МІНІСТЭРСТВА
АХОВЫ ЗДАРОЎЯ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ЗАГАД

ПРИКАЗ

«13» февраля 2006 г. № 81

г. Мінск

г. Минск

Об утверждении Инструкции о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов

В соответствии со статьей 5 Закона Республики Беларусь «О санитарно-эпидемическом благополучии населения» от 23 ноября 1993 года в редакции Закона Республики Беларусь от 23 мая 2000 года, подпункта 7.1 пункта 7 Положения о Министерстве здравоохранения Республики Беларусь, утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 23 августа 2000 года № 1331 в редакции постановления Совета Министров Республики Беларусь от 1 августа 2005 года № 843 и в целях улучшения микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов
ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить прилагаемую Инструкцию о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов.

2. Считать утратившим силу Приложение 3 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22 декабря 2004 года № 286 «О мерах по совершенствованию профилактики и диагностики менингококковой инфекции».

3. Контроль за выполнением настоящего приказа возложить на заместителя Министра - Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь Римжу М.И.

Исполняющий обязанности Министра В.П. Руденко

УТВЕРЖДЕНО
Приказ
Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
13 февраля 2006 № 81

ИНСТРУКЦИЯ
о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов

РАЗДЕЛ I
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ

ГЛАВА 1
ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных менингитов (далее – ГМ) осуществляется бактериологическим методом путем выделения и идентификации возбудителя, серологическим - путем выявления специфических антигенов в жидкостях организма (ликвор, кровь, синусоидальная жидкость и др.) или антител в сыворотке крови. Лабораторное обследование проводят с диагностической целью и по эпидемиологическим показаниям. С диагностической целью обследуют больных с клинически выраженной формой заболевания, локализованной формой (назофарингит) и с подозрением на менингококковую инфекцию и менингиты иной этиологии.

2. По эпидемиологическим показаниям обследуют лиц, бывших в контакте с больными менингококковой инфекцией.

ГЛАВА 2
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ И ДРУГИХ ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ

3. В связи с тем, что наряду с менингококками, наиболее частыми этиологическими факторами гнойных менингитов могут быть пневмококки, а у детей младшего возраста H.influenzae и др. возбудители, представ-

ляется целесообразным изложение основных дифференциально-диагностических признаков и методов выделения этих микроорганизмов. По классификационной систематике бактерий Bergey (I том, 1997г., 9 издание), менингококки принадлежат к семейству Neisseriaceae роду Neisseria, к группе 4 – грамотрицательные аэробные/ микроаэрофильные палочки и кокки и к подгруппе 4 А – Аэробы. Род нейссерий включает два вида патогенных микроорганизмов: N.meningitidis и N. gonorrhoeae, остальные представители этого рода являются резидентной флорой слизистых оболочек. К последним относятся пигментообразующие, объединенные в один вид N. subflava, а также N.sicca, N.mucosa, N.flavescens, N.lactamica. Катаральный диплококк выделен в род Moraxella и обозначен как Moraxella (Branhamella) catarrhalis.

Менингококки требовательны к условиям культивирования. При росте требуют повышенной влажности и 5-10% содержания CO_2 в воздухе. Менингококки очень чувствительны к малейшим отклонениям температуры, посевы следует производить с использованием электрогрелки, после предварительного подогрева питательных сред в термостате. Посевы можно извлекать из термостата не более чем на 30 минут. Патогенные нейссерии мало жизнеспособны во внешней среде. Пересевы способствуют утрате специфических антигенов, что мешает правильной идентификации культур. Поэтому все дифференциально-диагностические признаки нейссерий желательно изучать одномоментно, у свежевыделенной или претерпевшей 1-2 пересева культуры.

4. Основой для приготовления сред служат бульоны на основе гидролизата мяса по Хоттингеру, рыбного гидролизата. Приоритетным является использование питательных сред специального назначения с селективными и поливитаминными добавками. Для посева крови и ликвора (в норме стерильные жидкости), обязательно применение питательных сред (менингококк агара, сывороточного агара, 0,1% полужидкого сывороточного агара) лишенных ингибиторов. Для посева носоглоточной слизи используют питательные среды с ингибиторами. В качестве источника нативного белка рекомендуется применять сыворотку крупного рогатого скота, или лошадиную. Для инактивации комплемента и ферментов сыворотки ее следует прогревать при t 56^0C в течение 30 мин. Питательные среды, а также сыворотки крови должны быть обязательно проверены на пригодность для культивирования менингококка. Проверку необходимо проводить со свежевыделенной культурой или эталонным штаммом менингококка, хранившимся в высушенном состоянии.

5. Идентификация вида N.meningitidis основана на комплексе морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических признаков согласно приложению 1 к настоящей Инструкции. Менингококки, как и все нейссерии, представляют собой неподвижные кокки, не образующие

спор, одиночные или, чаще, в парах (соприкасающиеся стороны клеток при этом уплощены). При первом выделении менингококкам свойственен полиморфизм, который проявляется в различной величине и разной интенсивности окрашивания микробных клеток. Колонии менингококков на менингококк агаре и сывороточном агаре бесцветные, круглые с ровным краем, опалесцирующие, выпуклые, имеют маслянистую консистенцию, легко снимаются петлей со среды. Некоторые штаммы, выделенные из спинномозговой жидкости (далее – СМЖ), могут обладать слабой ферментативной активностью в отношении глюкозы или мальтозы или обоих углеводов. Большинство непатогенных видов нейссерий, в отличие от патогенных, способны при выращивании на сывороточном агаре с 5% сахарозы образовывать крахмалоподобное вещество (полисахарид), выявляемое с помощью водного раствора Люголя, в виде появления бурого окрашивания культуры.

Менингококки делятся на следующие серогруппы: A, B, C, X, Y, Z, 29E, Д, 135W, К, Н. Проведение серологического группирования менингококков является обязательным для практических лабораторий, как одна из мер эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией.

Наличие ферментов оксидазы и каталазы присуще всем нейссериям и M. catarrhalis в отличие от гемофилов и пневмококков, что может служить дифференцирующим признаком при идентификации в сочетании с другими согласно приложению 2 к настоящей Инструкции. При первичном выделении менингококк не способен расти на бессывороточном агаре при t 37^0C. Другой признак – отсутствие роста менингококков на сывороточном агаре при t 20, 22^0C (но не комнатная t). Это свойство не является постоянным для непатогенных нейссерий, которые при первичном выделении также могут не расти в этих условиях, поэтому оно не оценивается как обязательное при дифференциации бактерий. В отличие от непатогенных нейссерий, менингококки не растут на питательных средах с желчью.

6. Пневмококки и гемофилы, как и менингококки, являются высокотребовательными к культивированию микроорганизмами. В качестве фактора, способствующего их росту, используют кровь различного происхождения. Поэтому универсальной средой для всех возбудителей может служить «шоколадный» агар. Заболевания, где этиологическим агентом являются гемофилы, характеризуются воздушно-капельным механизмом передачи, что способствует их широкому распространению. Среди видов гемофильных бактерий, наибольшей патогенностью обладает Haemophilus influenzae.

Этот возбудитель имеет несколько специфических сероваров: a, в, c, из которых ведущую роль в этиологии генерализованных гнойно-септических инфекций играет инкапсулированная форма серовара «в» (Hiв), относящейся к биотипу 1.

7. Для проведения достоверной бактериологической диагностики гнойных бактериальных менингитов необходимо обеспечить забор материала от больных в полном объеме с соблюдением сроков забора, доставки патологического материала и условий транспортировки.

Материал для исследований доставляется в бактериологическую лабораторию немедленно после забора в термоконтейнерах.

При невозможности немедленной доставки рекомендуется использовать коммерческие транспортные системы Стюарта и др., готовые к употреблению, предназначенные для транспортировки требовательных микроорганизмов.

В бактериологическую лабораторию материал доставляется в следующем виде:

ликвор для бактериоскопии, первичного посева и серологических исследований в количестве не менее 2,0 мл;

ликвор в 0,1% полужидком сывороточном агаре (среда обогащения) для бактериологического накопления культуры; 0,5 мл ликвора немедленно у постели больного засевают в 5 мл полужидкого сывороточного агара, подогретого в термостате при температуре 37^0С;

мазки ликвора для бактериоскопии;

«толстая капля» крови для бактериоскопии;

для посева крови и СМЖ используются коммерческие среды во флаконах с двухфазной средой, одноразовые флаконы со специальной средой для автоматизированной системы BacT/ALERT 3D, двухфазные среды на основе «шоколадного» агара;

кровь в 0,1% полужидком сывороточном агаре (среда обогащения): 5 мл крови засевают в 50 мл 0,1% полужидкого агара, подогретого в термостате при температуре 37^0С;

кровь в количестве не менее 2,0 мл для серологических исследований.

ГЛАВА 3
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНОГО

8. 1-й день исследования. Спинномозговую жидкость в количестве 2-5 мл берут у больного сразу же при поступлении в стационар. С целью недопущения контаминации посторонней микрофлорой взятие ликвора производят, как правило, два человека, врач и медицинская сестра, с соблюдением всех правил асептики.

Первую порцию СМЖ (около 1 мл) берут в отдельную пробирку для проведения общего ликворологического исследования.

