проникають у кров (спричиняють септицемію); у синовіальні оболонки суглобів, серце та інші органи, де зумовлюють запальні процеси (артрит, періостит, ендокардит, перикардит, плеврит, пневмонію, міозит, перитоніт, перигепатит, васкуліт); у нервову систему, що призводить до зниження інтелекту, психозу, радикуліту, менінгіту, ураження зорового і слухового нервів; у шкіру (висип на шкірі). Унаслідок статевих контактів (гомосексуалізм та ін.) або при аутоінфекції збудник може потрапляти в інші органи, тому розрізняють гонорею прямої кишки, сечового міхура, ниркових мисок, нирок, порожнини рота, носа, глотки, мигдаликів, гортані, вуха, очей. У жінок і чоловіків часто трапляється мікст-інфекція. Можлива асоціація гонокока з хламідіями, мікоплазмами, гарднерелами, трихомонадами, вірусами, грибами.

Захворювання характеризується різью при сечовиділенні, виділення гною з уретри. Нелікована гонорея є однією з основних причин безпліддя як у чоловіків, так і у жінок та може призвести до сліпоти.

У дитини, народженої від інфікованої жінки, гонококи можуть потрапляти в очі (розвивається гонококовий кон'юнктивіт – бленорея), рот, пряму кишку, пуповину, зовнішні статеві органи. Відомі випадки розвитку у новонароджених гонококового сепсису, менінгіту, артрити, що є результатом внутрішньоутробного інфікування плода.

Залежно від інтенсивності реакції організму на проникнення гонококів, тривалості перебігу і клінічного прояву розрізняють такі клінічні форми гонорей: свіжу (гостру і підгостру), якщо з моменту захворювання пройшло не більше 2 міс; хронічну, якщо після початку захворювання пройшло більше 2 міс або початок захворювання невідомий. Розвитку хронічної

гонореї сприяє перетворення збудника на L-форму. Латентна інфекція або гонококоносійство характеризується відсутністю клінічних ознак хвороби, але збудник виділяється. Безсимптомний перебіг інфекції у чоловіків і жінок створює великий резервуар інфекції.

Імунітет. Природна резистентність до гонокока у людей відсутня. У перехворілих у крові накопичуються антитіла у високих титрах, але вони не виконують захисної функції. Фагоцитоз при гонореї має незавершений характер, тому можливі суперінфекція і реінфекція.

Мікробіологічна діагностика. Лабораторні дослідження проводять для підтвердження діагнозу, для визначення виліковності, а також за епідеміологічними показниками. Матеріалом для дослідження є виділення із сечівника, парауретральних ходів, шийки матки, прямої кишки, очей, ротової порожнини, глотки, мигдаликів, секрет передміхурової залози, а також кров. Матеріал із сечівника відбирають не раніше, ніж через 4–5 год після сечовиділення. Взятий для бактеріологічного дослідження матеріал слід оберігати від охолодження.

Для дослідження переважно використовують мікроскопічний і бактеріологічний методи, інколи – метод імунофлюоресценції, імунохімічний і серологічний.

Мікроскопічне дослідження є найбільш достовірним методом лабораторної діагностики гострої гонореї. Мазки зазвичай фарбують метиленовим синім і за Грамом. Під час бактеріоскопічного дослідження враховують три ознаки гонокока: бобоподібну форму, розміщення всередині лейкоцитів і на поверхні епітеліальних клітин, тинкторіальні властивості.

Бактеріологічне дослідження проводять при хронічній і латентній формах інфекції. Залежно від умов культивування і якості середовища ріст колоній з'являється через 1–8 діб після посіву. За наявності відповідних клінічних ознак для підтвердження діагнозу достатньо отримати культуру грамнегативних оксидазопозитивних диплококів.

Мікроскопічне та бактеріологічне дослідження використовують також для визначення виліковності хворих на гонорею. Оскільки клінічні ознаки хвороби не проявляються і гонококи не виявляються, штучно проводять загострення інфекції (провокацію). Для цього використовують різні методи, у тому числі й внутрішньом'язове введення $0,5 \text{ см}^3$ (500 млн мікробних клітин) гонококової вакцини, введення якої частіше комбінують із пірогеналом або продигіозаном. Якщо після 3-разової провокації після закінчення лікування гонокок не виявляється в мазках і у посівах патологічного матеріалу, хворого вважають вилікованим.

Імунофлюоресцентний метод і метод імунофорезу (імунохімічний) є найбільш специфічними і швидкими способами виявлення гонококів – експрес-методи.

Серологічні дослідження (РЗК, РПГА) мають допоміжне значення, тому зазвичай для виявлення гонококової інфекції і визначення виліковності не використовуються.

