

**ПРИКАЗ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ПРИДНЕСТРОВСКОЙ МОЛДАВСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

О введении в действие Методических указаний МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24 «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов»

В соответствии с Законом Приднестровской Молдавской Республики от 3 июня 2008 года № 481-З-IV «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (САЗ 08-22), Постановлением Правительства Приднестровской Молдавской Республики от 6 апреля 2017 года № 60 «Об утверждении Положения, структуры и предельной штатной численности Министерства здравоохранения Приднестровской Молдавской Республики» (САЗ 17-15) с изменениями и дополнениями, внесенными постановлениями Правительства Приднестровской Молдавской Республики от 14 июня 2017 года № 148 (САЗ 17-25), от 7 декабря 2017 года № 334 (САЗ 17-50), от 17 октября 2018 года № 352 (САЗ 18-42), от 14 декабря 2018 года № 448 (САЗ 18-51), от 26 апреля 2019 года № 143 (САЗ 19-17), от 8 августа 2019 года № 291 (САЗ 19-30), от 15 ноября 2019 года № 400 (САЗ 19-44), от 29 сентября 2020 года № 330 (САЗ 20-40), от 22 октября 2020 года № 364 (САЗ 20-43), от 8 декабря 2020 года № 433 (САЗ 20-50), от 25 января 2021 года № 19 (САЗ 21-4), от 30 декабря 2021 года № 426 (САЗ 21-52), от 20 января 2022 года № 11 (САЗ 22-2), от 28 октября 2022 года № 402 (САЗ 22-43), от 9 ноября 2022 года № 411 (САЗ 22-44), от 23 декабря 2022 года № 485 (САЗ 23-1), от 19 января 2023 года № 15 (САЗ 23-3), от 16 февраля 2023 года № 55 (САЗ 23-7), от 31 мая 2023 года № 186 (САЗ 23-22), от 13 октября 2023 года № 341 (САЗ 23-41), от 18 декабря 2023 года № 425 (САЗ 23-51), от 22 января 2024 года № 31 (САЗ 24-5), в целях дальнейшего совершенствования санитарно-противоэпидемического обеспечения населения Приднестровской Молдавской Республики, приказываю:

1. Ввести в действие на территории Приднестровской Молдавской Республики Методические указания МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24 «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов» согласно Приложению к настоящему Приказу.

2. Контроль за исполнением настоящего Приказа возложить на главного государственного санитарного врача Приднестровской Молдавской Республики.

3. Настоящий Приказ направить на официальное опубликование в Министерство юстиции Приднестровской Молдавской Республики.

4. Настоящий Приказ вступает в силу со дня, следующего за днем его официального опубликования.

Министр

К. АЛБУЛ

г. Тирасполь
10 мая 2024 г.
№ 366

Приложение к Приказу
Министерства здравоохранения
Приднестровской Молдавской Республики
от 10 мая 2024 года № 366

«Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов»

Раздел 1. Общие положения

Глава 1. Область применения

1. В настоящих Методических указаниях изложены организационные и методологические принципы лабораторной диагностики менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов.

2. Настоящие Методические указания предназначены для специалистов бактериологических лабораторий учреждений Государственной санитарно-эпидемиологической службы Приднестровской Молдавской Республики и других бактериологических лабораторий.

Глава 2. Основные принципы лабораторной диагностики менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов

3. Основные принципы лабораторной службы по этиологической расшифровке гнойных бактериальных менингитов (далее - ГБМ) и подтверждению клинического диагноза базируются на особенностях самого заболевания:

а) тяжелейший симптомокомплекс клинических проявлений в первые дни болезни указывает на необходимость экстренного незамедлительного проведения исследований по определению этиологии заболевания с обязательным использованием методов экспресс-диагностики;

б) ответ должен быть не только быстрым, но и безошибочно точным. Это чрезвычайно актуально для ГБМ, так как заболевания полиэтиологичны по своей природе. Данное обстоятельство необходимо учитывать при организации работы лабораторий по этиологической расшифровке заболеваний. Показано, что практически любой микроорганизм может быть причиной бактериального менингита, но основных возбудителей три. Это менингококки, пневмококки и гемофильные палочки типа «b», отвечающие за 85% - 90% от общего числа расшифрованных случаев. На выявление этих основных возбудителей и должны быть направлены все силы и средства лабораторий, занимающихся исследованием материала от больных с подозрением на бактериальный менингит;

в) учитывая то, что очагом воспаления являются мягкие мозговые оболочки головного мозга и спинной мозг, основным материалом для исследования является спинномозговая жидкость (далее - СМЖ). Кроме того, из-за возникающей генерализации процесса обязательным объектом исследования является и кровь.

