МУЗ «ПЕРВАЯ ГОРОДСКАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА СКОРОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ»

СЕВЕРНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

КУРС КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Руководитель курса

проф. Воробьёва Н. А.

**Гнойный бактериальный менингит. Микробиологическая диагностика**

Выполнила

врач-интерн КДЛ

Петрова Л. В.

г. Архангельск

2009 г.

**Оглавление**

Введение

Анализ и учет результатов История

Частота и встречаемость гнойного бактериального менингита в мире в зависимости от возбудителя

Характеристика возбудителей гнойных бактериальных менингитов

Haemophilus influenzae

Neisseria meningitidis

Streptococcus pneumoniae

Прочие возбудители

Патогенез бактериального менингита

Микробиологическая диагностика гнойных бактериальных менингитов

Показания к лабораторному исследованию

Микробиологическая диагностика гнойных бактериальных менингитов

Бактериологическое исследование спинномозговой жидкости больного

Бактериологическое исследование крови

Бактериологическое исследование экссудата из петехий

Бактериологическое исследование носоглоточной слизи на менингококк

Исследование трупного материала

Методы серологической идентификации менингококков или их антигенов

Реакция агглютинации в полистироловых пластинах

Реакция микропреципитации для определения серогруппы менингококков

Метод ВИЭФ.

Использованию реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) для выявления антител при менингококковой инфекции

Показания к проведению серологических исследований

Методика постановки РНГА с эритроцитарными менингококковыми диагностикумами

Взятие крови

Учет реакции

Рекомендуемые сроки, кратность обследования и трактовка серологических результатов

РНГА при генерализованных формах менингококковой инфекции.

РНГА с диагностикумами А и С

РНГА с диагностикумом серогруппы В

Групповая специфичность РНГА

РНГА при локализованных формах менингококковой инфекции (назофарингит и бактерионосительство)

РНГА при иммуно-эпидемиологических исследованиях

Применение РНГА для оценки эффективности вакцинопрофилактики менингококковой инфекции.

Современные методы генодиагностики гнойных бактериальных менингитов

Общие сведения и принципы

Показания к применению метода

Выделение ДНК

Ожидаемый эффект от внедрения метода

Задачи

Сроки выдачи ответов и их формулировка

Заключение

Список использованных источников

# **Введение**

Менингиты бактериальной природы - тяжелейшие инфекционные заболевания, при которых в инфекционный процесс вовлекаются мягкие мозговые оболочки основания головного мозга и верхняя часть спинного мозга.

Локализация очага воспаления, а так же характерные для этих заболеваний тяжелейшие клинические проявления и генерализация процесса с поражением различных органов и тканей указывает на необходимость быстрого решения вопроса об этиологии заболевания и назначения адекватной антибактериальной терапии, которая неоднозначна для гнойных бактериальных менингитов (ГБМ) разной этиологии.

От грамотного и своевременного проведения исследований по определению этиологического агента заболевания и как можно более раннего начала соответствующего этиотропного лечения зависит исход заболевания, показатели летальности, число и тяжесть постинфекционных осложнений.

Данные лабораторной диагностики бактериальных менингитов и изучение основных биологических свойств у возбудителей лежат в основе определения прогностических критериев в системе эпидемиологического надзора за бактериальными менингитами.

Рационально организованная, комплексная, лабораторная диагностика гнойных бактериальных менингитов любой этиологии позволяет достоверно контролировать состояние проблемы этой инфекционной патологии.

# **История**

В двадцатом столетии человечество добилось впечатляющих успехов в борьбе с инфекционными заболеваниями. Одни болезни отступали в силу естественных причин, другие - благодаря повышению уровня жизни и профилактике.

К особой группе жизнеугрожающих для человека и актуальных до сих пор заболеваний относится бактериальный менингит, история которого уходит в глубокую древность. Первые упоминания о болезни отмечены у Артея (II в. до н.э.) и Павла Эгинского (VII в.). По данным Трейтера В.А. (1920), эпидемические вспышки менингита встречались в Италии в I, II и VII веках. Позднее итальянскими врачами дано описание клинической характеристики менингита, а в 1805 г. впервые зарегистрирована и подробно освещена эпидемия цереброспинального менингита в Женеве. В последующем не раз упоминалось о многочисленных вспышках, переходивших порой в эпидемии, которые имели широкое территориальное распространение и продолжались в течение многих лет. Известный французский исследователь, изучавший менингиты в Африке (60-е годы), профессор Л. Лапессони так излагает свое впечатление от болезни: "Глядя на детей, лежащих в лихорадочном состоянии и на то, как быстро наступает коматозное состояние и судороги, на сраженных болезнью, как ударом молнии, понимаешь, почему даже упоминание о болезни - "менингит" - вызывает животный страх, беспокойство, чувство безысходности и неотвратимой беды".

Отношение к болезни не изменилось и в настоящее время. Несмотря на достигнутый прогресс в отношении этиологии и патогенеза, а также на развитие новых направлений в антибактериальной терапии и профилактики, заболевание остается одной из важнейших причин летальности и инвалидизации, тем самым подтверждая высокую социальную значимость бактериальных менингитов в нескончаемом списке других заболеваний человека.

# **Частота и встречаемость гнойного бактериального менингита в мире в зависимости от возбудителя**

Бактериальный менингит - нередко встречающееся заболевание, за последнее десятилетие отмечено снижение частоты заболеваемости почти на половину. В России средняя частота встречаемости бактериального менингита - 3 на 100000 населения. Основным этиологическим фактором является N.meningitidis (60%), S.pneumoniae (30%) и H.influenzae (10%).

В США частота встречаемости бактериального менингита - от 2,5 до 3.5 случаев на 100000 популяции.

До 1990 года основными этиологическими факторами бактериального менингита были три возбудителя - H.influenzae, N.meningitidis и S.pneumoniae, которые были причиной заболевания в 75% случаев. Большинство менингитов, вызванных H.influenzae (тип b) наблюдались у детей, в возрасте до 12 месяцев.

Однако, с появлением вакцин (HibTITER, Pedvax HIB, ProHIBit) случаев H.influenzae - опосредованных менингитов стало значительно меньше. Так, в США с проведением активной вакцинации, начатой в 1988 году, число случаев инфекций ЦНС, вызванной типом b H.influenzae , снизилось к 1997 году до 0,7 на 100.000 населения (по сравнению с 421 случаев на 100.000 в 1987 году).

Сегодня важнейшей причиной бактериального менингита является S.pneumoniae. Так, в США ежегодно регистрируется 3000 случаев пневмококковых менингитов ежегодно, при этом смертность при данном заболевании высокая, несмотря на соответствующую антибактериальную терапию. Высокой остается заболеваемость пневмококковыми менингитами у детей в возрасте до 6 месяцев и у пожилых лиц. Частота инфекционного менингита среди новорожденных в Скандинавских странах составила 1,9 на 100.000 новорожденных; смертность превысила 5%.

Существенной проблемой антибактериальной терапии менингитов является широкое распространение полирезистентных штаммов S.pneumoniae. От 12% до 35% всех выделенных в США штаммов пневмококков резистентны к пенициллину, треть из которых имеют МПК к пенициллину более 2 мг/л.

Вторым по значимости возбудителем бактериального менингита (в России - первым) является N.meningitidis (серотипы A и С). В США заболеваемость менингитом, вызванного менингококком, составляет 0,6 случаев на 100.000 населения, чаще всего среди детей, подростков и молодых лиц (от 2 до 18 лет).

В Исладии, как и в России, N.meningitidis вызывает наибольшее число заболеваний - 56%, тогда как Str. pneumoniae встречался в 20%, а H. influenzae и Listeria monocytogenes в 5% случаев соответственно. Смертность от менингита она составила 20% взрослого населения; при менингококковой инфекции - 16,2%, при пневмококковой - 25,9%.

Стрептококки группы В и Listeria monocytogenes являются причиной бактериального менингита у детей в неонатальном периоде (1-3% от всех случаев менингита у детей). Listeria monocytogenes является причиной менингита у пожилых, ослабленных больных и пациентов с иммунодефицитом на фоне нейтропении. У пациентов с шунтами важнейшими этиологическими факторами заболевания являются коагулаза-негативные стафилококки, Staphylococcus aureus, Enterobacteriaceae, P. aeruginоsa.

В этиологической структуре нозокомиального менингита очень большую проблему представляют грамотрицательные бактерии. Их доля в развитии нозокомиальной инфекции ЦНС составляет более 30% по сравнению с 2-4% грамотрицательных возбудителей в этиологии "внебольничного" менингита. К сожалению, большинство выделенных штаммов - энтеробактерии, K. pneumoniae, P.aeruginosa, Serratia spp., Acinetobacter baumannii, Salmonella группы B и D, Proteus mirabilis - полирезистентны к используемым для терапии менингита антибиотикам.

Энтерококковый менингит у новорожденных - довольно редкое, но коварное заболевание. Риск энтерококковой инфекции ЦНС возрастает у больных после нейрохирургических вмешательств.

Процент послеоперационных менингитов - 1,8%.. Среди этиологической структуры преобладают Staph. aureus, псевдомонады (P. aeruginosa), K. pneumoniae и реже - энтеробактерии, а у пациентов с ликворреей - пневмококки.