Вторую порцию, 1-2 мл предназначенную для бактериологического исследования, забирают в стерильную центрифужную пробирку. Касаться руками краев канюли, иглы и краев пробирки нельзя. Ватно-марлевую пробку полагается держать на весу за ее наружную часть. Одновременно готовят два мазка для микроскопического исследования. На поверхность предметного стекла наносят две капли ликвора, мазки высушивают на воздухе. Не следует распределять материал по большой поверхности, так как при этом снижается вероятность обнаружения микроорганизмов. Если немедленно доставить жидкость в лабораторию невозможно, допустимо хранение ее в течение 1-2 часов в термостате при температуре 37^0 С. Во время транспортировки СМЖ следует тщательно предохранять от охлаждения. СМЖ исследуют немедленно при доставке в лабораторию. Стерильной пастеровской пипеткой со дна пробирки берут 0,3-0,5 мл материала и по 2-3 капли засевают на поверхность 4 чашек Петри с подогретыми питательными средами. Одна чашка содержит менингококк агар (без добавок) или сывороточный агар, вторая – «шоколадный» агар, третья – кровяной агар, четвертая – агар Эндо. Посевы с менингококк агаром, сывороточным агаром и «шоколадным» агаром ставят в термостат при 37^0С и создают условия повышенного содержания CO_2 в атмосфере термостата. Посевы с кровяным агаром и агаром Эндо инкубируют при 37^0С в условиях обычной атмосферы.

Для посева СМЖ наряду с прямым посевом используют коммерческие среды во флаконах с двухфазной средой, одноразовые флаконы со специальной средой для автоматизированной системы BacT/ALERT 3D.

Спинномозговую жидкость, оставшуюся в пробирке, используют для посева на среду «обогащения» (полужидкий сывороточный агар), 0,5 мл жидкости засевают в 5 мл 0,1% полужидкого сывороточного агара, подогретого в термостате при t 37^0С.

Для прямого выявления в СМЖ антигенов (N.meningitidis A, B, C, H.influenzae typeB (Hib), Str.pneumoniae 83 серотипов) используются коммерческие наборы для латекс-агглютинации.

При достаточном количестве исследуемого материала необходимо 2-3 капли засеять на чашку со средой Muller Hinton Agar с 20% сыворотки для определения чувствительности к антибиотикам.

Оставшийся материал используют для приготовления мазков, окрашивают метиленовым синим и по Граму.

Менингококки в мазке, имеющем голубой фон, выглядят в виде мелких темно-синих, располагающихся по одному, парами или кучками кокков с небольшим бесцветным ореолом среди окрашенных в темно-синий цвет ядер лейкоцитов.

Микроскопия окрашенных мазков спинномозговой жидкости в известной части случаев позволяет установить наличие бактерий, вызываю-

щих гнойный менингит. H. influenzae видна в виде мелких полиморфных грамотрицательных палочек и нитей, окруженных еле заметной нежной капсулой.

Пневмококки имеют вид ланцетовидных грамположительных диплококков, образуют капсулу. Результаты бактериоскопии немедленно сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа.

9. 2-й день исследования. Независимо от результатов бактериоскопии ликвора просматривают засеянные чашки. Во внимание принимают все колонии. Чашки с отсутствием роста инкубируют дополнительно одни сутки. Готовят препараты-мазки, окрашивают, ставят биохимические тесты – на оксидазу, каталазу, уреазу. Отношение к окраске по Граму у нейссерий выражено недостаточно четко, они окрашиваются по Граму классическим методом, или с использованием реактива Фортиса и 1% раствора сафранина.

Колонии менингококков на менингококк агаре и сывороточном агаре бесцветные, круглые с ровным краем, опалесцирующие, выпуклые, имеют маслянистую консистенцию, легко снимаются петлей со среды, что отличает их от колоний непатогенных нейссерий, имеющих крошащуюся или тянущуюся консистенцию. Использование менингококк агара позволяет получить рост чистой культуры через 18-24 часа.

Практический опыт показывает преимущество использования коммерческих тест-систем API NH для идентификации микроорганизмов, по сравнению со средами собственного приготовления для определения сахаролитических свойств. Так, время инкубации системы API NH 2 часа при Т 37^0С вместо 24 часов при классическом методе. При отсутствии тест-систем API NH для определения сахаролитических свойств используют среды собственного приготовления.

В случае положительного результата используется агглютинация с латексными сыворотками А, В, С (Slidex meningite- Kit 5) и группоспецифическими сыворотками. Используя предложенный метод, окончательный ответ выдается через 24 часа после первичного посева биоматериала.

Чувствительность выделенных микроорганизмов определяется на коммерческих тест-системах АТВ NH или дискодиффузионным методом на чашках со средой Muller Hinton Agar с 20% сыворотки.

Менингококковые колонии на «шоколадном» агаре имеют сероватый цвет, с блестящей поверхностью и ровными краями, имеют маслянистую консистенцию, размерами от 0,1 до 3,0 мм. Менингококки не меняют цвета среды. На основании микроскопии мазков из колоний и результатов первичных биологических тестов возможна выдача предварительного ответа. Если в мазках обнаружены грамотрицательные кокки, это дает право отнести их к роду нейссерий и провести дифференциацию видов.

Гемофилы на «шоколадном» агаре дают довольно обильный рост с отсутствием гемолиза. Гемофилам присущ резкий специфический запах, исходящий от посевов. Колонии серого цвета, плоские диаметром 0,2-2,0 мм, легко снимаются со среды. В мазках, окрашенных по Граму, видны мелкие короткие грамотрицательные палочки с капсулой разной степени выраженности, а также нити разной длины, и короткие цепочки. На менингококк агаре и сывороточном агаре H.influenzae не растет. Крупные (3-5 мм) колонии, содержащие грамотрицательные палочки, подозрительны на энтеробактерии. Candida и P. aeruginosa растут обильно на всех средах, не изменяя цвета «шоколадного» агара.

Колонии пневмококков – мелкие (диаметром 0,1-1,0 мм), иногда плоские, с вдавлением в центре. На «шоколадном» агаре они окружены зоной желто-зеленого гемолиза (тип альфагемолиза). По внешнему виду колонии пневмококков трудно отличить от колоний стрептококков группы В, зеленящих стрептококков, энтерококков (S.faecalis), которые в редких случаях могут вызывать менингит, особенно у детей 1 года. В мазках из колоний пневмококки имеют овальную или шаровидную форму, располагаются парами или в виде коротких цепочек из 2-3 пар.

Если имеется обильный рост одинаковых колоний, то допустим одномоментный отсев на дифференциально-диагностические среды, изучение культуры по ряду признаков и антибиотикочувствительность согласно приложениям 1 и 2 к настоящей Инструкции. Определение чувствительности энтеробактерий и стафилококков проводят на среде Muller Hinton Agar. Эта среда служит основой для определения чувствительности к антибиотикам менингококков, при добавлении 20% сыворотки, H. influenzae и пневмококков – при добавлении крови. Приготовление питательных сред и постановка теста на антибиотикочувствительность производится в соответствии с действующими указаниями.

В приложении 2 к настоящей Инструкции суммировано минимальное число признаков, достаточное для того, чтобы выделенные из СМЖ бактерии предположительно отнести к тому или иному таксону (от семейства до вида) и избрать дальнейший путь идентификации. Возможно использование коммерческих диагностических наборов для выполнения латекс-агглютинационного теста при выявлении гемофилов, пневмококков и стрептококков непосредственно с чашки первичного посева. В этом случае возможна выдача окончательного ответа.

Колонии, подозрительные на менингококки, отсевают на менингококк агар (без добавок) или сывороточный агар и бессывороточный агар и инкубируют в термостате при 37^0C в условиях повышенного содержания CO_2. Колонии, подозрительные на пневмококки и др. стрептококки, отсевают на 2 сектора кровяного агара (с 5% крови) для последующего

определения чувствительности к желчи и определения чувствительности к антибиотикам.

Если число выросших колоний мало (1-2), то их отсевают на чашку Петри с менингококк агаром (без добавок) или сывороточный агар для накопления микробной массы, идентификацию микробов проводят еще через одни сутки.

При гнойных менингитах у новорожденных и детей раннего возраста, а также изредка и в других возрастных группах, помимо трех перечисленных видов микроорганизмов этиологическим фактором могут быть энтеробактерии (E.coli, S. marcescens, K.pneumoniae, Salmonella, Citrobacter, Enterobacter), синегнойная палочка (P.aeruginosa), Acinetobacter calcoaceticus, Listeria monocytogenes), различные стрептококки – гемолитические группы В, «зеленящие» и энтерококки, а также стафилококки (золотистый и эпидермальный) и грибы рода Candida.

При подозрении на энтеробактерии, синегнойную палочку, стафилококк и Ac.calcoaceticus проводят исследования в соответствии с имеющимися методическими материалами.

При подозрении на листерии в этот день, если число колоний позволяет, ставят ряд проб, а также тест на чувствительность к антибиотикам. Для L. monocytogenes помимо признаков, указанных в приложении 2 к настоящей Инструкции, характерно: подвижность при комнатной температуре, разложение мальтозы, глюкозы, инактивность по отношению к дульциту, манниту, сорбиту и арабинозе. Сахароза и глицерин разлагаются медленно. L. monocytogenes образует краевую зону гемолиза на агаре с 5% бараньей крови, разлитой слоем 3 мм.

Для идентификации Candida albicans делают посев из подозрительных белых выпуклых колоний, состоящих их дрожжевых клеток, на среду Сабуро или мясо-пептонный агар, содержащий по 100 МЕ/мл пенициллина и стрептомицина.

Если прямой посев в питательную среду не дал роста, то делается высев из инкубированной в термостате при 37^0С СМЖ в полужидком агаре (среда «обогащения») на чашки Петри с менингококк агаром (без добавок) или сывороточным агаром и «шоколадным» агаром.