Профілактика. Специфічна профілактика відсутня. Гонококова інфекція призводить до втрати працездатності, економічних витрат, а також створює велику демографічну проблему через те, що є причиною жіночого і чоловічого безпліддя. Для профілактики гонореї (та інших венеричних хвороб) велике значення має підвищення морального і культурно-гігієнічного рівня населення, запобігання випадковим статевим контактам, виявлення і лікування хворих та їх статевих партнерів.

Для профілактики бленореї дітям одразу після народження закладають у кон'юнктивальний мішок 1 % тетрациклінову, 1 % еритроміцинову мазь для очей або 1 % розчин нітрату срібла.

Лікування. Серед етіотропних препаратів використовують антибіотики: пеніциліни (амоксцилін, бензилпеніциліну натрієву сіль, біциліни, ампіокс), тетрацикліни, макроліди (еритроміцин, олететрин), аміноглікозиди (мономіцин, канаміцин), цефазолін, сульфаніламідні препарати (сульфамонотатоксин, сульфодиметоксин, бісептол, сульфатон), імуномодулятори (пірогенал, метилурацил, левамізол, продигіозан). Для лікування хронічної гонореї призначають гонококову вакцину як допоміжний метод лікування в комбінації з іншими видами терапії.

Хворого знімають з обліку тільки після негативних результатів, отриманих під час визначення виліковності гонореї.

Практичні навички з теми

1. Визначення морфотинкторіальних властивостей гонокока.
2. Визначення культуральних і біохімічних властивостей гонокока.
3. Проведення реакції зв'язування комплементу.

Алгоритми лабораторної роботи

Алгоритм: *"Правила забору матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену гонококами".*

Матеріал для дослідження: відокремлюване слизової оболонки уретри, піхви і шийки матки, гнійні виділення з очей, кров для отримання сироватки. При хронічній гонореї, коли кількість виділень різко зменшується, у чоловіків досліджують осад ранішньої сечі. За 2–3 дні до взяття матеріалу хворому не вводять антибіотики, асептичні засоби і не проводять спринцювань. Матеріал відразу засівають на живильні середовища, оскільки гонокок дуже чутливий до температурних коливань, висихання, навіть у гнійному вмісті гине протягом декількох годин.

Взяття матеріалу. У чоловіків досліджують виділення із сечівника, парауретральних ходів, у деяких випадках – з прямої кишки, гортані, мигдаликів. Взяття матеріалу із сечівника проводять не раніше 4–5 год. після сечовиділення. Отвір сечівника протирають ватним тампоном, змоченим

стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду, натискають пальцем на задню стінку сечовипускального каналу зсередини назовні (у жінок для цього вводять у піхву вказівний палець) і видавлюють краплю гною. Перші краплі виділень витирають тампоном, а подальші використовують для виготовлення мазків і для посівів на живильні середовища. Секрет передміхурової залози отримують шляхом її масажу.

Матеріал можна відбирати ложкою Фолькмана, а для посіву – бактеріологічною петлею. Для цього ложку або петлю просувають у сечівник на глибину 3–4 см.

Під час обстеження жінок обов'язково беруть матеріал із сечівника, цервікального каналу і піхви, а в разі потреби – із прямої кишки, горла, мигдаликів. Отвір сечівника протирають сухим ватним тампоном, сечівник притискають до лобкової кістки, матеріал відбирають ложкою Фолькмана або жолобкуватим зондом, уводячи інструмент у сечівник на 1,5–2 см.

Шийку матки протирають сухим ватним тампоном, виділення беруть довгим гінекологічним пінцетом, просуваючи його у цервікальний канал на 2 см. У дівчаток досліджують виділення слизової оболонки сечівника, піхви і прямої кишки. Матеріал забирають так само, як у жінок, але з піхви беруть обережно жолобкуватим зондом або вушною ложкою через гіменальний отвір.

При бленорей відокремлюване кон'юнктиви знімають петлею і розподіляють на склі.

Алгоритм: *"Хід мікробіологічного дослідження матеріалу при підозрі на інфекцію, обумовлену гонококами".*

Дослідження бактеріоскопії є основним методом діагностики гострої гонорей і бленорей. Мікропрепарати забарвлюють лужним розчином метиленового синього і за Грамом (2 мазки). При мікроскопії гонококи мають вигляд бобоподібних грамнегативних диплококів, розташовані позаклітинно або усередині клітин (нейтрофільних гранулоцитів) подібно до менингококів.