Необходимо помнить о вторичном менингите, развивающемся как осложнение патологии ЛОР-органов, и прежде всего - среднего отита. Частота данного осложнения - 22% среди всех случаев бактериального менингита.

# **Характеристика возбудителей гнойных бактериальных менингитов**

## **Haemophilus influenzae**

Согласно "Определителя бактерий Берджи" Haemophilus influenzae наряду с другими многочисленными представителями (более 15 видов) относят к роду Haemophilus, который входит в семейство Pasteurellaceae (подгруппа 3), относящиеся к 5 группе микроорганизмов, включающей все факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки. Из организма человека можно выделить 8 видов гемофилов, причем только 2 из них - Haemophilus influenzae и Haemophilus duckreyi являются основными патогенами человека.

Haemophilus influenzae - небольшие (0,3 - 0,4 \* 1 - 1,5 мкм) грамотрицательные, сферические, овальные и палочковидные клетки. Иногда образуют нити и имеют заметный полиморфизм, особенно в материале от больных, которые получали β-лактамные антибиотики. Гемофилы неподвижны, спор не образуют, медленно окрашиваются анилиновыми красителями. Каталазоположительны. Оксидазоположительны.

Haemophilus influenzae - факультативный анаэроб, хорошо растущий на воздухе. Большинство видов Haemophilus при культивировании требуют присутствия в питательной среде X и/или V факторов. Термостабильный фактор роста X (гемин) образуется из гема путем замены двухвалентного иона железа на трехвалентный. Гем, в свою очередь, в изобилии содержится в эритроцитах, входя в состав гемоглобина. Фактор V - это термолабильный кофермент никотинамидадениндинуклеотид (НАД), участвующий в окислительно-восстановительных реакциях бактериальных клеток. Фактор V синтезируется рядом бактерий (например сардинами, стафилококками, нейссериями и другими) и присутствует в животных клетках, в том числе в эритроцитах. Добавление в питательную среду НАД удовлетворяет потребность микроорганизмов в факторе V. Внутри рода микроорганизмы дифференцируют по потребности в указанных факторах роста и на основании биохимических свойств.

Haemophilus influenzae нуждается как в X, так и в V факторах роста. Температурные границы роста гемофилов +24 - +43°С, оптимальная +37°С. Исходя из того, что гемофилам для культивирования необходимы факторы роста (X и/или V), оптимальной средой является "шоколадный" агар, в который входит гретая кровь, содержащая X и V факторы, выделяющиеся при термическом разрушении эритроцитов. В зависимости от состояния популяции на питательных средах капсульные штаммы Haemophilus influenzae формирует слизистые М-колонии (сочные, сероватые, с радужной окраской в проходящем свете) или блестящие S-колонии (полупрозрачные). Бескапсульные штаммы на твердых средах формируют очень мелкие R-колонии (с неровным краем, без радужной окраски в проходящем свете, серовото-белого цвета). Капсульные бактерии Haemophilus influenzae содержат капсульный полисахарид одного из 6 типов (а, b, с, d, e, f), которые отличаются по составу входящих в него углеводов и антигенным свойствам.

Основную эпидемиологическую опасность представляет Haemophilus influenzae типа «b», так как вызывает тяжелейшие менингиты, сепсис, пневмонии и другие инфекционные заболевания. Капсульный антиген Hib состоит из полирибозилрибитолфосфата (PRP или ПРФ). Идентификация Haemophilus influenzae по ферментативной и метаболической активности представляет определенные трудности из-за значительного различия показателей у различных штаммов одного и того же вида. Однако, определение метаболизма индола, уреазы и орнитиндекарбоксилазы (ОДС) является необходимым условием для биотипирования Hib, которое позволяет определить биотип с I по VIII.

### **Neisseria meningitidis**

Возбудителем менингококковой инфекции является менингококк (Neisseria meningitidis), который относят к роду нейссерий, включенному (согласно "Определителя бактерий Берджи") в состав 4-й группы микроорганизмов, озаглавленной как "Грамотрицательные, аэробные/микроаэрофильные палочки и кокки". 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 Вranhamella, включающий: B.catarrhalis, B.caviae, B.ovis и B.cuniculi.

Менингококки требовательны к условиям культивирования. При росте требуют повышенной влажности и 5-10% содержания СО2 в воздухе, чувствительны к малейшим отклонениям температуры. В качестве источника нативного белка рекомендуется применять сыворотку крупного рогатого скота, лошадиную или кровь любого другого животного. Основой для приготовления сред могут служить бульоны на основе гидролизата мяса по Хоттингеру, эритрит-агар, агар АГВ, сухой питательный агар специального назначения. Сухие питательные агары, а также сыворотка крови должны быть обязательно проверены на пригодность для культивирования менингококка. Проверку производить со свежевыделенной культурой или эталонным штаммом менингококка, хранившемся в высушенном состоянии.

Морфологически клетки менингококков имеют округлую форму и размеры порядка 0,6-1,0 мкм. Величина микробных клеток и их форма могут различаться, что определяет характерный для менингококков признак клеточного "полиморфизма". Этот признак особенно выражен в мазках из свежих культур, при этом общая морфологическая картина культурального мазка, окрашенного по Граму, имеет вид лежащих беспорядочно полиморфных (по величине и окраске) грамотрицательных кокков (эффект "рассыпанного гороха"). Парное расположение менингококков (диплококков) наблюдают в препаратах, приготовленных из жидкостей и органов пораженного организма. В спинномозговой жидкости менингококки часто располагаются внутрилейкоцитарно и имеют форму кофейного зерна.

Антигенная структура менингококка сложна и включает капсульный полисахарид, липополисахарид, пили, белки наружной и внутренней мембран клеточной стенки. Современными исследованиями показана возможность менингококков самостоятельно секретировать в окружающую среду ряд антигенов (например, иммуноглобулин А 1 - протеаза), которые играют ведущую роль в формировании вирулентных свойств менингококков.

Менингококки неподвижны, спор не образуют, жгутиков не имеют, являются строгими аэробами, чрезвычайно чувствительны к воздействию внешней среды. При росте на плотных питательных средах образуют небольшие, слегка выпуклые, полупрозрачные колонии с идеально ровными краями. При выдерживании посевов в термостате в течение 2 - 5 дней колонии увеличиваются в размере, становятся менее прозрачными и края их приобретают неровный вид.

Биохимическая активность менингококков невелика и из числа многих углеводов они ферментируют только глюкозу и мальтозу с образованием кислоты без газа, не разжижают желатин, оксидазоположительны, каталазоположительны.

В соответствии с особенностями строения полисахаридной капсулы менингококки подразделяют на 12 серогрупп: А, В, С, X, Y, Z, W-135, 29-Е, К, Н, L, I. Особое эпидемиологическое значение имеют менингококки серогрупп А, В, С, которые способны вызывать эпидемии и наиболее часто выделяются от больных генерализованными формами менингококковой инфекции. Другие серогруппы могут вызывать заболевания, но чаще выделяются из носоглотки носителей.

Определение серогрупповой характеристики менингококков является важнейшей составляющей в системе эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией. Соответствующие современные классификации менингококков по различным антигенным системам (белки, липополисахариды, пили и другие) позволяют определять их популяционные особенности и отбирать наиболее иммуногенные компоненты для конструирования вакцинных препаратов нового поколения.

## **Streptococcus pneumoniae**

Возбудителем пневмококковых менингитов является Streptococcus pneumoniae или пневмококк, который входит в состав рода Streptococcus (группа стрептококков ротовой полости), включенных в 17-ю группу "Грамположительные кокки".

Это овальные, иногда вытянутые вдоль оси ланцетовидные кокки, диаметром 0,5 -1,0 мкм, располагаются парами и окружены общей капсулой.

Строение клеточной стенки пневмококков типично для грамположительных бактерий. Ее основой является пептидогликан со встроенными углеводами, тейхоевыми кислотами, липопротеинами и поверхностными белками. Пневмококки неподвижны, спор не образуют, являются факультативными анаэробами, хемоорганотрофы. Для культивирования пневмококки нуждаются в богатых питательных средах, предпочитают капнофильные условия (5 - 10% СО2). Температурный оптимум +37°С. Каталазоотрицательны.

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

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

По капсульному антигену проводят типоспецифическую дифференцировку пневмококков, которых насчитывают не менее 90 серотипов. Серотиповой пейзаж возбудителя зависит от географической области, климатических условий, возраста больных, вида патологии и со временем может меняться. Выявление особенностей циркуляции пневмококков позволяет значительно снизить заболеваемость пневмококковой инфекцией за счет вакцинопрофилактики групп риска.

## **Прочие возбудители**

В структуре бактериальных менингитов, вызываемых "прочими" возбудителями, можно условно выделить менингиты новорожденных, посттравматические и послеоперационные менингиты, "вторичные" менингиты и менингиты иммунокомпромиссных больных.

Менингиты новорожденных, обусловлены возбудителями, входящими в род Streptococcus (S.agalactiae, S.pyogenes и др.), род Listeria (L.monocytogenes), семейство Enterobacteriaceae (Klebsiella spp., Enterobacter spp, E.coli и др.). Заражение происходит при прохождении плода по родовым путям или трансплацентарно.