При отрицательных результатах высев со среды «обогащения» повторяют через 1-2 дня в течение 7 дней инкубации в термостате.

При получении роста колоний исследование их проводят тем же путем, что и при прямом посеве спинномозговой жидкости.

10. 3-й день исследования. Культуры, отсеянные из отдельных колоний, просматривают и готовят мазки. При обнаружении морфологически типичных грамотрицательных кокков, проводят идентификацию согласно приложению 1 настоящей Инструкции, проводят серогруппирова-

ние идентифицированной культуры, а также используют эту культуру для определения чувствительности к антибиотикам.

Учитывают результаты посевов, сделанных на 2-й день исследования. На этом этапе возможна выдача окончательного положительного ответа.

Для дифференциации пневмококков, зеленящих и фекальных стрептококков (энтерококков) после микроскопии чистых культур на секторах кровяного агара учитывают характер гемолиза вокруг выросших колоний и ставят дополнительные пробы согласно приложению 3 настоящей Инструкции.

На один из двух секторов кровяного агара с ростом колоний накладывают диск из фильтровальной бумаги, пропитанной 20% раствором желчи (на физиологическом растворе), после чего чашку помещают при 37^0С на 1-2 часа. По истечении этого времени вокруг диска колонии пневмококков лизируются, образуя зону отсутствия роста шириной 1-2 мм, в то время как рост прочих стрептококков остается интактным. При положительной пробе чувствительности к желчи, при условии типичной морфологии клеток и колоний, можно дать положительный ответ о выделении пневмококков. Рост культуры на 2-м секторе кровяного агара используют для постановки пробы на чувствительность к антибиотикам.

При отрицательных результатах пробы на чувствительность к желчи, рост на 2-м секторе используют не только для испытания чувствительности к антибиотикам, но и для постановки ряда тестов, дифференцирующих стрептококки согласно приложению 3 настоящей Инструкции.

В этот же день ставят пробы для идентификации других возможных возбудителей.

11. 4-й день исследования. Учитывают результаты посевов с целью дифференциации менингококков от непатогенных нейссерий и M.catarrhalis и чувствительности к антибиотикам. Культуру менингококков, выросшую на менингококк агаре или сывороточном агаре при температуре 37^0С, можно использовать для серологической идентификации менингококков в реакции агглютинации, а также для определения чувствительности к антибактериальным препаратам.

Учитывают результаты проб на антибиотикочувствительность и прочие свойства у других возбудителей, выдают окончательный положительный ответ.

При выделении возбудителя только с помощью метода обогащения окончательный положительный ответ выдается позднее (в зависимости от длительности инкубации «обогащенных» посевов в термостате).

ГЛАВА 4
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВИ

12. При подозрении на менингококкцемию или сепсис проводят бактериологическое исследование крови. В качестве экспресс-метода диагностики рекомендуется приготовление мазка «толстой капли» крови на менингококк, взятой из вены или пальца.

Приготовление и окрашивание «толстой» капли крови.

На середину предметного стекла пипеткой наносят каплю крови или прикладывают стекло непосредственно к капле, выступающей из пальца.

Нанесенную на стекло кровь распределяют стеклянной палочкой так, чтобы диаметр образующегося мазка соответствовал величине копеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Кровь в «толстой» капле распределяется неравномерно, образуя неровные края. Окраску мазка производят водным раствором метиленового синего.

В препарате «толстой капли» менингококки имеют преимущественно такую же морфологию, как в спинномозговой жидкости, но чаще располагаются поодиночке, имеют более круглую форму. В мазке, имеющем голубой фон, хорошо видны окрашенные в темно-синий цвет лейкоциты и между ними множество мелких, темно-синих, располагающихся кучками, парно и по одному, кокков, как вне-, так и внутриклеточно. Результаты бактериоскопии немедленно сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа.

13. Несколько капель крови, взятой стерильно из вены, засевают на чашки с менингококк агаром (без добавок) или сывороточным агаром, «шоколадным» агаром, кровяным агаром, агаром Эндо, а затем на 0,1% полужидкий сывороточный агар в отношении 1:10, т.е. 1-2 мл крови засевают в пробирку с 7-10 мл полужидкого агара или 5-10 мл крови засевают во флакон с 50 мл питательной среды, подогретой до 37^0С или двухфазную среду на основе «шоколадного» агара. После суточной инкубации материал высевают на менингококк агар (без добавок) или сывороточный агар и «шоколадный» агар, чашки инкубируют при 37^0С в атмосфере повышенного содержания CO_2, кровяной агар, среду Эндо, инкубируют при температуре 37^0С в условиях обычной атмосферы. При отрицательном результате рекомендуется инкубация в течение недели с ежедневными или через день высевами. Выделение и идентификацию гемокультур проводят так же, как и при исследовании спинномозговой жидкости.

Для посева крови также используются коммерческие среды во флаконах с двухфазной средой, одноразовые флаконы со специальной средой для автоматизированной системы BacT/ALERT 3D.

ГЛАВА 5
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОСОГЛОТОЧНОЙ СЛИЗИ НА МЕНИНГОККОКИ

14. 1-й день исследования**.** Исследуемый материал – слизь с задней стенки носоглотки – берут натощак или через 3-4 часа после еды стерильным ватным заглоточным тампоном, укрепленным на изогнутой проволоке. Материал берут с обязательным надавливанием шпателем на корень языка. Тампон вводят концом к верху за мягкое небо в носоглотку и проводят 2-3 раза по задней стенке. При извлечении тампон не должен касаться зубов, слизистой щек, языка и язычка. У детей до года рекомендуется забирать материал из носа специальным тонким тампоном.

Материал может быть засеян на месте его взятия на чашку Петри с питательной средой, или погружен в пробирку с транспортной средой или взят смоченным тампоном. При отсутствии возможности доставить материал в лабораторию в течение 1-2 часов также необходимо применять 0,1% полужидкий сывороточный агар с ингибитором. Взятая слизь немедленно (или не позднее 1 часа после забора при условии транспортировки тампонов при $t=37^0C$ в термоконтейнерах) засевается на подогретые питательные среды.

Приоритетным является использование менингококк агара с селективными и поливитаминными добавками. Если нет такой возможности, то забор производить на транспортную систему Стюарта или другую транспортную систему, предназначенную для транспортировки требовательных микроорганизмов.

При посеве на чашку материал втирают по поверхности небольшого участка (1×2 см) среды всеми сторонами тампона, затем этим же тампоном засевают штрихами (с отрывом) по всей площади, отведенной для посева.

Используют сывороточный агар с добавлением в него антибиотиков, подавляющих рост грамположительных кокков. Для этой цели применяется ристомицин или линкомицин в оптимальной концентрации. На одну чашку можно засеять две пробы. Однако встречаются отдельные штаммы менингококков, более чувствительные к линкомицину, поэтому те же пробы одновременно засевают на половину чашки с сывороточным агаром без линкомицина.

При отсутствии линкомицина или ристомицина можно использовать диски с этими антибиотиками. Диски (не более 2-х) накладывают непосредственно на поверхность засеянного сывороточного агара. В этом случае на 1 чашку сеют только одну пробу. Через сутки вокруг диска, в зоне 1см, рост грамположительной флоры будет подавлен, что увеличивает возможность выделения колоний нейссерий.

Засеянные чашки доставляют в лабораторию, в термоконтейнерах и немедленно помещают в термостат. Тампоны с исследуемым материалом, погруженные в транспортные среды, доставляют в лабораторию, тщательно защищенными от охлаждения. Смоченные тампоны, или тампоны в транспортной бульонной среде, или в 0,1% полужидком сывороточном агаре с ингибитором засевают на чашку с менингококк агаром или сывороточным агаром, лишенными ингибитора, без предварительного проращивания. Посев делают отжатым тампоном, как описано выше. Засеянные чашки помещают в термостат при температуре 37^0С. Для создания условий культивирования используется термостат – CO_2 инкубатор, создающий параметры среды – Т 37^0С, влажность – 95%, CO_2 – 6% или разовые коммерческие газовые системы для инкубации единичных посевов, возможно использование эксикатора со свечой. Инкубация чашек проводится 18-24 часа.

При транспортировке материала в течение 1-2 часов применение транспортных сред не рекомендуется. При транспортировке в течение 2-4 часов уместно применение тампонов, смоченных питательной средой. При транспортировке в течение 3-х часов и более используют транспортную среду. Обязательно использование термоконтейнера.

15. 2-й день исследования**.** Просматривают чашки, засеянные накануне. На средах с ингибиторами вырастают только грамотрицательные бактерии, преимущественно представители нейссерий. Подозрительные колонии отсевают на секторы чашки с сывороточным агаром или менингококк агаром (без добавок), отсевают не менее 3-5 колоний. Внешний вид колоний менингококков описан выше. Использование менингококк агара позволяет получить рост чистой культуры на чашке через 18-24 часа. При наличии чистого роста подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают. При обнаружении в мазках грамотрицательных диплококков проводят биохимическую, серологическую идентификацию и определение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам, также как и при исследовании СМЖ.

16. 3-й день исследования. Изучают рост чистых культур, отсеянных из отдельных колоний в предыдущий день. Культуры, колонии которых имеют желтый пигмент различной интенсивности, а также характеризующиеся «сухим» ростом, отбрасывают. Следует иметь в виду, что на менингококк агаре и сывороточном агаре колонии менингококков могут выглядеть желтоватыми из-за оттенка среды. Поэтому для обнаружения пигмента их необходимо просматривать при дневном освещении.