4. Исследование носоглотки для подтверждения клинического диагноза «Генерализованные формы менингококковой инфекции» (далее - ГФМИ) представляется нецелесообразным и, если исследование все же проводят и при этом из носоглотки выделяют менингококки, то расценивать данный факт необходимо как выявление локализованных форм – назофарингита (если есть клинические признаки воспаления в носоглотке) или носительства (если нет клинических признаков локализованного воспаления).

5. Теоретическое обоснование подходов к лабораторной диагностике бактериальных менингитов (в том числе и ГФМИ) следует сочетать с адекватной практической составляющей. Основой рутинного алгоритма ежедневной работы являются специальные требования к объему патологического материала, подлежащего исследованию, и комплексное методологическое оснащение исследований.

Глава 3. Отбор материала для исследования

6. Основным биологическим материалом для исследования при бактериальных менингитах служат СМЖ и кровь.

7. Для бактериологического подтверждения менингококкового назофарингита и выявления назофарингеального менингококкового носительства исследуют носоглоточную слизь:

а) СМЖ отбирают у больного при пункции в объеме 2,0-5,0 мл на этапе поступления в стационар до начала антибиотикотерапии с соблюдением правил асептики. Ликвор после пункции распределяют для исследования следующим образом:

1) 1,0 мл направляют в клиническую лабораторию для проведения общего ликворологического и цитологического исследования;

2) 0,2 мл направляют для постановки полимеразной цепной реакции, которую выполняют в лабораториях, специально оснащенных всем необходимым для проведения такого рода исследований и имеющих разрешение на данный вид деятельности в установленном порядке;

3) 1,0 мл направляют для первичного бактериологического посева (если не сделан в отделении при пункции), бактериоскопии и серологических исследований;

4) 0,5 мл засевают в чашку с «шоколадным» агаром непосредственно у постели больного. Далее чашку хранят в условиях термостата при температуре 37 °С до доставки в лабораторию. Применение данной методики позволяет получить культуру возбудителя бактериального менингита на 18-24 часа раньше, чем по стандартной схеме посева материала в лаборатории и, тем самым ускорить проведение исследования и выдачу ответа;

5) 0,5 мл ликвора засевают в среду обогащения (в 5,0 мл 0,1 % полужидкого сывороточного агара) непосредственно у постели больного и далее хранят при температуре 37 °С в условиях термостата до доставки в лабораторию;

б) кровь отбирают из вены при поступлении больного в стационар с соблюдением правил асептики и до начала антибиотикотерапии. Образцы распределяют следующим образом:

1) для бактериологического посева на гемокультуру отбирают – 5,0-10,0 мл крови у взрослых; 2,0-5,0 мл – у детей и 1,0-2,0 мл – у новорожденных и детей неонатального периода;

2) 3,0-5,0 мл крови используют для серологических исследований с целью выявления специфических антигенов (встречный иммуноэлектрофорез (далее – ВИЭФ)) и специфических антител (реакция непрямой гемагглютинации (далее – РНГА)). Для получения достоверных результатов о нарастании титров антител в реакции РНГА важно исследовать парные сыворотки, то есть сыворотки крови, взятые в первые дни болезни при поступлении больного в стационар и затем на 10-12-й день заболевания;

3) несколько капель крови наносят на предметное стекло для приготовления препарата «толстой капли» крови;

в) назофарингеальную слизь с задней стенки глотки берут натошак или через 3-4 часа после еды стерильным ватным тампоном. Материал берут с обязательным надавливанием шпателем на корень языка для наиболее полного открытия глоточного отверстия. Тампон вводят ватным концом сверху за мягкое небо в носоглотку и проводят 2-3 раза по задней стенке. При извлечении из носоглотки тампон не должен касаться окружающих тканей (зубы, слизистая щек, язык, небный язычок). После извлечения из носоглотки содержащаяся на тампоне слизь засевают на чашки (сывороточный агар с линкомицином) или помещают в транспортную среду для немедленной доставки в лабораторию.

8. Материал для бактериологических и серологических исследований доставляют в бактериологическую лабораторию немедленно после отбора в специальных контейнерах, способных поддерживать температуру 37 °С.

9. При невозможности быстрой доставки материала из отделения в лабораторию (ночное время, выходные и праздничные дни и другие) материал хранят следующим образом:

а) посевы ликвора на первичной чашке с «шоколадным» агаром и в 0,1 %-м полужидком питательном агаре, а также посев крови на гемокультуру хранят в условиях термостата при температуре 37 °С;

б) нативный ликвор и кровь для серологических исследований хранят в условиях холодильника при температуре 4 °С. В лаборатории нативный ликвор используют только для бактериоскопии и постановки серологических реакций (латекс-агглютинация, ВИЭФ и другие). Для бактериологического посева хранившийся в холодильнике нативный ликвор не используют.