У пациентов, перенесших травмы или операционные вмешательства, важнейшими этиологическими факторами заболевания являются представители рода Staphylococcus (S.aureus, S.epidermidis и др.), семейство Enterobacteriaceae (K.pneumoniae, E.coli, Proteus spp. и др.), рода Pseudomonas (P.aeruginosa, P.mallei и др.), рода Enterococcus (E.faecalis).

Менингиты у лиц с врожденным или приобретенным нарушением функций иммунной системы (тяжелые хронические заболевания сердечнососудистой системы, легких, почек, печени, туберкулез, онкологические заболевания, ВИЧ и т.д.) в первую очередь связаны с широким спектром грамотрицательных бактерий, входящих в семейство Enterobacteriaceae (K.pneumoniae, P.mirabilis, E.coli, Serratia spp.), род Pseudomonas, род Acinetobacter (A.baumanii), дрожжеподобных грибов (род Candida, род Cryptococcus).

"Вторичные" менингиты чаще всего развиваются как осложнения инфекционных заболеваний ЛОР-органов, остеомиелита и обусловлены представителями рода Staphylococcus (S.aureus), рода Pseudomonas (P.aeruginosa), семейства Enterobacteriaceae (K.pneumoniae, E.coli и т.д.).

Так называемые "прочие" возбудители широко распространены во внешней среде и составляют основной спектр условно-патогенной микрофлоры.

# **Патогенез гнойного бактериального менингита**

Развитие бактериального менингита начинается с момента, когда вирулентные микроорганизмы преодолевают защитные барьеры центральной нервной системы, при этом в первую очередь в процесс вовлекается субарахноидальное пространство. Важнейшими резервуарами инфекции ЦНС являются назофарингеальные источники. Структурной особенностью ряда возбудителей являются поверхностные образования - пили, которые снабжены рецепторами, определяющими тропную адгезию бактериальной клетки к слизистой оболочке. Следует также отметить, что такие важнейшие возбудители бактериального менингита, как Str. pneumoniae, N. meningitidis и H. influenzae, снабжены наружной оболочкой из полисахаридов, которая определяет такие факторы вирулентности, как невозможность фагоцитоза или незавершенный фагоцитоз и препятствует комплемент-опосредованному лизису бактерий.

Из назофарингеальных источников возбудитель путем локальной пенетрации в ткани может попасть в кровоток и затем, преодолев гематоэнцефалический барьер, достигнуть мозговых оболочек. Бактериемия является важнейшим механизмом распространения инфекции при менингите. Возможности защитных сил макроорганизма, направленные на эрадикацию возбудителя из цереброспинальной жидкости, резко ограничены ввиду исходно низкого титра антител и активности комплемента. Репликация бактерий инициирует выработку медиаторов воспаления - цитокинов, интерлейкинов 1, 6, фактора некроза опухолей, простагландинов (ПГЕ-2), лейкотриенов (ЛТ-В4), а также аккумуляции в цереброспинальной жидкости лейкоцитов.

Экспериментальные модели бактериального менингита демонстрируют существенное нарушение динамики цереброспинальной жидкости и изменение церебрального кровотока в результате развившегося воспаления. Возникающие нарушения проходимости капилляров в субарахноидальном пространстве приводят к снижению резорбции цереброспинальной жидкости, результатом же является повышение внутричерепного давления, падение церебральной перфузии и ауторегуляции. Эти нарушения приводят к стойким неврологическим нарушениям или к жизнеугрожающим ситуациям.

# **Микробиологическая диагностика гнойных бактериальных менингитов**

## **Показания к лабораторному исследованию**

Лабораторная диагностика гнойных бактериальных менингитов 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, стертой формой (назофарингит) и с подозрением на менингококковую инфекцию и менингиты иной этиологии. По эпидемиологическим показаниям обследуют лиц, бывших в контакте с больными менингококковой инфекцией.

Бактериологическому обследованию подлежат:

а) в детских учреждениях - дети, бывшие в общении с больными, и обслуживающий персонал всего учреждения;

б) в школах - учащиеся и преподаватели класса, где зарегистрирован больной;

в) в школах-интернатах (круглосуточное пребывание детей) - учащиеся, общавшиеся с больным в классе и в спальной комнате, а также преподаватели и воспитатели данного класса;

г) в семьях, квартирах - все лица, общавшиеся с больными;

д) в ВУЗах, средних учебных заведениях, ПТУ, спецучилищах, колледжах при возникновении случая заболевания на первом курсе - преподаватели и студенты всего курса; на старших курсах - только общавшиеся с больным в учебной группе и комнате общежития;

е) в других организованных коллективах - лица, проживающие в общежитии.

В детских дошкольных учреждениях бактериологические обследования контактных проводятся не менее двух раз с интервалом в 3-7 дней, в остальных коллективах - однократно.

Носители менингококков, выявленные при бактериологическом обследовании в детских дошкольных коллективах, школах-интернатах и др. детских учреждениях выводятся из коллектива на срок проведения санации. Из коллектива взрослых, в том числе учебных заведений, носители не изолируются.

Носители менингококков - дети и взрослые, выявленные в семейных очагах, в детские дошкольные учреждения, школы, школы-интернаты, санатории, оздоровительные лагеря и др. детские учреждения не допускаются. Бактериологическое обследование коллективов, которые посещали эти носители, не проводится.

При выявлении носителя менингококков среди больных соматических стационаров, его следует изолировать в бокс или полубокс. Вопрос о санации решается в зависимости от основного заболевания. При отсутствии возможности изоляции носителя курс санации проводится обязательно. Персонал отделения подвергается однократному бактериологическому обследованию, выявленные носители отстраняются от работы на время проведения санации.

Выявленные носители менингококков санируются на дому или в специально развернутых для этих целей отделениях: взрослые - ампициллином или левомицетином по 0,5 \* 4 раза в день в течение 4-х дней. Детям эти препараты назначают по той же схеме в возрастных дозировках. Для санации носителей в закрытых коллективах взрослых рекомендуется рифампицин по 0,3 через 12 часов в течение 2-х дней.

Через 3 дня после окончания курса санации носители, независимо от примененного препарата, подвергаются однократному бактериологическому обследованию и при наличии одного отрицательного бактериологического анализа они допускаются в коллективы.

При длительном носительстве (свыше 1 месяца) и отсутствии воспалительных изменений в носоглотке носитель допускается в коллектив, где он был выявлен.

## **Микробиологическая диагностика гнойных бактериальных менингитов**

В связи с тем, что наряду с менингококками, наиболее частыми этиологическими факторами гнойных бактериальных менингитов (ГБМ) могут быть пневмококки, а у детей младшего возраста Hemophilus influencae и др. возбудители, представляется целесообразным изложение основных дифференциально-диагностических признаков и методов выделения этих микроорганизмов.

Идентификация вида N.meningitidis основана на комплексе морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических признаков.

При первом выделении клеткам менингококков свойственен полиморфизм, который проявляется в различной величине и разной интенсивности окрашивания микробных клеток. Колонии менингококков на сывороточном агаре бесцветны, 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.

Некоторые штаммы, выделенные из 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.

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 B.catarrhalis в отличие от гемофилов и пневмококков, что может служить дифференцирующим признаком при их идентификации в сочетании с другими.

Заболевания, где этиологическим агентом являются гемофилы, характеризуются воздушно-капельным механизмом передачи, что обеспечивает широкое распространение. Из всех представителей этого рода наибольшей патогенностью обладают H. influenzae, впервые описанные Пфейффером в 1892 г. Этот возбудитель является наиболее частым агентом тяжелых генерализованных форм заболеваний, особенно у детей до 5 лет. ГБМ у взрослых могут быть обусловлены другими серологическими типами.

Пневмококки и гемофилы, как и менингококки, являются высоко требовательными к культивированию микроорганизмами. В качестве фактора, способствующего их росту используют кровь различного происхождения. Поэтому универсальной средой для всех возбудителей может служить "шоколадный" агар.

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

В бактериологическую лабораторию доставляется материал в следующем объеме:

1. Ликвор для первичного посева, бактериоскопии и серологических исследований в количестве не менее 1,0 мл.

2. Ликвор в 0.1% полужидком агаре (среда "обогащения") для бактериологического накопления культуры, 0,5 мл ликвора засевают в 5,0 мл полужидкого агара немедленно у постели больного.

3. "Толстая капля" крови для бактериоскопии.

4. Кровь в жидкой питательной среде или в 0,1% полужидком агаре (среда обогащения) для бактериологического накопления культуры, 5,0 мл крови засевают в 50,0 мл среды обогащения.

5. Кровь в количестве не менее 2-х мл для серологических исследований (РПГА, ВИЭФ, ЛА и др.).

Материал для бактериологических и серологических исследований доставляется в бактериологическую лабораторию немедленно после забора в теплом виде (t0=+370С) в специально оборудованных контейнерах.

При невозможности немедленной доставки допускается хранение патологического материала в условиях термостата при +370С в течение 18 часов.

##

## **Бактериологическое исследование спинномозговой жидкости больного**

1-й день исследования

Спинномозговую жидкость (СМЖ) в количестве 2 - 5 мл берут у больного сразу же при поступлении в стационар (желательно до начала антибактериальной терапии) с соблюдением все правил асептики. Взятие ликвора производится персоналом в масках.