Для дальнейшего исследования на менингококки оставляют только непигментированные культуры, дающие нежный влажный рост. Из них готовят мазки, проводят микроскопию чистой культуры. В первых генерациях для менингококков характерны полиморфизм и вариабельность

окраски, что не наблюдается у непатогенных нейссерий. После микроскопии дальнейшую идентификацию культур проводят по выше описанным тестам.

Если рост культуры из отсеянных колоний достаточно обильный, то ставят реакцию агглютинации с группоспецифическими сыворотками.

17. 4-й день исследования. Просматривают посевы. Учитывают результаты роста на бессывороточном и желчном агаре (при температуре 37^0С), сахаролитическую активность, ставят реакцию с водным раствором Люголя на продукцию полисахарида, проводят окончательную серологическую идентификацию менингококков по реакции агглютинации.

В это же день выдают окончательный положительный или отрицательный ответ.

ГЛАВА 6
ИССЛЕДОВАНИЕ ТРУПНОГО МАТЕРИАЛА

18. Патологоанатомическое вскрытие желательно проводить в наиболее ранние сроки после смерти. Для бактериологического исследования направляют кровь, ликвор, кусочки головного мозга (или гной, взятый тампоном с мягкой мозговой оболочки, в случаях менингококцемии – из печени, селезенки, легкого, надпочечников и т.д.).

19. Кровь берут стерильно из правого сердца, после вскрытия скальпелем, с помощью стерильной пастеровской пипетки с отсосом в количестве 7-10 мл. Из них 2-3 мл засевают в 25 мл 0,1% полужидкого сывороточного агара, а оставшиеся 5-7 мл используют для других исследований (серологических, и т.д.). Для посевов можно использовать также сгустки крови из крупных сосудов.

20. Ликвор берут стерильной пипеткой из околооболочечного пространства (во время извлечения головного мозга из полости черепа), в стерильную пробирку в количестве 3-5 мл и немедленно высевают на чашки с питательными средами. В количестве 0,1 мл исследуемый материал наносят в центр чашки и распределяют по ее поверхности покачиванием, растирать не рекомендуется. Бактериологическое исследование ликвора и крови проводят в соответствии с главами 3 и 4 данной инструкции. При этом к набору питательных сред следует добавить чашку менингококк агара или сывороточного агара с антибиотиком.

Гной с мозговых оболочек берут стерильным ватным тампоном и засевают газоном или штрихами на чашки с «шоколадным», менингококк агаром, или сывороточным агаром, кровяным агаром, агаром Эндо и в пробирку со средой обогащения, делают 2 мазка на предметных стеклах, один из которых красят метиленовым синим, другой – по Граму.

Для взятия материала из мозга и других органов к месту разреза прикасаются раскаленным шпателем, материал берут из глубины разреза стерильным ватным тампоном. Посев производят обычным способом на те же плотные и жидкие питательные среды. Выросшие культуры дифференцируют в соответствии с главой 3 данной инструкции.

21. Помимо посевов из мозга, целесообразно проводить изучение мазков отпечатков с поверхности мягких мозговых оболочек. После просушивания и фиксации над пламенем горелки (при длительном хранении – в ацетоне) мазки окрашивают и просматривают.

ГЛАВА 7
СОХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР

22. Идентифицированные культуры уничтожают или передают по требованию в ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии».

23. N.meningitidis, Str.pneumoniae быстро гибнут во внешней среде. Их можно сохранить в течение 5-6 недель методом посева на столбики из оптимальных для каждого микроорганизма питательных сред: N.meningitidis – сывороточный агар, для Str.pneumoniae – кровяной агар. Культуру засевают уколом в столбики и ставят в термостат при температуре 37^0C. Через 24 часа при появлении роста культуры по ходу укола и в виде бляшки на поверхности среды в пробирку наливают 1,5-2 мл стерильного вазелинового масла и в таком виде хранят, транспортируют, не допуская охлаждения. Засеянный материал из одной пробирки можно использовать многократно для пересева. N.meningitidis можно сохранять в 0,1% полужидком агаре. Для сохранения культуры пневмококков ее засевают на скошенный кровяной агар и выращивают в течение 4-6 дней при температуре от $+4^0$ до $+22^0$C. Для получения свежей культуры с поверхности засеянного агара делают соскоб петлей и пересевают на свежую среду такого же состава, ставят в термостат на сутки при температуре 37^0C.

Группоспецифическая активность менингококков сохраняется в течение 2-х недель, а пневмококков – 1 недели.

H.influenzae также быстро гибнет. Жизнеспособность гемофилов можно продлить до 1 месяца, для чего делают обильный посев на скошенный «шоколадный» агар и после суточной инкубации создают полную герметизацию. Такую культуру для пересева используют однократно. Дегерметизация приводит к гибели субкультуры.

ГЛАВА 8
СРОКИ ВЫДАЧИ ОТВЕТОВ И ИХ ФОРМУЛИРОВКА

24. При бактериологическом исследовании ликвора и крови сроки выдачи ответов таковы:

25. На 1-й день на основании прямой бактериоскопии ликвора и толстой капли крови дают предварительный ответ. Сообщают лечащему врачу о результатах бактериоскопии. При использовании экспресс-метода детекции возбудителей сообщают результаты прямой латекс-агглютинации.

26. На 2-й день выдают ответ предварительного или окончательного характера, в зависимости от результатов исследования. При росте бактерий, типичных по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам выдают ответ о принадлежности к тому, или иному семейству, роду, виду. При использовании методов экспресс-диагностики возможна выдача окончательного ответа.

27. На 3-й день на основании культурально-биохимических свойств бактерий, отсеянных с чашки на 2-й день, выдают окончательный ответ.

В этот же день может быть выдан предварительный ответ о росте (или его отсутствии) бактерий в результате высева из среды обогащения.

28. На 4-й день может быть выдан окончательный ответ о видовой принадлежности нейссерий, выросших при прямом посеве, а также других бактерий. В следующие дни (вплоть до 7-8 дня), выдается окончательный ответ, полученный в результате высева из среды обогащения.

29. При исследовании отпечатков – кусочков ткани трупного материала, крови, жидкости из полостей на основании бактериоскопии дают предварительный ответ. Окончательный ответ выдается не ранее 8-го дня с момента посева исследуемого материала.

30. При бактериологическом исследовании слизи из носоглотки, не позднее четвертого дня исследования, при выделении культуры менингококка выдают только окончательные ответы, со следующей формулировкой: «В носоглоточной слизи обнаружены менингококки серогруппы ... или нетипируемые».

При отсутствии роста менингококков в посевах выдают отрицательный ответ: «В носоглоточной слизи менингококки не обнаружены».

ГЛАВА 9
ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСОК, ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ

31. Приготовленные среды годны к употреблению только в течение 48 часов при хранении их в холодильнике. Перед посевом чашки, хранив-

шиеся в холодильнике, должны быть подсушены и подогреты до температуры 37^0С.

32. Сывороточный агар.

В качестве основы используют 1,2-1,5% агар (pH=7,4), приготовленный на бульоне из рыбного гидролизата, бульоне из перевара Хоттингера (аминный азот в бульоне 150-180мг/мл или на сухом питательном агаре специального назначения. К 80мл расплавленного и остуженного до t 50^0С агара добавляют 20мл инактивированной сыворотки.

33. Сывороточный агар с ристомицином.

К 80 мл расплавленного и остуженного агара (основа для приготовления сывороточного агара) добавляют 20 мл сыворотки и 0,1 мл раствора ристомицина, содержащего 20000 ед/мл (конечная концентрация антибиотика 20 ед/мл питательной среды).

В связи с испытываемыми трудностями в снабжении ристомицином рекомендуется простой метод, позволяющий экономно расходовать антибиотик. Препарат разводят стерильным физиологическим раствором до рабочей концентрации и затем разливают по стерильным пенициллиновым флаконам или центрифужным пробиркам под ватными или резиновыми пробками и замораживают в морозильной камере. Количество рабочего раствора во флаконах или пробирках зависит от потребности лаборатории.

Рабочий раствор сохраняют в морозильной камере до момента использования. В случае необходимости раствор оттаивают и добавляют в среду. Например, во флакон, содержащий 100 мг (100 000 ед.) ристомицина, вносят 5 мл стерильного физиологического раствора. Полученное разведение препарата является рабочим. Его удобно разлить по 0,5 мл и заморозить. В таком состоянии препарат может храниться несколько месяцев.

34. Сывороточный агар с линкомицином.

К 80 мл расплавленного и остуженного агара добавляют 20 мл сыворотки и 0,5 мл раствора линкомицина в концентрации 1000 мкг/мл. Конечная концентрация антибиотика в среде – 5 мкг/мл питательной среды. Раствор линкомицина можно хранить при температуре $+4^0$С в течение 6 месяцев.

35. Желчно-сывороточный агар.

5,0 сухой бычьей желчи растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доводят pH до 7,2-7,4, стерилизуют текучим паром 3 дня подряд. К 80 мл расплавленного и охлажденного до 50^0С питательного агара добавляют 4,0 мл стерильного раствора желчи, перемешивают, затем добавляют 20,0 мл сыворотки животных, снова хорошо перемешивают и разливают по чашкам Петри. Ко-

нечная концентрация желчи в среде – 0,2%. Посев испытуемых культур нейссерий производят штрихами на сектора чашки.

36. Бульон для приготовления смоченных тампонов.