Раздел 2. Метод исследования

Глава 5. Бактериоскопия

10. Мазок нативного ликвора: на предметное стекло наносят каплю ликвора из осажденного после центрифугирования слоя и высушивают при комнатной температуре или в условиях термостата при по проекту строительства, реконструкции объектов при температуре 37 °С. Далее на препарат наносят краситель (водно-спиртовой раствор метиленовой сини) и после 2-минутной экспозиции проводят тщательное, но осторожное промывание водопроводной водой. Препарат подсушивают и микроскопируют под иммерсией при большом увеличении, просматривая не менее 20 полей зрения или до обнаружения морфологически четких микробных клеток.

11. Культуральный мазок по Граму в модификации Калины: на обезжиренное стекло наносят каплю стерильного физиологического раствора. В нем суспензируют культуру и туда же петлей вносят каплю спиртового раствора бриллиантовой зелени. После подсыхания препарат фиксируют над пламенем. Затем на препарат наливают основной краситель. Время экспозиции 1,5-2,0 минут. После этого краску сливают и стекло в наклонном положении промывают водой. Далее препарат в наклонном положении отмывают спиртом до отхождения облачков краски и немедленно промывают водой. Затем производят докрасивание препарата водным раствором фуксина в течение 2 минут, после этого окончательно промывают водой и просушивают. Культуральный мазок просматривают под иммерсией при большом увеличении: граммотрицательные бактерии выглядят ярко-розовыми, грамположительные – сине-черными.

12. Мазок препарата «толстая капля» крови: на середину предметного стекла наносят каплю крови и распределяют с помощью чистого стерильного аппликатора так, чтобы диаметр мазка соответствовал величине пятикопеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Данный фрагмент исследования выполняют непосредственно у постели больного при его поступлении в стационар. Далее препарат доставляют в бактериологическую лабораторию. Окраску мазка производят водно-спиртовым раствором метиленовой сини в течение 2-3 минут, без предварительной фиксации. После окрашивания препарат осторожно промывают водой и подсушивают на воздухе. Препарат смотрят под иммерсией при большом увеличении, просматривая не менее 20 полей зрения или до обнаружения морфологически четких микробных клеток в соответствии с Приложением № 1 к настоящим Методическим указаниям.

Глава 6. Бактериологический посев

13. При отборе и посеве исследуемого материала следует соблюдать следующие требования:

а) исключить случайную контаминацию материала посторонней микрофлорой. Соблюдение указанного требования обеспечивают правильным забором материала, точным доступом к очагу инфекции, соблюдением асептики;

б) не допустить гибели возбудителя с момента взятия материала для анализа и до начала работы с ним в лаборатории. Соблюдение указанного требования обеспечивают доставкой образцов или посевов в лабораторию незамедлительно в теплом виде или временным сохранением до доставки в условиях термостата при температуре 37 °С в течение не более, чем 12 часов.

14. Виды бактериологического посева:

а) бактериологический посев СМЖ;

б) бактериологический посев крови;

в) бактериологический посев носоглоточной слизи.

15. Первичный бактериологический посев СМЖ на чашку с «шоколадным» агаром выполняют непосредственно «у постели больного» в стационаре после проведения пункции. Чашки с питательной средой, так же, как и все необходимые для забора патологического материала принадлежности (пустые стерильные пробирки, пробирки с 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром, стерильные предметные стекла для приготовления препарата «толстая капля» крови, флаконы с питательными средами для посева крови) в достаточном количестве хранят в профильном отделении стационара или их немедленно (при необходимости) доставляют из бактериологической лаборатории. Допустимым условием хранения емкостей с питательными средами является температура бытового холодильника (при температуре 4 °С). Срок хранения – не более 7 дней. Перед пункцией емкости с питательными средами достают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 10 минут.

Техника бактериологического посева СМЖ:

а) после проведения пункции непосредственно из пункционной иглы выполняют посев СМЖ на чашку с «шоколадным» агаром. Чашку осторожно открывают и на поверхность среды закапывают несколько капель ликвора (3-4 капли). Далее чашку закрывают, ставят на ровную поверхность и с помощью нескольких круговых движений чашки по поверхности стола капли ликвора распределяют по поверхности агара. После того как СМЖ впитается (обычно 2-3 минуты), необходимо зафиксировать дно и крышку чашки (например, пластырем) для того, чтобы не возникло ее случайного открытия;