Первую порцию СМЖ (около 1,0 мл) берут в отдельную пробирку для проведения общего ликворологического исследования. Вторую порцию, предназначенную для бактериологического исследования наливают в стерильную пробирку (не менее 1.0 мл) и частично засевают в 0,1% полужидкий агар (0,5 мл СМЖ добавляют в 5 мл 0,1% полужидкого агара). Касаться руками краев канюли, иглы и краев пробирок нельзя. Ватно-марлевую пробку полагается держать на весу за ее наружную часть.

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 2-х чашек Петри с подогретой питательной средой, растирая шпателем. Одна чашка содержит "шоколадный" агар, вторая - сывороточный. Посевы ставят в термостат при +370С и создают условия повышенного содержания СО2 в атмосфере термостата. Пробирка с ликвором в полужидком агаре инкубируется в термостате.

Нативная спинномозговая жидкость, оставшаяся в пробирке, исследуется в серологических реакциях и используется для приготовления мазков.

Отношение к окраске по Граму у нейссерий выражено недостаточно четко, поэтому они окрашиваются метиленовым синим или по Граму в модификации Калины. Прямая микроскопия окрашенных мазков спинномозговой жидкости в известной части случаев позволяет установить наличие бактерий, вызывающих гнойный менингит.

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

Пневмококки имеют вид ланцетовидных диплококков и коротких цепочек, образуют капсулу. Они грамположительны, хорошо красятся всеми анилиновыми красителями, при этом капсула остается неокрашенной и заметна только на окрашенном фоне.

Результаты бактериоскопии немедленно сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа. При достаточном количестве исследуемого материала рекомендуется 2 - 3 капли засеять в чашку с питательной средой для определения чувствительности к антибиотикам.

2-й день исследования

Независимо от результатов бактериоскопии ликвора просматривают засеянные чашки. Просмотр чашек ведут визуально и с помощью бинокулярного стереоскопического микроскопа, лупы МБС. Во внимание принимают все колонии. Чашки с отсутствием роста инкубируют одни сутки. Готовят препараты-мазки, окрашивают, ставят реакцию с 3% раствором КОН и биохимические тесты - на оксидазу, каталазу, уреазу. Гемофилам присущ резкий специфический запах, исходящий от посевов.

Морфология менингококковых колоний "шоколадном" агаре - нежные, сероватого цвета, с блестящей поверхностью и ровными краями, имеют маслянистую консистенцию, размерами от 0,1 до 3,0 мм. Менингококки не меняют цвета cреды. 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 обильный рост. 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 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 на обеих средах - мелкие (0,1 - 1,0 мм), иногда плоские, с вдавлением в центре. На "шоколадном" агаре они окружены зоной желто-зеленого гемолиза (тип α-гемолиза). По внешнему виду колонии пневмококков на обеих средах трудно отличить от колоний стрептококков группы В, зеленящих стрептококков, энтерококков (S.feacalis), 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 антибиотикочувствительности. Определение чувствительности энтеробактерий и стафилококков проводят на среде АГВ. Эта среда служит основой для определения чувствительности к антибиотикам менингококков при добавлении 20% сыворотки. H.influenzae и пневмококков - при добавлении соответствующего количества крови. Приготовление питательных сред и постановка теста на антибиотикочувствительность производится в соответствии с действующими указаниями.

На этом этапе возможна выдача окончательного ответа, при положительной реакции со специфическими антисыворотками для H.influenzae, N.meningitidis и Str. pneumoniae.

Колонии, подозрительные на менингококки, отсевают на скошенный сывороточный агар или сектор чашки и инкубируют при +370С.

Колонии, подозрительные на пневмококки, стрептококки и др. отсевают на 2 сектора кровяного агара (с 5% крови) для последующего определения чувствительности к желчи и постановки тестов на лекарственную чувствительность.

Если число выросших колоний мало (1 - 2), то их отсевают на чашку с сывороточным или "шоколадным" агаром для накопления микробной массы, а идентификацию микроба проводят еще через одни сутки.

При менингитах новорожденных и детей раннего возраста, в также изредка в других возрастных группах, помимо трех перечисленных видов микроорганизмов этиологическими факторами могут быть энтеробактерии (E.coli, S.marcescens, K.pneumoniae, Salmonella, Citrobacter, Enterobacter), синегнойная палочка (P.aeruginosa), Acinetobacter calcoaceticum, 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.calcoaceticum проводят исследования в соответствии с 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 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, разлитом слоем 3 мм.

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

Если прямой посев на чашки с питательной средой не дал роста колоний, то делается высев на чашки с сывороточным, "шоколадным" агаром из инкубированной в термостате смеси ликвора с полужидким агаром (среда "обогащения").

При отрицательных результатах высев со среды "обогащения" повторяют через 1 - 2 дня в течение 5 дней инкубации в термостате.

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

3-й день исследования

Культуры, отсеянные из отдельных колоний, просматривают под МБС и ставят пробу с 3% раствором КОН.

Для оценки чистоты выросшей культуры готовят мазки и просматривают. При обнаружении морфологически типичных грамотрицательных кокков, проводят идентификацию, серогруппирование идентификационной культуры, а также используют эту культуру для определения лекарственной устойчивости (если эти тесты не были сделаны на 2-й день).

Учитывают результаты посевов, сделанных на 2-й день исследования. На этом этапе возможна выдача окончательного положительного ответа для менингококков и др. микроорганизмов (кроме пневмококков и стрептококков).

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

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 +370С 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 лекарственным препаратам (если это не было сделано раннее).

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

В этот же день ставят пробы для идентификации других возможных возбудителей, а также тест на лекарственную чувствительность (если это не было сделано на 2-й день).

4-й день исследования

Учитывают результаты посевов с целью дифференциации менингококков от непатогенных нейссерий и Br.catarrhalis и чувствительности к химиопрепаратам (если это не было сделано на 3-и сутки). Возможна выдача положительного ответа.

Культуру менингококков, выросшую на сывороточном агаре при +370С, можно использовать для серологической идентификации менингококков в реакции агглютинации или в реакции преципитации в агаре, а также для определения лекарственной устойчивости.

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

## **Бактериологическое исследование крови**

При подозрении на менингококцемию или сепсис проводят бактериологическое исследование крови. В качестве экспресс-метода диагностики рекомендуется приготовление мазка "толстой капли" из крови, взятой из вены или пальца.

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. Результаты бактериоскопии немедленно сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа.

Кровь, взятую стерильно из вены, засевают на 0,1% полужидкий агар или жидкую питательную среду в отношении 1:10, т.е. 1 - 2 мл крови можно посеять в пробирку с 7 - 10 мл полужидкого агара или 5 - 10 мл крови засеять во флакон с 50 мл среды. После суточной инкубации материал высевают на сывороточный и "шоколадный" агар в чашки Петри. При наличии роста готовят препараты для микроскопии. При отрицательном результате рекомендуется инкубация в течение недели с высевами через день. Выделение и идентификацию гемокультур проводят также, как при исследовании спинномозговой жидкости.

## **Бактериологическое исследование экссудата из петехий**

При менингококцемии иногда удается обнаружить менингококки непосредственно в экссудате кожных петехий.

Для этого вначале обтирают кожу вокруг петехий 70% спиртом. В случае образования некроза в центре петехии экссудат можно взять прокаленной и остуженной бактериологической петлей из некротизированных участков. При неповрежденной коже экссудат берут стерильной тонкой иглой, соединенной со шприцем, в котором имеется 0,1 - 0,2 мл физиологического раствора. Физиологический раствор вводят в толщу петехии и отсасывают обратно.

Посев экссудата производят в чашки Петри с сывороточным агаром, содержащим антибиотики ристомицин или линкомицин для подавления кожной флоры. Из остатка экссудата готовят препараты-мазки. Мазки из содержимого петехий можно приготовить в виде отпечатков. Для этого стерильной петлей осторожно скарифицируют поверхность петехий, затем прикладывают несколькими местами предметное стекло (стерильное), фиксируют пламенем горелки, окрашивают. На основании данных микроскопии возможна выдача предварительного ответа.

Засеянные чашки инкубируют при +370С 24 часа (в случае отсутствия роста - 48 часов); подозрительные на менингококки колонии отсевают и изучают по описанной схеме (п. 3).

## **Бактериологическое исследование носоглоточной слизи на менингококк**

1-й день исследования

Исследуемый материал - слизь с задней стенки глотки - берут натощак или через 3 - 4 часа после еды стерильным ватным тампоном, укрепленным на изогнутой проволоке.

Материал берут с обязательным надавливанием шпателем на корень языка. Тампон вводят концом кверху 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.

Материал может быть засеян на месте его взятия на чашку Петри с питательной средой, или средой обогащения, или взят смоченным тампоном, который затем доставляют в лабораторию. При посеве на чашку материал втирают на 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 одни сутки вокруг диска, в зоне 1 см, рост грамположительной флоры будет подавлен, что увеличивает возможность выделения колоний нейссерий.

Засеянные чашки доставляют в лабораторию, тщательно защищая их от охлаждения, в зимнее время применяют грелки (+35 - +400С) и немедленно помещают в термостат при +370С.