Бульон готовят на любой питательной основе с добавлением 20% сыворотки животных и ристомицина из расчета 20 ед/мл среды. Для отбора материала используют ватные тампоны на алюминиевых стержнях, вмонтированные в пробирку. Перед выездом за материалом тампоны пропитывают бульоном из расчета 10-12 тампонов в 5 мл бульона, соблюдая стерильность. Тампоны помещают в контейнеры, где поддерживается температура 33-40^{0}С. Длительность транспортировки материала с момента взятия до посева в питательную среду не должна превышать 3-х часов.

37. Приготовление жидких транспортных сред с линкомицином. Используют любой питательный бульон или 2% пептонную воду pH= 7,2-7,6. К 100 мл стерильного бульона добавляют 0,5 мл линкомицина в концентрации 1000 мкг/мл. Конечная концентрация линкомицина – 5 мкг/мл. Среда сохраняется в холодильнике не более 2-х суток. Непосредственно перед взятием носоглоточной слизи (можно в помещении, где находятся обследуемые лица) среда без огня разливается по 1,0 мл в стерильные пробирки. Перед погружением тампона пробку извлекают, тампон вставляют в пробирку так, чтобы материал был погружен в среду; пробирку со вставленным тампоном снова закрывают. Пробирки транспортируют в вертикальном положении. При доставке в лабораторию тампоны отжимают о стенки пробирки и производят посев на сывороточный агар без антибиотиков в чашки Петри. На одной чашке можно разместить 2 посева. Транспортные среды с линкомицином применяют при отсутствии возможности доставить материал в лабораторию в течение 3 часов.

38. Определение продукции полисахаридов на агаре с 5% сахарозы.

К обычно употребляемой плотной среде для культивирования менингококков добавляют 5% сахарозы, среду разливают в чашки Петри, добавив 20% сыворотки. Производят густой высев культуры петлей сектором, на одну чашку можно посеять несколько штаммов. Через 48 часов инкубации в термостате на поверхность выросшей культуры наносят 1 каплю водного раствора Люголя, обычно употребляемого при окрашивании мазков по Граму. Реакция считается положительной при образовании бурого окрашивания выросшей культуры.

39. Менингококк агар.

Основа агара для выделения гонококка (M 434 HiMedia или BioMerieux, или Becton Dickinson) 36 г/л стерилизуем 1,1 атмосфер 15 минут.

Остудить до 55-50^{0}С и добавить: из расчета на 400,0 мл среды 100,0мл сыворотки лошадиной. Витаминную ростовую добавку (FD 025 HiMedia) – 1 флакон. Селективную добавку (FD 021 HiMedia) – 1 флакон.

Разлить в боксе по чашкам.

40. «Шоколадный» агар.

На 0,5 литра дистиллированной воды взять 36 г сухой основы (BD, Difco™Chocolate Agar Base (GC Medium), P/N: 228950), нагреть до полного растворения агара и разлить во флаконы. Стерилизовать в автоклаве при 121^0C 15 минут.

Отдельно приготовить Hemoglobin (BD BBL™ Hemoglobin, P/N: 212392), на 0,5 литра дистиллированной воды взять 10 г гемоглобина, растворить и разлить по флаконам. Стерилизовать в автоклаве при 121^0C 15 минут.

Остудить основу до 45-50^0C. Затем в асептических условиях соединить полученные 2 среды в равных частях, т.е. 1: 1. Хорошо перемешать и разлить в чашки Петри.

41. «Шоколадный» агар состав: 2% мясо-пептонный агар (МПА), 10% крови, 5% дрожжевого экстракта от объема МПА, pH 7,4-7,6.

К охлажденному до t=75^0C МПА асептически добавляют половину необходимого объема крови, тщательно перемешивают и нагревают 3-5 минут на водяной бане при t=80^0C, непрерывно помешивая. Остужают до t=75^0C и добавляют вторую часть крови и снова нагревают в течение 3-5 минут до t=80^0C непрерывно помешивая. Остужают при комнатной температуре до t=45-50^0C и добавляют стерильный дрожжевой экстракт. Агар тщательно взбалтывают и разливают по пробиркам и/или чашкам Петри. Готовую питательную среду хранят в холодильнике, избегая высушивания, не более 2-х недель.

42. «Шоколадный» бульон.

Состав: основа питательный бульон pH 7,4-7,6.

Приготовление аналогично приготовлению «шоколадного» агара.

Пример: на 180 мл питательного бульона добавляют 18 мл крови (9 мл эритроцитарной крови и 9 мл сыворотки крупного рогатого скота) и 9 мл дрожжевого экстракта.

43. 2-х фазная среда для посева крови и спинномозговой жидкости.

Приготовление: твердая фаза «шоколадный» агар, разлитый и скошенный в стерильных флаконах в условиях бокса (50 мл). Жидкая фаза - «шоколадный» бульон (50 мл), асептично добавленный во флаконы с застывшим скошенным «шоколадным» агаром.

44. Кровяной агар**.**

В качестве основы для приготовления кровяного агара используют колумбийский агар, агар для бруцелл, основу для кровяного агара (Blood agar base), эритрит – агар. Оптимальный pH среды – 7,2.

В готовую основу, охлажденную до 45^0C добавить 5% крови, разлить в стерильные чашки Петри.

Вероятность выделения патологического агента увеличивается при использовании селективных сред агар Columbia CAN и других аналогичных, в которую добавляется смесь антибиотиков ванкомицина, колистина и нистатина (ингибируют контаминантную флору).

Кровь необходима не столько для обогащения среды нативными белками, сколько для использования возможности идентификации гемолитической реакции возбудителя.

Цитратная кровь непригодна для исследования.

45. Рецепт сред с углеводами для биохимической идентификации менингококка

Среды с углеводами готовят на той же питательной основе, что и для менингококк агара, или сывороточного агара.

РН сред для менингококка должен быть 7,4.

К 75 мл агаровой основы добавляют 0,9г одного из углеводов (глюкоза, мальтоза, сахароза, лактоза, фруктоза) и 3,9 мл раствора индикатора фенолового красного (см. рецепт ниже). Агар стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 минут или однократно в течение 30 минут при 0,5 атм.

Перед употреблением среду растапливают в водяной бане, охлаждают до температуры 48-50^{0}С, добавляют 20 мл инактивированной нормальной сыворотки и разливают в чашки. На 1 чашку можно посеять не более 6 культур. Сектор с посевом должен быть узким, у основания не более 1см, а расстояние между ними не менее 2-3 см.

Таким образом, каждую культуру засевают на 5 чашек с различными углеводами. Учет результатов производят через 24 часа инкубации в термостате. При разложении какого-либо углевода с образованием кислоты красный цвет среды в секторе посева меняется на ярко-желтый.

Приготовление раствора индикатора фенолового красного (фенол-рот).

Смешивают 0,4 г порошка фенол-рот с 16 мл 0,1 NaOH и выдерживают в термостате до полного растворения при частичном встряхивании. Затем раствор доводят до объема 200 мл дистиллированной водой, разливают во флаконы и стерилизуют при одной атмосфере в течение 20 мин.

46. Полужидкий агар для хранения культур и обогащения ликвора.

К 4 мл 0,1% полужидкого питательного агара (рН–7,4), приготовленного на бульоне из перевара Хоттингера или рыбного гидролизата, добавляют 1мл инактивированной сыворотки. Эту среду используют для обогащения спинномозговой жидкости и крови. Для хранения культур внесение сыворотки не целесообразно.

47. Плотный агар для хранения культур под вазелином.

Сывороточный агар, используемый для посева на чашках, разливают в пробирки столбиком. Культуру засевают уколом и ставят в термостат на сутки. При появлении роста по ходу укола и в виде бляшки на поверхно-

сти среды в пробирку заливают 1,5-2,0мл стерильного вазелинового масла. Культуры под вазелином можно хранить без пересева до 3 месяцев (в термостате, или при комнатной температуре)

48. Приготовление полужидкой среды обогащения для носоглоточной слизи.

На 500мл 0,1% полужидкого сывороточного агара добавляют ингибитор, 1 флакон селективной добавки с антибиотиками – FD 021 HiMedia. Среду разливают в пробирки по 3 мл, выдерживают 2 суток в термостате для контроля и затем хранят в холодильнике.

49. Приготовление полужидкой среды обогащения для носоглоточной слизи.

К 80 мл полужидкого питательного агара добавляют 20 мл любой сыворотки и 0,1 мл раствора ристомицина, содержащего 20 000 ед/мл (конечная концентрация 20 ед/мл питательной среды). Среду разливают в пробирки по 3 мл, выдерживают 2 суток в термостате для контроля и затем хранят в холодильнике.

50. Тест с оптохином.

Пневмококки в основном чувствительны к оптохину, в то время как другие стрептококки, в частности а-гемолитические стрептококки, не чувствительны. Эта особенность позволяет быстро дифференцировать их на две группы. Тест выполняется с помощью стандартных дисков с оптохином.

Методика постановки теста.

Посев проводится газоном на агар с кровью (сливной рост колоний). Положить диск с оптохином на поверхность чашки. Инкубировать 18-24 часа при 37^0C в атмосфере, обогащенной CO_2.

Учет результатов.

Рост пневмококков ингибируется оптохином, зона ингибиции вокруг диска равна или превышает 15 мм. Если диаметр ниже 15 мм, необходимо использовать дополнительные тесты, например Slidex pneumo-Kit (BioMerieux). Примерно 5% пневмококков резистентны к оптохину. Некоторые штаммы стрептококков, обозначаемые как «viridans» могут ингибироваться оптохином.

50. BL™ V-C-N Inhibitor. Ингибитор ВКН. Смесь антибиотиков, ванкомицина, колистина и нистатина. Добавляется в среды для первичного выделения патогенных нейссерий, ингибирует контаминантную флору.