Забарвлення за Грамом дозволяє диференціювати гонококи з іншими бактеріями. Для отримання чіткіших контурів гонококів мазки слід фіксувати за допомогою диметилсульфоксиду (димексиду). На мазок наливають димексид до повного висихання, потім забарвлюють. У зв'язку з тим, що в досліджуваному матеріалі можуть знаходитися й інші грамнегативні бактерії, схожі з гонококами, застосовують прямий і непрямий методи імунофлюоресценції. При прямому методі мазки обробляють флюоресцюючими антитілами проти гонококів, при непрямому використовують відомі мікроорганізми (гонококи) і сироватку хворого. З'єднання антитіла з антигеном стає видимим при додаванні флюоресцюючої сироватки проти глобулінів людини.

Бактеріологічне дослідження проводять у тих випадках, коли гонококи в мазках не виявляють або знаходять нетипові, змінені форми. Чисту культуру гонокока з наступною ідентифікацією обов'язково виділяють при підозрі на хронічну гонорею, а також при екстрагенітальній гонорейі і при гонорейі у дітей. Зважаючи на особливу чутливість гонокока до температурного чинника матеріал для дослідження не транспортують. Крім того, гонокок дуже чутливий до дезінфікуючих речовин, тому за 1–2 дні до посіву необхідно виключити застосування хворим дезінфікуючих речовин і припинити антибактеріальну терапію.

Посів проводять безпосередньо після взяття матеріалу в чашки з асцитичним агаром або 2,5 % МПА, приготовленого на кролячому м'ясі. Для цієї мети широко використовуються безасцитні середовища з гідролізатом казеїну, дріжджовим аутолізатом і нативною сироваткою великої рогатої худоби. Додавання до живильного середовища ристоміцину і поліміксину М (10 ОД/мл) значно підвищує висівання гонококів. Перед посівом живильне середовище слід нагрівати в термостаті. Для кращого росту гонококів чашки з посівами поміщають в ексікатор, де концентрація CO₂ досягає 10 %.

Через добу інкубації посівів при температурі 37 °С з'являються прозорі, з рівними краями, опуклі, слизової консистенції колонії гонокока, які нагадують краплі роси. Виділяють чисту культуру й ідентифікують її.

Для визначення оксидазної активності культуру висівають в жовткове середовище (до 100 мл МПА з кролячого м'яса додають 1,5 г глюкози, 6 мл розчину фенолового червоного і 16 мл жовтка курячого яйця).

Аглютинація специфічною сироваткою не завжди дає позитивні результати, оскільки гонокок має багато сероварів, а в сироватці є аглютиніни в низькому титрі.

Серологічну діагностику проводять при хронічній гонорейі, коли у хворого відсутні виділення і провести дослідження бактеріоскопіі і бактеріологічного не можливе. У цих випадках використовують РЗК із сироваткою крові хворого. Як антиген застосовують гонококову вакцину або спеціальний антиген, який готують з убитих різними способами гонококів (частіше антиформіном).

Термінологія: *Neisseriaceae, Neisseria gonorrhoeae.*

Запитання для контролю знань

1. Гонококи. Морфологія та біологічні властивості. Антигенна структура. Стійкість до чинників навколишнього середовища. Роль у патології людини.

2. Правила взяття та доставки матеріалу в лабораторію. Особливості діагностики гострої та хронічної гонорейі.

3. Профілактика бленорейі. Специфічне лікування хворих на гонорею.

Тестові завдання

1. Відомо, що одним з основних методів діагностики хронічної гонореї є серологічний метод. Назвіть серологічну реакцію, яка використовується в діагностиці гонореї.
A. РА. B. РГА. C. РГГА. D. РП. E. РЗК.
2. При мікроскопії гнійних виділень уретри виявили грамнегативні бактерії, що нагадують кавові зерна, розташовані в лейкоцитах. Виділена культура ідентифікована як гонокок. Які ферментативні властивості характерні для гонокока?
*A. Розщеплювання глюкози і мальтози до кислоти.
B. Розщеплювання глюкози до кислоти.
C. Розщеплювання глюкози, мальтози і сахарози до кислоти.
D. Розщеплювання короткого строкатого ряду до кислоти.
E. Ферментативні властивості не виражені.*
3. Який матеріал досліджується при бактеріологічній діагностиці бленореї?
*A. Спинномозкова рідина. D. Виділення уретри.
B. Кров. E. Сеча.
C. Гнійне виділення кон'юнктиви.*
4. У бактеріологічну лабораторію доставлені гнійні виділення з шийки матки хворої з підозрою на гонорею. Яке слід обрати живильне середовище для первинного посіву?
*A. МПБ. C. Сироватковий агар. E. Жовтково-сольовий агар.
B. МПА. D. Середовище Ендо.*
5. Вкажіть особливості транспортування патогенного матеріалу у бактеріологічну лабораторію при підозрі на гонококову інфекцію:
*A. Допускається доставка матеріалу впродовж 12 год.
B. Допускається доставка матеріалу протягом доби.
C. Незайний посів патологічного матеріалу біля ліжка хворого.
D. Доставка матеріалу в замороженому стані.
E. Усі відповіді правильні.*
6. Який патологічний матеріал відбирають для бактеріологічного дослідження при підозрі на гонококову інфекцію?
*A. Відокремлюване слизової оболонки піхви і шийки матки.
B. Відокремлюване слизової оболонки уретри.
C. Кров.
D. Гнійні виділення з очей.
E. Усе перераховане.*