Тампоны с исследуемым материалом, погруженные в полужидкую или транспортную среду, доставляют в лабораторию, также тщательно защищенными от охлаждения. Тампоны в 0,1% полужидком агаре (обогащения) помещают в термостат для подращивания флоры.

Смоченные тампоны или тампоны в транспортной бульонной среде засевают на чашку с сывороточным агаром, лишенным ингибитора, без предварительного подращивания. Посев делают отжатым тампоном. Засеянные чашки помещают в термостат.

При транспортировке материала на короткое расстояние (1 - 2 часа езды до лаборатории) 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 тампоны перевозят, погруженными в транспортную среду.

Полужидкая среда обогащения может использоваться независимо от сроков транспортировки.

2-й день исследования

Просматривают чашки, засеянные накануне, визуально и под лупой-микроскопом МБС, подозрительные колонии отсевают на секторы чашки с сывороточным агаром (не менее 3 - 5 колоний). На средах с ингибиторами вырастают только грамотрицательные бактерии, преимущественно представители нейссерий. При отсутствии роста в чашках с антибиотиками проводят повторный просмотр их через 40 - 48 часов после посева. В эти же сутки делают высев из полужидкой (0,1%) среды обогащения на чашку с сывороточным агаром без ингибитора.

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 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 в эти сутки ставят реакцию агглютинации с группоспецифическими сыворотками.

4-й день исследования

Просматривают посевы, сделанные в предыдущий день. Учитывают результаты роста на бессывороточном и желчном агаре (при +370С), сахаролитическую активность, ставят реакцию с водным раствором Люголя на продукцию полисахарида, проводят окончательную серологическую идентификацию менингококков по реакции агглютинации.

В этот же день выдают окончательный положительный или отрицательный ответ. Результаты бактериологического исследования с полужидкой среды, соответственно, будут получены на сутки позднее.

## **Исследование трупного материала**

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

Ликвор берут стерильной пипеткой из около оболочечного пространства (во время извлечения головного мозга из полости черепа), в стерильную пробирку в количестве 3 - 5 мл и немедленно высевают на чашки с питательными средствами. В количестве 0,1 мл исследуемый материал наносят в центр чашки и распределяют по ее поверхности покачиванием, растирать шпателем не рекомендуется.

Надо иметь в виду, что рост на чашках может быть смешанным из-за попадания непатогенной микрофлоры, поэтому к общепринятому набору питательных сред следует добавить чашку сывороточного агара с антибиотиком (ристомицин, линкомицин).

Гной с мозговых оболочек берут стерильным ватным тампоном и засевают газоном или штрихами на чашки с шоколадным сывороточным агаром 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.

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

# **Методы серологической идентификации менингококков или их антигенов**

## Реакция агглютинации в полистироловых пластинах

При постановке реакции агглютинации (РА) используют полистироловые пластины или большие стекла. Для каждой испытуемой культуры менингококков используют один ряд лунок пластины. Число горизонтальных лунок соответствует числу агглютинирующих группоспецифических сывороток. Жидкую сыворотку каждой серогруппы в лунке разводят вдвое (1 капля сыворотки + одна капля взвеси культуры). В отдельной лунке каждого ряда готовят взвесь испытуемых культур. Для этого запаянной изогнутой пастеровской пипеткой бактериальную массу снимают с чашки Петри и тщательно эмульгируют в физиологическом растворе. Для получения оптимальной рабочей густоты к взвеси добавляют по 1,0 мл физиологического раствора. Взвесь разносят по 1 капле в горизонтальные лунки.

Пластины встряхивают в течение 1 мин. руками или шуттеле-аппарате. Учитывают реакцию в течение первых 3-х минут. Контролем служит лунка, в которой готовят исходную взвесь бактерий в физиологическом растворе.

## **Реакция микропреципитации для определения серогруппы менингококков**

В чашку Петри или стеклянную пластинку размером 9 \* 12 см наливают 20 мл, а на предметное стекло - 5 мл расплавленного 1% агара на физиологическом растворе. В застывшем агаре с помощью металлических трубок просекают отверстия (лунки) диаметром 3 мм, из которых агаровые пробки удаляют путем отсоса этой же трубкой или острием иглы. Расстояние между центрами лунок 0,5 см. Лунки в агаре располагают следующим образом: в центральную лунку пастеровской пипеткой наливают сыворотку, в периферические - прогретые при +1000С в течение 15 минут взвеси испытуемых культур. Микробную кипяченую взвесь можно хранить в холодильнике в течение 2-х недель. Для реакции микропреципитации используют не разведенные сыворотки.

Концентрация испытуемой суточной культуры менингококка, выращенной на 20% сывороточном агаре, должна составлять 30 - 60 единиц, т.е. быть в 3 - 6 раз гуще оптического стандарта мутности в 10 единиц. Чашки Петри или стеклянные пластины с лунками, заполненными сывороткой и антигенами, помещают во влажную камеру (эксикатор с водой) на 24 - 48 часов при +20 - +220С. По окончании срока учитывают реакцию. Реакция проявляется только со штаммами менингококков гомологичной серогруппы в виде линии преципитации.

## **Метод ВИЭФ**

У больного гнойным менингитом, желательно до применения химиотерапии, берут СМЖ, которую исследуют на присутствие специфического полисахаридного антигена. Для этого используют аппарат для иммуноэлектрофореза ПЭФ-3 или другой любой марки. В аппарат заливают "камерный" веронал-мединаловый буфер, содержащий в 1 л дистиллированной воды 21,9 г мединала и 3,45 веронала (веронал надо греть на водяной бане до полного его растворения) рН = 8,6. Приготовленный 1% агар, растопленный и остуженный до +600С, наносят в количестве 20 мл на поверхность стеклянной пластинки, размером 9 \* 12 см, помещенную на горизонтальный столик. После застывания агара пробойником или металлической трубкой, диаметр которой равен 3 мм, высекают 2 параллельных ряда отверстий на расстоянии 3 мм друг от друга, по числу групповых сывороток. Ряды располагают перпендикулярно к направлению силы тока.

Антисыворотки вносят в лунки, расположенные со стороны анода (+), а спинномозговую жидкость в лунки со стороны катода (-).

Сыворотку вносят в отдельную лунку. В отдельную лунку помещают заведомо положительный контроль, который позволяет оценить правильность постановки теста. В качестве контроля используют менингококковую вакцину серогруппы А или С с гомологичной сывороткой, в концентрации 10 - 20 мкг/мл. Приготовленную пластинку помещают в аппарат для иммуноэлектрофореза на 20 - 30 мин. при силе тока 12 - 15 МА на 1 стекле. Аппарат работает при комнатной температуре. При положительной реакции через 10 мин. после выключения тока, между лунками (с одной из сывороток и ликвором) появляются линии преципитации, которые хорошо видны в проходящем свете. В случае, когда антигена мало, линии преципитации проявляются на следующие сутки (пластинка находится во влажной камере). Для ускорения этого процесса в тот же день, можно 2 - 3 раза пропускать ток через пластинку в течение 5 - 10 мин, т.е. время анализа увеличивается до 60 мин.

# **Использованию реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) для выявления антител при менингококковой инфекции**

## **Показания к проведению серологических исследований**

РНГА с менингококковыми эритроцитарными диагностикумами серогрупп А, В и С проводят в следующих случаях:

а) как дополнительный метод диагностики менингококковой инфекции. Обязательным требованием является исследование сывороток крови от больных, взятых в разные сроки от начала заболевания, т.е. в динамике (в начале заболевания, на 7 и 15 день болезни).

б) для ретроспективного выявления локализованных форм менингококковой инфекции в очагах заболевания;

в) при проведении иммуно-эпидемиологических исследований среди населения с целью определения соотношения серонегативных и серопозитивных контингентов;

г) при оценке иммунологической эффективности противоменингококковой вакцинации.

## **Методика постановки РНГА с эритроцитарными менингококковыми диагностикумами**

РНГА можно ставить как макро-, так и микрометодом, в последнем случае используют только микротитраторы системы "Такачи".

Различия между этими методами заключаются лишь в объемах используемых ингредиентов и сроках учета результатов реакции. При макрометоде реагирующая смесь в каждой лунке состоит из 0,5 мл соответствующего разведения сыворотки крови и 0,25 мл диагностикума. В микрометоде объемы соответственно уменьшаются: 0,05 мл сыворотки и 0,025 мл диагностикума.

Учет результатов исследования в микротитраторе проводят спустя 2 часа инкубации в термостате; при макрометоде иногда требуется дополнительная экспозиция в течение 1 - 2 часов при комнатной температуре.

При постановке РНГА можно использовать многоканальные пипетманы с указанными объемами ингредиентов.

### **Взятие крови**

Для проведения серологических исследований кровь от больных ГФМИ или с подозрением на эту инфекцию забирают из локтевой вены с соблюдением обычных правил асептики; при массовых серологических исследованиях кровь берут из пальца.

После образования сгустка, полученную сыворотку отсасывают стерильной пипеткой в стерильную посуду (пробирку, ампулы). Хранят сыворотку крови в холодильнике при +40С. В реакции исследуют сыворотки крови без признаков пророста.

Перед постановкой РНГА сыворотки разводят 1:5 исходным буфером (ЗФР). Титрование сывороток проводят в стабилизирующем буфере.

### **Учет реакции**

Реакцию оценивают по общепринятой 4-х плюсовой системе.