51. Способ окрашивания мазков метиленовым синим:

Водный раствор метиленового синего готовят 1% или 1:300 на холодной дистиллированной воде. Окраску мазка производят водным раствором метиленового синего в течение 2-3 минут без предварительной фиксации. Лишнюю краску осторожно смывают слабой струей водопроводной воды. Подсушивают мазок на воздухе. Смотрят под иммерсией.

52. Окраска по Граму с использованием реактива Фортиса и 1% раствора сафранина:

окрашивают препарат бумагой по Синеву 1-2 минуты;
смывают краску раствором Люголя;
обрабатывают препарат раствором Люголя 1-2 минуты;
смывают раствор Люголя йод-ацетоном;
обесцвечивают препарат йод-ацетоном 30 секунд;
промывают препарат водой;
докрашивают 1% раствором сафранина 2 минуты;
промывают водой, просушивают, микроскопируют.

Для приготовления обесцвечивающего раствора йод-ацетона необходимы реактив Фортиса (йод кристаллический – 10 гр., йодистый калий – 6 гр., спирт – 90мл) – 3,5 мл и ацетон – 96,5 мл.

ГЛАВА 10
МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕНИНГОКОККОВ ИЛИ ИХ АГЕНТОВ

53. Метод серологической идентификации возбудителей.

Для серологического группирования менингококков используется агглютинация с латексными сыворотками A, B, C (Slidex meningite- Kit 5-Bio Merieux) и группоспецифическими сыворотками (С.-Петербург). Исследования проводятся согласно инструкции производителя.

54. Экспресс-метод детекции возбудителей инфекции в СМЖ – реакция латексной агглютинации (РЛА).

Для прямого выявления возбудителей в исследуемом материале используются коммерческие наборы для латекс-агглютинации. Исследования проводятся согласно инструкции производителя.

ГЛАВА 11
ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ ТАМПОНОВ ДЛЯ ВЗЯТИЯ НОСОГЛОТОЧНОЙ СЛИЗИ, СОЗДАНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

55. Для взятия носоглоточной слизи используют ватные тампоны, укрепленные на металлической проволоке. Лучше всего применять проволоку из малоокисляемого металла (алюминия) диаметром 2-3 мм. Проволоку изгибают под углом 135^0С на расстоянии 1-2 см от конца, на который накручивают ватный тампон, 5-10 таких проволок заворачивают в бумагу и автоклавируют при 0,5 атм 30 мин, а затем стерилизуют в сухожаровом шкафу при 160^0С 1 час. Используя данный метод стерилизации, тампоны

могут храниться в течение 3-х недель. Можно использовать также стерильные ватные тампоны на проволоках, вмонтированных в пробирку.

56. Для создания условий культивирования используется термостат – CO_2 инкубатор, создающий параметры среды – Т 37^0С, влажность – 95%, CO_2 – 6% или разовые коммерческие газовые системы для инкубации единичных посевов.

Можно использовать любой сосуд с притертой крышкой, например, эксикатор. Засеянные чашки помещают внутрь сосуда вверх дном, там же укрепляют зажженную свечу высотой 2-3 см и закрывают крышкой, которой может служить и простое большое стекло. К моменту затухания свечи в сосуде создается повышенная концентрация CO_2 (7-10%). После этого сосуд с посевами помещают в термостат.

ГЛАВА 12
ОСНАЩЕНИЕ И РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

57. Оснащение и расходные материалы:

CO_2 инкубатор;

коммерческие газогенерирующие пакеты: «Капна-Пак», производства ГУ НИИ ЭМ, г. Минск, Generbox CO_2 (BioMerieux);

транспортная система со средой Стюарта в полистироловой пробирке (MS 306, HiMedia);

основа агара для гонококков (M 434, HiMedia);

витаминная ростовая добавка (FD 025, HiMedia);

селективная добавка с антибиотиками для основы гонококкового агара (FD 021, HiMedia);

сухая основа (BD, Difco™Chocolate Agar Base (GC Medium), P/N: 228950, Beston Dickinson);

hemoglobin (BD BBL™ Hemoglobin, P/N: 212392, Beston Dickinson);

Тесты для латексной агглютинации:

Slidex meningite-Kit 5 (REF 58803, BioMerieux);

Slidex meningite H. influenzae (REF 58807, BioMerieux);

Slidex meningite Pneumocogue (REF 58808, BioMerieux

Slidex meningite Strepto B(REF 58831, BioMerieux);

Optochin test (REF 55912, BioMerieux)

Meningitidis Combo Test (REF 252360, Beston Dickinson);

тест-система для биохимической идентификации API NH (REF 10400, BioMerieux);

тест-система для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам ATB NH (14290, BioMerieux), на анализаторе ATB Expression;

двухфазная система для посева крови и ликвора Hi Combi (LQ 0336, HiMedia);

одноразовые флаконы BacT/ALERT® FA (43-02031, BioMerieux) для автоматизированной системы тестирования крови и ликвора BacT/ALERT 3D;

Columbia agar (BioMerieux, Beston Dickinson, HiMedia);

Mueller Hinton agar (BioMerieux, Beston Dickinson, HiMedia);

BBL™ V-C-N Inhibitor;

основа колумбийского кровяного агара с дополнительными компонентами: 6%-ная витаминно-ростовая добавка и селективная добавка с антибиотиками VCN (ванкомицин, колимицин, нистатин) (BioMerieux, Beston Dickinson, HiMedia);

Шоколадный.агар с добавкой Polyvitex (для нейссерий и гемофилов) (BioMerieux, Beston Dickinson, HiMedia);

среда Эндо (Оболенск).

58. Допускается использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения, зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. При их применении руководствоваться рекомендациями изготовителя.

РАЗДЕЛ II
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ МЕНИНГИТА

ГЛАВА 1
ГЕНОДИАГНОСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ

59. Основными возбудителями гнойных бактериальных менингитов (далее – ГБМ) являются бактерии видов Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, обуславливающих 88,9 – 95,0 % менингитов. Относительный вклад того или иного вида бактерий в заболеваемость ГБМ зависит от многих факторов: эпидемической обстановки, региона, возрастной группы больных и др. По данным российских авторов 65% случаев ГБМ были обусловлены N.meningitidis, 20% – S.pneumoniae, 10% случаев были вызваны гемофильной палочкой типа b (Haemophilus influenzae типа b или Hib) и 5% – прочими бактериями. В большинстве лабораторий этиологический диагноз менингита подтверждают бактериоскопическим и бактериологическим методами. Ранняя антибиотикотерапия клинически диагностированного менингита затрудняет выделение возбудителей, в связи с чем доля расшифрованных случаев заболеваний составляет 30%.

60. Альтернативным подходом к определению этиологии менингита является использование молекулярно-биологических методов. Арсенал молекулярно-биологических методов включает полимеразную цепную реакцию, ДНК-гибридизацию и микроэррей, секвенирование генов и генома. Применение ПЦР для диагностики менингита повышает на 35-56% число подтвержденных случаев ГБМ. ПЦР является наиболее чувствительным и специфичным из существующих экспресс-методов детекции возбудителей в биологическом материале: достаточно нескольких молекул ДНК в образце, чтобы обнаружить большинство известных микроорганизмов, в том числе некультивируемых. Такие факторы, как хранение СМЖ при комнатной температуре, вместо 4^0С в течение 96 часов, замораживание-оттаивание (до 3 раз) не влияет на чувствительность метода. Для молекулярно-биологических методов характерна высокая воспроизводимость, быстрота получения результата (в течение нескольких часов, позволяет проводить идентификацию без выделения чистых культур), умеренная и постоянно снижающаяся себестоимость.

61. Таким образом, использование молекулярно-биологических методов диагностики менингита и типирования в эпидемиологических целях возбудителей незаменимо в следующих случаях:

отрицательные результаты диагностики классическими методами;

использование для диагностики образцов СМЖ, взятых после антибиотикотерапии или на поздних стадиях болезни;

необходимость срочного диагностического результата;

замещение дорогостоящих иммунологических методов.

ГЛАВА 2
ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

62. Принцип ПЦР был описан в 1986 г. Сущность ПЦР заключается в амплификации, или образовании множественных копий, интересующих участков ДНК/РНК (как правило, размером до 5000 пар оснований, увеличение размера приводит к снижению эффективности реакции). В качестве амплифицируемых участков ДНК могут выступать гены патогенности, жизненно-важных функций, устойчивости к противомикробным препаратам, видо- и родоспецифичные гены (для идентификации; нередко используют 16S рРНК гены), гены с неустановленными функциями.

63. Объектом исследования с использованием молекулярно-биологических методов выступает ДНК/РНК, в связи с чем на первой стадией ПЦР всегда осуществляется выделение ДНК/РНК из клеток, параллельно на этом этапе удаляются и клеточные ингибиторы ПЦР. В дальнейшем на выделенной ДНК-матрице происходит синтез множественных копий, поэтому важным условием проведения ПЦР является присутствие

строительного материала ДНК – дНТФ (далее – дезоксинуклеотрифосфатов) и фермента, осуществляющего их полимеризацию – Taq-полимеразы (выделяется из термофильных микроорганизмов Termophilus aquaticus, уникальность состоит в том, что не денатурирует при нагревании до 96^0C). Как и любой другой фермент, Taq требует определенных условий – pH, концентрации солей, что достигается внесением в реакционную смесь буфера для Taq и $MgCl_2$. Как правило, эффективно амплификация происходит в отношении не всей бактериальной ДНК, а лишь фрагментов до 5000 п.о., поэтому специфический участок ДНК для амплификации ограничивается с двух сторон праймерами (прямым и обратным) – цепочками нуклеотидов (до 15-30 оснований), связывающимися с комплементарными структурами исследуемой ДНК.