Література

Основна:

1. Борисов Л.В. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л.В. Борисов. – М. : Медицина, 1984. – 255 с.
2. Гирін В.М. Посібник з медичної вірусології / В.М.Гирін. – К. : Здоров'я, 1995. – 367 с.
3. Микробиология / А.В. Воробьев, А.С. Быков, Э.П. Пашков, А.М. Рыбакова. – М. : Медицина, 2004. – 690 с.
4. Микробиология / И.Л. Дикий, И.Ю. Холупяк, Н.Е. Шевелева, М.Ю. Стегний. – Харьков : Прапор, изд. УкрФА, 1999. – 413 с.
5. П'яткін К.Д. Мікробіологія з вірусологією та імунологією / К.Д. П'яткін, Ю.С. Кривошеїн. – К. : Вища шк., 1992. – 431 с.
6. Ситнік І.О. Мікробіологія, вірусологія, імунологія / І.О. Ситнік, С.І. Климиюк, М.С. Творко. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1998. – 392 с.
7. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: [учебн. пособие] / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М. : ОАО "Издательство медицина", 2005. – 600 с.
8. Федорович У.М. Спеціальна мікробіологія / У.М. Федорович. – Львів : Ахіл, 2002. – 475 с.
9. Микробиология / Ф.К. Черкес и др. – М. : Медицина, 1987. – Ч. 2. – 512 с.

Додаткова:

1. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Н.П. Елинова и др. – М. : Медицина, 1988. – 208 с.
2. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабычев. – СПб. : Специальная литература, 1998. – 561 с.
3. Люта В.А. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень та основи імунології / В.А. Люта, О.В. Кононов : У 2 кн. Кн.1. Загальна мікробіологія : підручник. – К. : Здоров'я, 2006. – 512 с.
4. Медицинская микробиология / под ред. В.И. Покровского. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 768 с.
5. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / под ред. В.В. Теца. – изд. 2-е, перераб. и доп. – М. : Медицина, 2002. – 352 с.
6. Медицинская микробиология / под ред. А.М. Королюка и В.Б. Сбойчакова. – СПб., 2002. – 267 с.
7. Конспект лекцій.

Навчальне видання

МОДУЛЬ 3

Частина 1

ПАТОГЕННІ КОКИ

**Методичні вказівки
з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія
та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до
практичних занять
для студентів-бакалаврів III–IV курсу
за спеціальністю "Лабораторна діагностика"**

Упорядники Мінухін Валерій Володимирович
 Коваленко Наталія Іллівна
 Замазій Тетяна Миколаївна

Відповідальний за випуск В.В. Мінухін

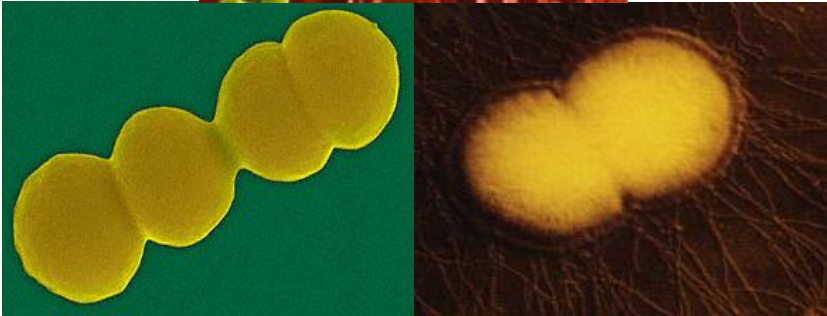


Редактор М.В. Тарасенко
Коректор Є.В. Рубцова
Комп'ютерна верстка О.Ю. Лавриненко
Комп'ютерний набір Т.М. Замазій

План 2014, поз. 107¹.
Формат А5. Ризографія. Ум. друк. арк. 3,5.
Тираж 150 прим. Зам. № 14-3121.

Редакційно-видавничий відділ
ХНМУ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022
izdatknmu@mail.ru, izdat@knmu.kharkov.ua

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавництв, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції серії ДК № 3242 від 18.07.2008 р.



МОДУЛЬ 3

Частина 1 ПАТОГЕННІ КОКИ

***Методичні вказівки
з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія
та імунологія з мікробіологічною діагностикою"
до практичних занять
для студентів-бакалаврів III–IV курсу
за спеціальністю "Лабораторна діагностика"***