За титр противоменингококковых антител принимают максимальное разведение сыворотки крови, в котором наблюдают четко выраженную агглютинацию эритроцитов с интенсивностью не менее, чем на 2+, при условии, что в предыдущих лунках реакция шла на 4+ или 3+.

Сыворотки крови с разведения 1:5 и выше с четко выраженной агглютинацией эритроцитов, оценивают как положительные.

## **Рекомендуемые сроки, кратность обследования и трактовка серологических результатов**

При выборе оптимальных сроков и кратности обследования больных ГФМИ и для правильной трактовки серологических результатов необходимо принимать во внимание ряд факторов, влияющих на уровень антител: возраст больного, преморбидный фон, клиническую форму, тяжесть и период болезни; сопутствующие заболевания, серологические особенности возбудителя. При менингококковой инфекции, так же как и при других инфекционных заболеваниях, правильная оценка результатов серологических исследований может быть дана только при их сопоставлении с эпидемиологическими и клиническими данными.

Оптимальные сроки взятия крови у больного ГФМИ - первые дни болезни (1-3 день), вторая, третья и последующая недели болезни.

Первую сыворотку крови необходимо брать сразу же при поступлении больного в стационар, последующие через 7 - 10 дней.

##

## **РНГА при генерализованных формах менингококковой инфекции**

### **РНГА с диагностикумами А и С**

Антитела к группоспецифическим полисахаридам менингококков серогрупп А и С при ГФМИ можно выявить уже в первые дни болезни.

Число серопозитивных лиц среди взрослых больных составляет в эти сроки около 40%. Максимальный уровень антител отмечается на 2 - 3-ей неделях болезни, с 4 - 5 недели уровень антител постепенно снижается.

За условно-диагностический титр антител к полисахаридам менингококков серогрупп А и С у детей старше 3-х лет и взрослых принимают положительную реакцию в разведении сыворотки крови 1:40 - 1:80, т.к. у лиц, не инфицированных менингококками в момент обследования, антитела в таких титрах встречаются сравнительно редко (9-11%).

У детей в возрасте до 1 года продукция антител выражена слабо, в связи с чем положительные реакции наблюдаются обычно в более поздние сроки (со 2 недели болезни).

У детей моложе 3-х лет за условно-диагностический титр антител к полисахаридам А и С принимают положительную реакцию в разведении 1:20 и выше, т.к. при отсутствии менингококковой инфекции у детей этого возраста антитела или не обнаруживаются, или встречаются в единичных случаях в титрах не выше чем 1:5 - 1:10.

Интенсивность антителообразования не одинакова при различных клинических формах менингококковой инфекции. При менингококцемии и сочетанных формах (менингококцемия + менингит) уровень антител обычно выше, чем при других формах болезни.

При тяжелом течении ГФМИ и особенно при инфекционно-токсическом шоке противоменингококковые антитела обнаруживаются в низких титрах, а в отдельных случаях не выявляются вообще. При очень тяжелом течении болезни особенно при наличии тяжелых осложнений (отек и набухание мозга) антителообразование выражено слабо: в остром периоде болезни обнаруживают около 10% серопозитивных проб с низкими титрами (1:5 - 1:10). В дальнейшем, при улучшении состояния больных титры антител и число серопозитивных проб может возрастать.

Обнаружение уже на 1 неделе болезни антител к полисахаридам менингококков серогрупп А и С в титре 1:160 и выше подтверждает менингококковую этиологию заболевания. В некоторых случаях такие титры антител, обнаруженные на 1 неделе болезни, могут сохраняться и в более поздние сроки заболевания. Хотя у данных больных не наблюдается сероконверсии, высокие показатели РНГА могут служить достаточным основанием для серологического подтверждения диагноза ГФМИ.

Диагноз ГФМИ определяется как этиологически подтвержденный при наличии динамики (четырехкратного и более) нарастания уровня антител. При двукратном нарастании титра антител - диагноз оценивается как подтвержденный лишь при выраженной клинической картине.

Число этиологически подтвержденных случае в ГФМИ методом РНГА может достигать: у взрослых 80%, у детей, в среднем 70% (в возрастной группе детей до 3-х лет - 60%, в старших возрастных группах - 80%).

### **РНГА с диагностикумом серогруппы В**

При интерпретации серологических данных, полученных при работе с эритроцитарным диагностикумом на основе полисахарида менингококков серогруппы В, необходимо учитывать следующие моменты.

Изучение иммуноструктуры населения с помощью РНГА с диагностикумом серогруппы В представляет определенные сложности из-за сходства химической структуры В-полисахарида менингококка и капсульного полисахарида Е.coli K1. Существует возможность наличия перекрестных реакций, что усложняет интерпретацию результатов относительно менингококка серогруппы В. Диагностикум может быть использован для подтверждения диагноза ГФМИ при исследовании сывороток крови в динамике - взятой в начале заболевания и через 2, 3 недели.

Генерализованные формы менингококковой инфекции, обусловленные менингококками серогруппы В, наиболее часто (до 60%) диагностируются у детей первых трех лет жизни, у которых антителообразование выражено слабо. При ГФМИ у взрослых, в большинстве случаев, в первые дни болезни уровень антител к менингококкам серогруппы В составляет 1:20 - 1:40, с последующей сероконверсией на 2 - 3 неделях. В отдельных случаях (14%) содержание антител на 2 - 3 неделях болезни может достигать титров 1:640 - 1:1280 и выше.

### **Групповая специфичность РНГА**

При постановке РНГА с набором эритроцитарных диагностикумов может выявляться одновременное присутствие антител к нескольким полисахаридам. В таких случаях серогруппу менингококков, вызвавших заболевание у данного больного, определяют по динамике нарастания уровня антител к одному из полисахаридов. При этом разница показателей парных сывороток должна быть не меньше чем на два разведения. При получении одинаковых титров антител к двум полисахаридам в условно-диагностических титрах, диагностируется ГФМИ без установления серогруппы возбудителя.

### **РНГА при локализованных формах менингококковой инфекции (назофарингит и бактерионосительство)**

При локализованных формах менингококковой инфекции серологические исследования не следует рассматривать как метод диагностики, поскольку вопрос о носительстве или менингококковом назофарингите решается на основании бактериологического обследования. Но в ряде случаев при проведении исследований в очагах ГФМИ серологические данные могут послужить дополнительным тестом, ретроспективно подтверждающим клинико-эпидемический диагноз менингококковой инфекции. При этом следует проводить обязательное исследование парных образцов сывороток крови, полученных с 10 - 14 дневным интервалом.

При назофарингите антителообразование более выражено, чем при бактерионосительстве. У больных назофарингитом менингококковой этиологии в 90% случаев выявляются противоменингококковые антитела, в 50% случаев с титрами от 1:40 и выше. Среди бактерионосителей независимо от серогруппы выделенного возбудителя специфические антитела определяют в 65% случаев, а с титрами от 1:40 и выше у 30% носителей.

В сыворотках крови, полученных от носителей, так же как и от больных, могут выявляться антитела к нескольким полисахаридам менингококков. Нарастание антител к гомологичной серогруппе чаще отмечают при носительстве менингококков серогруппы А. В отдельных случаях динамика антител (сероконверсия) не позволяет серологически установить доминирующую серогруппу менингококков. В этом случае определяют носительство без установления серогруппы.

### **РНГА при иммуно-эпидемиологических исследованиях**

Целью иммуно-эпидемиологических исследований является определение числа лиц вероятно восприимчивых к менингококковой инфекции и групп риска. Анализ проводят по числу серопозитивных и серонегативных лиц с учетом существующей эпидемической ситуации.

Например, в период эпидемического неблагополучия увеличивается число серопозитивных лиц и соответственно уменьшается число серонегативных к эпидемической серогруппе менингококков. В период спорадической заболеваемости, наоборот, растет число серонегативных лиц.

При проведении иммуно-эпидемиологических исследований среди населения объем репрезентативных выборок устанавливается эпидемиологом в соответствии с численностью и возрастным составом коллектива, района, населенного пункта.

Определяемый фоновый уровень противоменингококковых антител связан с заболеваемостью менингококковой инфекцией на данной территории и уровнем носительства. Наиболее высокий уровень антител в разные эпидемические периоды определяют к менингококкам серогруппы В, что, возможно, отражает их серологическое родство с E.coli K1, моракселлой, непатогенными нейссериями. При этом число серопозитивных проб с титрами антител 1:20 и выше может достигать 90%.

К менингококкам серогруппы С уровень антител наименьший, число серопозитивных сывороток с титром антител 1:20 и выше составляет 8%.

Уровень антител к менингококкам серогруппы А дает достаточно четкую характеристику эпидемиологической ситуации и отражает широту циркуляции возбудителя.

Анализ серологических результатов эпидемиологических исследований проводят на основании расчета следующих показателей:

а) процента серонегативных проб, полученных с каждым из эритроцитарных диагностикумов (А, В и С), который может отражать число вероятно восприимчивых лиц к менингококковой инфекции;

б) процента серопозитивных проб (все серопозитивные сыворотки крови, начиная с разведения 1:5 и выше), из числа которых выделяют пробы с титрами антител:

 - в возрастной группе до 3-х лет с 1:10 и выше к полисахаридам А и С, с 1:20 и выше к полисахариду В;

 - в старших возрастных группах у детей и у взрослых с 1:20 и выше к полисахаридам А и С, с 1:80 и выше к полисахариду В. Процент сывороток крови с указанными выше уровнями антител отражает доминирующие на данной территории серогруппы менингококков.