64. Полимеразная цепная реакция является многостадийным процессом, заключающимся в: образовании из двуцепочечной ДНК одноцепочечной молекулы (денатурация); ограничении амплифицируемого фрагмента путем присоединения прямого и обратного праймера (отжиг); полимерезации дочерних цепочек на ДНК-матрице (элонгация). Каждая из этих стадий протекает при определенной температуре. Реакцию амплификации повторяют 20-45 раз, предваряя ее дополнительной денатурацией и заканчивая дополнительной элонгацией.

65. Стадии ПЦР:

65.1. Первоначальная денатурация. Выполняется 1-5 минут при 95^0C. Если содержание гуанина и цитозина в ДНК составляет 50%, то экспозиция должна быть увеличена до 10 мин.

65.2. ПЦР-цикл. Количество циклов зависит от количества исходного материала ДНК. Если количество исходных ДНК-копий менее 10, необходимо проводить 40-45 циклов, если более – 25-35 циклов.

а) стадия денатурации. Является составляющей цикла ПЦР. Осуществляется при 94-95^0C в течение 0,5-2 минут. Уменьшение экспозиции по сравнению со стадией первоначальной денатурации обусловлено тем, что синтезируемые в процессе ПЦР продукты короче, чем исходная цельная ДНК.

б) отжиг праймеров. Является составляющей цикла ПЦР. Для отжига достаточно 0,5-2 минут. Оптимальная температура отжига праймеров на 5^0C меньше температуры плавления праймера.

в) стадия элонгации. Является составляющей цикла ПЦР. Осуществляется при 70-75^0C в течение 1 минуты.

65.3. Финальная стадия элонгации. После последнего проведенного цикла образцы инкубируются при 72^0C в течение 5-10 минут для образования дуплексов.

В результате ПЦР происходит экспоненциальное увеличение копий ДНК (ампликонов), описываемое формулой 2^n, где n – число циклов ам-

плификации. Образование огромного количества копий (10^8) позволяет выявлять их путем электрофореза в агарозном или акриламидном геле с последующей окраской ДНК-красителем – этидием-бромидом, флюоресцирующим в УФ-свете (290 нм) трансиллюминатора.

ГЛАВА 3
ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

66. Проведение молекулярно-биологических исследований (ПЦР) является многостадийным процессом, включающим:

выделение ДНК из клинического материала;

приготовление реакционной смеси для проведения ПЦР и проведение полимеразной цепной реакции;

визуализация продуктов амплификации методом электрофореза.

Каждая из этих трех стадий проводится в отдельных помещениях (зонах). Это связано с тем, что в процессе выполнения ПЦР может произойти нежелательная контаминация проб ампликонами или чужеродной ДНК, что приводит к получению ложно-положительных результатов.

67. Кроме зонирования, необходимо соблюдать ряд других обязательных условий:

все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое. Смена верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещений каждой зоны;

проводят ПЦР только в одноразовых перчатках;

используют и меняют при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером;

используют одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор;

поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны ежедневно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом в течение 60 минут;

для предотвращения контаминации проб исследуемой ДНК необходимо 1 раз в 2 недели обрабатывать все оборудование 0,1 н HCl с последующим смыванием дистиллированной водой и УФ облучением;

ветошь, уборочный инвентарь должны быть индивидуальными для каждого помещения, промаркированы и храниться раздельно.

68. ЗОНА 1. Это помещение предназначено для обработки клинического материала и выделения ДНК из него. Зона 1 должна быть оснащена

следующим оборудованием, расходными материалами, средствами индивидуальной защиты:

оборудование: настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой; твердотельный термостат для пробирок типа «эппендорф» на 25-100^{0}С или водяная баня; микроцентрифуга для микропробирок типа «эппендорф» до 12-16 тыс. об/мин; вортекс («Micro-Spin», «Minigen»); набор автоматических пипеток переменного объема 1000, 200, 5-50, 0,5-10 мкл; холодильник на 2-8^{0}С с морозильной камерой; штативы для микропробирок, наконечников.

расходные материалы: одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл, 0,5 мл; одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером 200 мкл; одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл; емкость с дезинфицирующим раствором.

средства индивидуальной защиты: отдельный халат; одноразовые резиновые перчатки; маска; шапочка; бахилы.

69. ЗОНА 2. Это помещение предназначено для приготовления реакционной смеси и проведения ПЦР. В предназначенном для этого помещении должны присутствовать следующее оборудование, расходные материалы, средства индивидуальной защиты:

оборудование: настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой; амплификатор (например «Терцик», «ДНК-технология» и др.); микроцентрифуга для микропробирок типа «эппендорф» до 12-16 тыс. об/мин; вортекс «Micro-Spin», «Minigen»; набор автоматических пипеток переменного объема 1000, 200, 5-50, 0,5-10 мкл; холодильник на 2-8^{0}С, морозильная камера на минус 20^{0}С для хранения продуктов амплификации ДНК и хранения ПЦР-реактивов; штативы для микропробирок, наконечников.

расходные материалы: одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл, 0,5 мл; одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером 200 и 1000 мкл; одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 и до 1000 мкл; емкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников.

средства индивидуальной защиты: отдельный халат; одноразовые резиновые перчатки; маска; шапочка.

70. ЗОНА 3. Это помещение предназначено для работы с амплифицированными ДНК, визуализации продуктов амплификации методом электрофореза. В предназначенном для этого помещении должны присутствовать следующее оборудование, расходные материалы, средства индивидуальной защиты:

оборудование: камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл; источник постоянного тока с напряжением 150-460 В; ультрафиолетовый трансиллюминатор с защитным экраном; видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов; холодильник на 2-8°С для хранения продуктов амплификации; микроволновая печь/водяная баня для плавления агарозы; колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы на 100 мл; мерный цилиндр на 1 л; штатив для микропробирок на 0,5 мл; автоматическая пипетка переменного объема 0,5-10 мкл, 20-50 мкл; пластиковая емкость на 5 литров для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

расходные материалы: одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе; клеящая влагонепроницаемая лента.

средства индивидуальной защиты: халат; одноразовые резиновые перчатки.

71. В процессе работы в молекулярно-биологической лаборатории необходимо помнить о технике безопасности работы с этидием бромида, УФ-светом, инфекционным материалом.

Этидия бромид – канцерогенное соединение, связывающее ДНК и вызывающее мутации в ней. Необходимо соблюдать меры безопасности: 1) работать в перчатках; 2) при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой; 3) реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией подвергать специальной обработке. Отработанные гели и буфер с этидием бромида из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 литров с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 часов. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

УФ-свет. При работе с включенным трансиллюминатором пользуются защитным экраном или специальной защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой глаз. Необходимо помнить, что УФ-свет вызывает мутации и разрушение исследуемой ДНК, поэтому длительная экспозиция ПЦР-продуктов в УФ-свете приводит к снижению интенсивности свечения. Если ПЦР-продукты подвергаются дальнейшим исследованиям (секвенированию, рестрикции, мутагенезу, клонированию) необходимо ограничить длительность УФ-облучения.

Инфекционный материал. Обезвреживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсосов на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 10 % раствор хлорной извести или 5 % раствор хлорамина Б.

ГЛАВА 4
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МЕНИНГИТОВ

72. Мишени молекулярной идентификации нейссерий

Геномная ДНК возбудителей ГБМ представляет собой достаточно крупную кольцевую хромосому, так, например, геном N. meningitidis состоит из 2,3 миллиона пар оснований и около 2160 генов. Идентификация и типирование менингококков на настоящем этапе развития науки в большинстве основано на изучении различий в генах: Crg A, Sia D , Orf 2, 16 S рРНК, IS 1106, por A или B, pil A, abc Z, adk, aro E, gdh, pdhC, pgm.

В качестве мишени для видовой идентификации с применением ПЦР может быть использован ген crg A**,** являющийся консервативным регуляторным геном и участвующий в регуляции адгезивных свойств N. meningitidis. Для этого используют специфичные для crgA гена праймеры.

В качестве мишени для определения серогруппы менингококков используют 2 гена – Sia D и Orf 2.

Амплификация Sia D позволяет определить серогруппу B, C, Y, W135. В результате ПЦР Sia D генов различных сероваров образуются продукты амплификации разных размеров, что позволяет отдифференцировать сероварианты при проведении электрофореза в 2% агарозном геле. Размеры образуемых амплификонов составляют:

серогруппа B – 450 п.о.

серогруппа C – 250 п.о.

серогруппа Y, W_{135} – 120 п.о.

Амплификация Orf 2 (участок рамки считывания касеты генов, необходимых для биосинтеза капсулы серогруппы A) позволяет определить серогруппу A. Размеры образуемых амплификонов менингококков серогруппы A – 400 п.о.

Как правило, для ускорения анализа и снижения его трудоемкости проводят множественную ПЦР с одновременным использованием всех праймеров для Sia D и Orf 2. Положительную реакцию подтверждают последующей постановкой ПЦР с одним соответствующим праймером (прямым и обратным). Чувствительность метода составляет – 81-93%, специфичность – 96-100%. Выбранные праймеры специфичны в отношении своей серогруппы и не приводят к перекрестным реакциям с другими серогруппами и видами микроорганизмов – возбудителями менингитов (Listeria monocytogenes, S. pneumonia, Haemophilus influenzae, Mycobacterium tuberculosis, Bacteroides spp.).