### **Применение РНГА для оценки эффективности вакцинопрофилактики менингококковой инфекции**

Формирование поствакцинального иммунитета носит группоспецифический характер. В связи с этим, в зависимости от используемой для профилактики менингококковой вакцины, серологические исследования для оценки эффективности вакцинации проводят с применением РНГА с гомологичным эритроцитарным диагностикумом.

При вакцинации взрослых специфические противоменингококковые антитела к полисахариду А выявляют в высоких титрах (1:40 - 1:640 и выше) не менее чем у 80% привитых уже на 3 - 4 неделе после вакцинации. На протяжении последующих 6 - 8 месяцев у привитых титры антител несколько снижаются, но сохраняются на повышенном уровне не более двух лет.

# **Современные методы генодиагностики гнойных бактериальных менингитов**

Современные методы генодиагностики гнойных бактериальных менингитов основаны на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Принцип ПЦР заключается в многократной амплификации генетического материала, содержащегося в исследуемом образце, с помощью фермента термостабильной ДНК-полимеразы. При генодиагностике ГБМ в качестве образца используются исходно стерильные жидкости организма человека, в первую очередь, спинномозговая жидкость. Размножению и идентификации подвергают фрагменты генома возбудителей ГБМ, то есть менингококков, пневмококков, гемофильной палочки.

Генотипирование предполагает более детальную характеристику амплифицированных участков генома с помощью ряда методик.

По сравнению с традиционными методами диагностики, генодиагностика с использованием амплификационных технологий отличается высокой чувствительностью и позволяет использовать для диагностики образцы, в которых не содержится живых возбудителей, но только фрагменты их генетического материала.

Результаты генотипирования характеризуются большей однозначностью по сравнению с морфологическими, биохимическими или иммунологическими методами классификации микроорганизмов и предоставляют непосредственную информацию для выяснения эволюционных и эпидемиологических связей различных изолятов бактерий.

## **Общие сведения и принципы**

Геномная ДНК возбудителей ГБМ представляет собой достаточно крупную кольцевую хромосому, так, например, генома N.meningitidis состоит из 2.3 миллиона пар оснований и около 2160 генов. Функции многих генов еще неизвестны, однако среди них можно выделить уникальные участки, специфичные для данного рода, вида иди подвида микроорганизмов. Собственно генодиагностика и заключается в том, чтобы размножить и опознать подобный участок, что может быть сделано с помощью ПЦР.

Принцип ПЦР был описан в 1986 г. В основе этого метода лежит многократное копирование с помощью фермента ДНК-полимеразы определенного фрагмента ДНК.

Комплементарное достраивание нитей может начаться не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках – коротких двунитевых участках. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют затравки, представляющие собой специально синтезированнные in vitro олигонуклеотиды длиной около 20 - 30 оснований, называемые праймерами.

Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах амплифицируемого фрагмента и ориентированы таким образом, что синтез ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразой, протекает между ними. Процесс амплификации заключается в повторениии циклов, состоящих из денатурации ДНК, отжига праймеров и синтеза фрагмента ДНК, проходящих при различной температуре, и проводится на приборе с программным контролем температурного режима - термоциклере. В результате происходит экспоненциальное увеличение количества копий специфического фрагмента по формуле 2n, где n - число циклов амплификации. После 30 - 35 циклов амплификации синтезируется 108 копий фрагмента - ампликонов, что делает возможным определение и визуализацию их электрофоретической подвижности в агарозном или акриламидном геле. Праймеры, определяющие специфичность ПЦР, могут быть строго видоспецифичными или с их помощью можно выявить целые роды микроорганизмов.

### **Показания к применению метода**

Показания к применению нового метода начинаются там, где возникают противопоказания к применению классических методов. Идентификация патогена путем микробиологического культивирования из образцов спинномозговой жидкости или крови больного, оставаясь "золотым стандартом" диагностики, имеет серьезные ограничения, обусловленные применением антибиотиков на догоспитальном этапе. Согласно Приказу № 375 МЗ РФ "…на дому следует ввести разовую дозу пенициллина, а при тяжелой менингококцемии предпочтительнее введение левомицетина-сукцината". Подобная практика улучшает прогноз заболевания, но резко снижает число образцов СМЖ, пригодных для микробиологического и последующего эпидемиологического анализа.

В последние годы около половины больных ГБМ, поступавших в инфекционную клиническую больницу получали антибиотики на догоспитальном этапе; при этом в группе больных, получавших антибиотики на дому, летальность была менее 5%, а культуру бактерий из СМЖ (или крови) удавалось получить лишь в 30% случаев; напротив, в группе больных, не получивших антибиотики, летальность была выше 10%, а культуру бактерий получали как минимум в 60% случаев. Кроме того, бактериологическая диагностика занимает не менее суток. Таким образом, ситуация требует разработки и применения "некультуральных" методов идентификации возбудителей ГБМ.

Известным "некультуральным" методом выявления антигенов возбудителей ГБМ является метод латекс-агглютинации (ЛА) с применением соответствующих коммерческих тест-систем. Латексные частицы, покрытые специфическими антителами к антигенам Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae или Haemophilus influenzae, агглютинируют в присутствии бактериальных антигенов, содержащихся в СМЖ; результат агглютинации оценивается визуально. Постановка всей реакции занимает около 10 мин, реакция не требует наличия живых бактерий в СМЖ. Однако чувствительность метода ЛА сравнительно невысока, порядка 70%, что не удивительно, поскольку минимально определяемая концентрация бактерий в СМЖ методом ЛА составляет от 105 до 5\*106 бактерий/мл или от 1 до 50 нг антигена/мл. При этом стоимость тест-систем в пересчете на одну диагностическую реакцию не менее $8.

Основные достоинства ПЦР:

* возможность выявления даже нескольких копий генома бактерий в образце и, как следствие; максимальная диагностическая мощность;
* чувствительность и специфичность, достигающие 100%, высокая воспроизводимость;
* сжатые (в течение нескольких часов) сроки исследования;
* умеренная и постоянно снижающаяся себестоимость (от 100 рублей на одну
* реакцию).

Показаниями к генодиагностике ГБМ являются:

* отрицательные результаты диагностики иными методами;
* использование для диагностики образцов СМЖ, взятых после антибиотикотерапии или на поздних стадиях болезни;
* необходимость срочного диагностического результата;
* замещение дорогостоящих иммунологических методов.

Прямых противопоказаний к применению генодиагностики ГБМ не существует. Однако, с одной стороны, ПЦР способна выявить малейшее бактериальное загрязнение тестируемого образца и рабочих растворов; с другой стороны, в ряде биологических жидкостей, в том числе, СМЖ возможно присутствие ингибиторов ПЦР. Поэтому только использование при постановке реакции положительных и отрицательных контролей, высокое и периодически проверяемое качество всех используемых реагентов, аккуратность выполнения исследования позволяют избежать как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов.

## **Выделение ДНК**

Основное необходимое оборудование и расходные материалы:

1) настольный бокс с бактерицидной лампой ("Циклотемп", СП "РТС");

2) термостат для пробирок типа “эппендорф” на 25-1000С ("Биоком");

3) микроцентрифуга до 12-16 тыс. g. ("Elmi", "Hettish");

4) центрифуга /вортекс (“"Биоком");

5) набор автоматических пипеток переменного объема («Биоком»);

6) одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток переменного объема, одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл («Биоком», «Хеликон»);

7) отдельный халат и одноразовые перчатки. Аналогичное оборудование и материалы общелабораторного назначения понадобится и на следующих этапах.

ДНК из бактериальной суспензии выделяется стандартными методами лизиса/сорбции/отмывания (например, с использованием наборов “ДНК-сорб”, ЦНИИ эпидемиологии) или фенол-хлороформной экстракции. Концентрации ДНК в пробе при необходимости можно определить спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Число микроорганизмов, эквивалентных данной концентрации ДНК, рассчитывается исходя из приблизительного соотношения: 1 бактериальная клетка содержит 4 фемтограмма ДНК.

Образцы СМЖ можно использовать в реакции амплификации непосредственно; перед исследованием проба (100 мкл СМЖ, покрытые сверху 100 мкл минерального масла) инкубируется в термостате для микропробирок 20 минут при 990С для разрушения бактерий, после чего центрифугируется при 10000 g в течение 1 минуты при комнатной температуре и супернатант отбирается для постановки ПЦР. Концентрацию и чистоту ДНК в подобной пробе можно повысить, добавив этап выделения путем сорбции. При этом, чтобы убедиться, что в каждом образце СМЖ выделение ДНК прошло успешно, в образец СМЖ пред выделением ДНК добавляется внутренний контроль - препарат ДНК, например, вируса гепатита В (HBV), а также приготовляется дополнительная пробирка без СМЖ, но с HBV, которая представляет собой отрицательный контроль выделения. В дальнейшем для каждого образца СМЖ ставится реакция на выявление ДНК HBV, которая должна дать положительные результаты.