В качестве мишени для видовой идентификации используют 16 S рРНК гены. 16 S рРНК ген позволяет идентифицировать широкий спектр микроорганизмов, так как присутствует у всех эубактерий и нередко во множественных копиях (до 7).

Для идентификации менингококков может быть использована амплификация вставочных последовательностей – IS 1106. Для этого используют праймеры, позволяющие получать продукты амплификации размером 331 п.о., подтверждающие менингококковую этиологию.

Метод ПЦР IS 1106 и 16 S рРНК позволяет определить присутствие нейссерий в ликворе в концентрации 10^2 КОЕ/мл. Специфичность и чувствительность метода – 99,6% и 97%.

Por A ген кодирует белок наружной мембраны I (OMP I). Секвенирование этого гена позволяет расширить представление о серосубтипах менингококков.

Для изучения неоднородности популяции менингококков и распределения их в клональные группы с целью эпидемиологических исследований используют мультилокусное секвенирование-типирование, основанное на определении нуклеотидной последовательности 6 генов: 1) abc Z (АВС переносчик); 2) adk (ген аденилаткиназы); 3) aro E (шикимат дегидрогеназа); 4) gdh (ген глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа); 5) pdhC (субъединица пируват дегидрогеназы); 6) pgm (фосфоглюкомутаза). Их нуклеотидную последовательность сравнивают с уже известными аллелями, данные о которых расположены в интернете по адресу http://mlst.zoo.ox.ac.uk.

Эпидемические клоны менингококков серогруппы А могут дополнительно характеризоваться по вариабельным генам, кодирующим белки tbpB (трансферрин-связывающий белок), iga (IgA-протеаза), opaB и opaD (так называемые «белки непрозрачности»). Аллели данных белков сначала были изучены путем прямого секвенирования, затем были подобраны рестриктазы, позволяющие дифференцировать аллели с помощью более быстрого и дешевого метода ПЦР с рестрикционным анализом.

Генотипирование менингококков можно осуществлять с использованием случайных праймеров или праймеров, комплементарных повторяющимся последовательностям, – это короткие праймеры, связывающиеся с большим количеством участков бактериального генома. В результате амплификации получается большое количество ампликонов, число и длина которых определяется числом и позицией потенциальных мест связывания праймеров в бактериальном геноме. Затем фрагменты характеризуются по подвижности в гель-электрофорезе. Характеристикой штамма, исследованного методом ПЦР со случайными праймерами, является электрофоретическая картина-паттерн, т.е. специфический набор полос на электрофореграмме препарата ДНК штамма. Паттерн практически уникален, то есть если при сравнении двух штаммов получаются одинаковые паттерны – это указывает на их идентичность. Различие в электрофоретических паттернах двух штаммов однозначно указывает на различие их геномов. В этом преимущество данных методов, когда нужно проследить эпидемическую цепочку и установить источник заражения.

73. Мишени для молекулярной идентификации H. influenzae

Для идентификации гемофил используют в качестве мишени Bex A ген, кодирующий связанный с капсулой белок или другие участки генома, контролирующие капсулообразование.

74. Мишени для молекулярной идентификации S. pneumonia

Молекулярную идентификацию S. pneumonia проводят путем амплификации следующих генов-мишеней: рРНК, поверхностного адгезина А, пневмолизина, пенициллин-связывающего белка, аутолизина.

Аутолизин кодируется геном lyt A, его амплификация приводит образование ПЦР-продуктов размером 101 п.о.

ГЛАВА 5
ДИАГНОСТИКА ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТАНДАРТНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ

75. Показанием для проведения исследований СМЖ методом ПЦР на присутствие возбудителей ГБМ является цитоз спинно-мозговой жидкости более $100*10^6$/л клеток с преобладанием нейтрофилов (более 50%). Если цитоз менее $100*10^6$/л клеток и преобладают лимфоциты (более 50%), то менингит имеет серозных характер и проводят исследования на присутствие вирусов (ЦМВ, энтеровирусов, вирусов клещевого энцефалита и др.).

76. Для диагностики бактериальных менингитов методом ПЦР в клинических лабораториях должны использоваться только стандартные наборы, позволяющие определять:

этиологию менингита (Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae);

серогруппу менингококков.

77. Выделение ДНК из клинического материала

Материалом для исследования является: чистая культура, СМЖ, кровь и другие биологические жидкости.

Чистые культуры. Используется культура бактерий в количестве одной или нескольких колоний, которые переносятся стерильной одноразовой петлей в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл безнуклеазной воды.

СМЖ. Образцы СМЖ забираются у больных ГБМ, желательно при поступлении в стационар, в рамках обычной диагностической спинномозговой пункции. Для ПЦР-диагностики обычно достаточно от 0,1 до 0,5 мл СМЖ, которую переносят в пластиковую пробирку типа «Эпиндорф».

Использование иных стерильно взятых образцов (кровь, аутопсийные материалы) возможно, но при ГБМ имеет меньшее значение.

Приготовленные бактериальные суспензии или образцы СМЖ, плазмы крови могут быть исследованы немедленно, сохраняться в течение 1-3 дней при 4^0С, несколько месяцев при $–20^0$С, неограниченно при $–70^0$С. Необходимо избегать нескольких циклов замораживания-оттаивания образцов.

78. Методы выделения ДНК из бактериальной суспензии.

Для повышения эффективности метода ПЦР-диагностики, особенно в случаях с низкой концентрацией возбудителей в СМЖ, необходимо проводить выделение ДНК из пробы:

с использованием стандартных наборов для выделения ДНК (в соответствии с инструкцией по применению);

метод температурного лизиса-осаждения (проводят цикл замораживания-оттаивания, кипятят в течение 3 минут, центрифугируют при 10 000 g в течение 5 мин, для исследования используют 15 мкл образцов).

Концентрацию выделенной ДНК в пробе при необходимости определяют спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

79. Приготовление реакционной смеси для проведения ПЦР и проведение полимеразной цепной реакции

Приготовление реакционной смеси для проведения ПЦР (выбор температурного режима) проводят в соответствии с инструкцией.

80. Визуализация продуктов амплификации методом электрофореза.

Наличие продуктов амплификации ДНК выявляют электрофорезом в 1% агарозном геле с этидия бромидом (0,5 мкг/мл).

Приложение 1
к Инструкции
о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов

Культуральные и биохимические свойства нейссерий и M.catarrhalis

Возбудитель	Отношение к условиям культивирования			Зависимость роста от CO_2 при первичном выделении	Образование пигмента	Сахаралитическая активность					Образование полисахарида на агаре с 5% сахарозы	Редукция	
	Рост на											нитратов	нитритов
	сывороточном агаре 37^0C	бессывороточном агаре 37^0C	среде с 0,2% желчи			глюкоза	мальтоза	сахароза	лактоза	фруктоза			
N.gonorrhoeae	+	-	-	+	-	К	-	-	-	-	-	-	-
N.meningitidis	+	-	-	+	-	К	К	-	-	-	-	-	-
N. subflava	+	+	+	-	+	К	К	-	-	-	-	-	+
N. perflava	+	-	+	-	+	К	К	К	-	К	+	-	+
N.flava N.sicca	+	(+)	+	-	+	К	К	К	-	К	+	-	+
N.mucosa	+	+	+	-	-	К	К	К	-	К	+	+	+
N.flavescens	+	+ (-)	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
N.lactamica	+	+	+	-	+	К	К	-	К	-	-	+	+
N.(Br.) catarrhalis	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечание: К - образование кислоты, (-) - редко

Приложение 2
к Инструкции
о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов

Свойства основных возбудителей менингитов, учитываемые через 24 часа от начала бактериологического исследования

Морфология клеток	Интенсивность роста на агаре		Изменение цвета «шоколадного» агара вокруг колонии	Грам окраска	Наличие			Подозреваемые микроорганизмы
	20% сывороточном	«шоколадном»			оксидазы	катала-зы	уреазы	
Капсульные полиморфные кокки	++++	++++	-	-	+	+	-	Neisseria meningitidis
Мелкие полиморфные палочки	-	++++	-	-	-	+	+	Haemophilus influenzae
Капсульные удлиненные парные кокки	++++	++++	желто-зеленый	+	-	-	-	Streptococcus pneumoniae
Цепочки и пары из кокков	++++	++++	зеленый	+	-	-	-	Streptococci B,D, viridans
Мелкие палочки «частоколом» и под углом	++++	++++	зелено-коричневый	+	-	+	-	Listeria monocytogenes
Пары и цепочки коккобактерий	++++	++++	-	-	-	+	+	Acinetobacter calcoaceticus

Приложение 3
к Инструкции
о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов

Дифференцирующие свойства стрептококков, вызывающих менингит

	S. pneumoniae	S. faecalis (гр.Д)	S. agalactiae (гр.В)	«Зеленящие»
Гемолиз на 5% кровяном агаре	α	α,β,γ	β	α
CAMP - тест	-	-	+	-
Лизис на кровяном агаре вокруг диска с 20% желчью	+	-	-	-
Рост после прогрева при 60^0C, 30 мин	-	+	-	-
Разложение маннита	+ или -	+	-	-
Тест с оптохином	+	-	-	-

Примечание: в группу «зеленящих» стрептококков относятся 9 видов малоизученных стрептококков. Примерно 5% пневмококков резистентны к оптохину. Некоторые штаммы стрептококков, обозначаемые как «viridans» могут ингибироваться оптохином.