## **Анализ и учет результатов**

Продукты амплификации выявляются и дифференцируются методом электрофореза в 1.8% агарозном геле, содержащим бромистый этидий, с дальнейшей визуализацией геля при подсвечивании ультрафиолетовым излучением. Длина амплифицированного фрагмента гена 16S РНК Neisseria – 341 пар нуклеотидов, Haemophilus - 516 п.н., Streptococcus– 792 п.н., длина специфических ампликонов N. meningitidis серогруппы А – 349 п.н., группы В – 539 п.н., С- 209 п.н.. Фиксацию, хранение и анализ полученных изображений гелей удобно проводить с помощью специализированных систем обработки изображения (Gel-Doc, БиоРад; BioTest, ЦНИИ эпидемиологии); однако при небольшом объеме исследований возможна и непосредственная визуальная оценка и/или фотографирование результатов.

## **Ожидаемый эффект от внедрения метода**

Эффективность использования метода складывается из нескольких компонентов:

Во-первых, ПЦР позволяет диагностировать в два с половиной раза больше случаев менингококкового менингита и в два раза больше случаев пневмококкового менингита по сравнению с культивированием.

По сравнению с методом ЛА, ПЦР можно выявить в два раза больше случаев менингококкового менингита и в 1.4 раза больше случаев пневмококкового менингита. В случае менингита, вызываемого гемофильной палочкой типа b, эффективность ПЦР и ЛА приблизительно одинаковы, что вероятно объясняется большим накоплением бактериального антигена в СМЖ при данной патологии. Во-вторых, сроки ПЦР-диагностики составляют 3-4 часа, а микробиологической диагностики – более суток.

В-третьих, себестоимость микробиологической диагностики, дополненной методом ЛА, - не менее 500 руб. на одного пациента, а себестоимость ПЦР-диагностики бактериальных инфекций в условиях ЦННИ эпидемиологии - менее 50 руб.

Клинические подходы к терапии менингитов различной этиологии не совпадают, поэтому своевременная дифференциальная диагностика является важным элементом эффективного лечения. Кроме того, расширенное серогруппирование менингококков позволяет при определенной ситуации принять решение о выборочной или массовой вакцинации населения.

## **Задачи**

Идентификация и классификация бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, относятся к числу ключевых задач как прикладной, так и фундаментальной микробиологии и эпидемиологии.

Эпидемиолог должен быть готов ответить на два достаточно различных типа вопросов:

1) Являются ли штаммы изолированные в конкретном очаге заболевания идентичными, генетически родственными или не взаимосвязанными? Это задача краткосрочного и локального эпидемиологического расследования. Результатом такого расследования должно стать устранение возбудителя инфекции из окружающей среды, определенных продуктов и других источников инфекции, включая людей.

2) Как связаны штаммы, циркулирующие на данной территории, со штаммами, распространенными на других территориях или в другие годы? Это задача долгосрочного и глобального эпидемиологического анализа. Итогом анализа должно стать выяснение закономерностей распространения, циркуляции и эволюции патогенных штаммов и клонов и создание методов эпидемиологического надзора и прогноза, учитывающих эти закономерности.

# **Сроки выдачи ответов и их формулировка**

При бактериологическом обследовании ликвора и крови сроки выдачи и формулировка ответов таковы:

На 1-й день на основании прямой бактериоскопии ликвора и толстой капли крови дают предварительный ответ, в зависимости от результата формируется в трех вариантах:

а) при наличии в мазках большого числа морфологически типичных бактерий пишут: "В спинномозговой жидкости (крови) при прямой бактериоскопии обнаружены грамотрицательные кокки (или грамположительные палочки), сходные по морфологии с менингококками, или пневмококками, или H.influenzae. Исследование продолжается";

б) при наличии в мазках единичных бактерий пишут: "В спинномозговой жидкости (крови) при прямой бактериоскопии обнаружены единичные (или парные) клетки кокков (или палочек и т.д.). Исследование продолжается";

в) при отсутствии каких-либо бактериальных клеток пишут: "В спинномозговой жидкости (крои) при прямой бактериоскопии бактерий не обнаружено".

На основании результатов серологических реакций (ВИЭФ, ЛА и др.) ликвора дают ответ, который в зависимости от результатов формулируют следующим образом:

а) при выявлении специфического антигена пишут: "В спинномозговой жидкости выявлен специфический антиген (менингококквый, пневмококковый и H.influenzae тип "В" и др.)\";

б) при отрицательном результате пишут: "В спинномозговой жидкости специфические антигены не выявлены".

На 2-й день выдают ответ также предварительного характера, который в зависимости от результатов бактериологического исследования формулируют следующим образом:

а) при росте бактерий, типичных по морфологическим и культуральным свойствам для нейссерий и других родов, пишут: "При прямом посеве спинномозговой жидкости (крови) получен рост нейссерий (или стафилококков, стрептококков, грамотрицательных палочек и др.). Изучение культуры продолжается";

б) при наличии четко выраженной реакции агглютинации выросшей культуры с одной из специфических сывороток и положительной бактериоскопии мазка может быть дан окончательный положительный ответ: "При исследовании спинномозговой жидкости (крови) получен рост: H.influenzae, N.meningitidis, Str.pneumoniae и др.)";

в) при отсутствии роста пишут: "При прямом посеве спинномозговой жидкости (крови) роста бактерий не обнаружено. Исследование продолжается."

На 3-й день на основании культурально-биохимический свойств бактерий, отсеянных с чашки на 2-й день, выдают окончательный ответ: "Из спинномозговой жидкости (крови) выделена культура менингококков серогруппы А, В и т.п. (или негруппируемая)". В редчайших случаях "M.catarrhalis или непатогенные нейссерии".

В этот же день может быть дан предварительный ответ о росте (или его отсутствии) бактерий в результате высева из среды обогащения. Формулировка та же, что и при оценке результатов прямого посева с чашки. В этот же день выдают окончательный положительный ответ на пневмококки, который формулируют: "Из спинномозговой жидкости (крови) выделена культура Str.pneumoniae".

На 4-й день может быть выдан окончательный положительный ответ о видовой принадлежности нейссерий, выросших при прямом посеве, а также других бактерий.

На этом же этапе, как и в следующие дни (вплоть до 5-го дня), может быть выдан окончательный положительный ответ, полученный в результате высева из Среды обогащения. Формулировка та же.

Окончательный отрицательный ответ выдают не ранее 5-го дня, когда при последнем высеве из среды обогащения (на 5-й день ее инкубации) не обнаруживают роста бактерий. Его формулировка: "При инкубации спинномозговой жидкости (крови) на среде обогащения в течение 5 дней бактерий выделить не удалось".

При бактериологическом исследовании отпечатков-мазков из петехий больного или кусочков трупного материала дают предварительный ответ, который в зависимости от результатов формулируется в трех вариантах.

Окончательный отрицательный ответ выдается не ранее 5-го дня с момента посева исследуемого материала.

При бактериологическом исследовании слизи из носоглотки выдают только окончательные ответы. Сроки выдачи и формулировки следующие: на 4-й день при выделении культуры менингококка выдают положительный ответ: "В носоглоточной слизи обнаружены менингококки определенной серогруппы или негруппируемые".

В случаях добавочного отсева колоний с чашек, а также при использовании полужидкой среды обогащения сроки выдачи ответа соответственно отодвигаются на сутки. При отсутствии роста менингококков в посевах выдают отрицательный ответ: "В носоглоточной слизи менингококк не обнаружен".

# **Заключение**

Из-за полиэтиологичности возбудителей вопросы эпидемиологии и профилактики бактериальных менингитов неоднозначны и зависят от вида возбудителя, вызвавшего менингит. В этой связи основополагающей составляющей в надзоре за бактериальными менингитами является микробиологический мониторинг, позволяющий определять их этиологическую структуру на каждой конкретной территории за определенный временной период. Этиологическую расшифровку следует рассматривать как важное противоэпидемическое мероприятие, которое обеспечивает:

* правильное и своевременное проведение этиотропной терапии, а, следовательно, снижение инвалидизации и летальности;
* адекватное использование вакцинных препаратов в соответствии с антигенными особенностями возбудителя;
* оценку значимости той или иной бактериальной флоры в этиологии бактериальных менингитов за конкретный период времени и решение вопроса поиска путей и перспектив борьбы с определенной формой менингита.

В этой связи является очевидным, что только рационально организованная, комплексная, современная лабораторная диагностика бактериальных менингитов любой этиологии позволит достоверно контролировать состояние этой инфекционной патологии и значительным образом снижать трагическое влияние бактериальных менингитов на популяцию людей.

# **Список использованных источников**

1. Практическое руководство по антимикробной химиотерапии./ Под ред. Страчунского Л.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н. - М., Изд-во "Боргес". - 2002. - 384с.
2. Яковлев С.В. Бактериальные менингиты в отделении интенсивной терапии. - 2001. - Т. 3.,- №11.
3. Королева И.С. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты. МИА – Москва, 2007. Стр: 112.
4. Покровский В.И. Генодиагностика бактериальных менингитов и генотипирование их возбудителей. 2001г.
5. Методические указания МУК 4.2.1887-04 "Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов";
6. Приказ № 375 О мерах по усилению эпидемиологического надзора и профилактики менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов от 23 декабря 1998 г.