б) бактериологический посев СМЖ в пробирку с 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром проводят сразу после пункции. Для этого непосредственно из пункционной иглы 0,5 мл СМЖ вносят в пробирку с 4,5 мл 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром. Следует указать на то, что если непосредственно у постели больного сделан посев СМЖ по вышеизложенному способу, то этап посева нативной СМЖ в лаборатории следует исключить, при этом доставленную в лабораторию стерильную СМЖ исследуют только бактериоскопическими и серологическими методами;

в) емкости с посевами до доставки в лабораторию хранят в условиях термостата при температуре 37 °С или немедленно доставляют в бактериологическую лабораторию. В бактериологической лаборатории посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 24-48 часов в атмосфере, содержащей 5-10 % CO₂ (эксикатор со свечой, CO₂-инкубатор);

г) при наличии роста на плотных питательных средах проводят визуальную оценку выросших колоний, готовят мазок по Граму, определяют оксидазу, каталазу и в зависимости от полученного результата проводят дальнейшую идентификацию возбудителя и определение чувствительности к антибиотикам. При наличии признаков роста в 0,1 %-м полужидком сывороточном агаре проводят высев на чашки с «шоколадным» агаром. Культивацию посевов и дальнейший ход исследований проводят так же, как описано в подпунктах а) - в) части второй настоящего пункта.

16. Бактериологический посев крови выполняют во флаконы с «двухфазной» питательной средой в соотношении крови к жидкой фазе 1:10 для уменьшения бактерицидного эффекта человеческой сыворотки. «Двухфазная» питательная среда содержит X, V факторы роста и витамины. На ней хорошо растут менингококки, пневмококки, гемофильные палочки и другие менее требовательные к составу питательной среды микроорганизмы.

Представляется перспективным использование готовых «двухфазных» сред для посева крови. Эти среды сбалансированы по питательным свойствам, обогащены различными ростовыми добавками, содержат вещества, инактивирующие действие сыворотки крови и антибиотиков, имеют оптимальный газовый состав.

Засеянную в отделении кровь доставляют в лабораторию и инкубируют в течение 5 (пяти) суток при температуре 37 °С. Посевы ежедневно просматривают на наличие микробного роста. Признаками микробного роста на «двухфазной» среде служат помутнение жидкой среды, наличие хлопьевидного осадка, газообразование, образование пленки. Часто изменения «жидкой» фазы среды сопровождаются ростом колоний на «плотной» фазе среды.

В связи с тем, что рост некоторых микробов не приводит к визуально заметным изменениям прозрачности и цвета жидкой фазы питательной среды рекомендуется выполнить посев на «шоколадный» агар через 48 часов инкубации, даже несмотря на отсутствие признаков микробного роста во флаконе. При отрицательном результате посева следует продолжить инкубирование флакона.

В случае обнаружения роста микроорганизмов в «двухфазной» питательной среде, флакон вскрывают и из бульона или выросших на твердой фазе колоний готовят мазок, окрашенный по Граму. По результатам микроскопии выполняют высев на чашки с «шоколадным» агаром для выделения менингококков, пневмококков и гемофильных палочек типа «b». В других случаях, в соответствии с данными бактериоскопического исследования, к указанному набору сред добавляют любые адекватные питательные среды (желточно-солевой агар, среда Эндо, среда Сабуро и другие) для выделения и идентификации «прочих» возбудителей ГБМ.

После получения роста микроорганизмов на плотных средах из выросших колоний готовят мазок по Граму, определяют оксидазу, каталазу и проводят дальнейшую биохимическую, серологическую идентификацию, определяют чувствительность к антибиотикам.

17. Бактериологический посев носоглоточной слизи выполняют немедленно после забора материала или после доставки материала в лабораторию на чашки с сывороточным агаром и на чашки с селективным сывороточным агаром (в качестве селективной добавки используют линкомицин). Материал засевают путем втирания тампона на четверть чашки. Оставшуюся часть агара на чашке засевают штриховым методом с помощью стерильной бактериологической петли. Засеянные чашки инкубируют в условиях термостата при температуре 37 °С в течение 24 часов. При обнаружении колоний, визуально сходных с ростом менингококков, выполняют отсев на чашки с сывороточным агаром. После культивирования посевов в условиях термостата при температуре 37 °С из выросших колоний готовят мазок по Граму в модификации Калины, определяют оксидазу, каталазу и проводят дальнейшую идентификацию в соответствии с Приложением № 2 к настоящему Методическим указаниям.

Глава 7. Реакция латекс-агглютинации (экспресс-метод)

18. Наиболее простым методом, не требующим сложного оборудования и дорогостоящих реактивов, является метод латекс-агглютинации, позволяющий в течение 15 минут дать заключение об отсутствии или наличии в СМЖ большого специфических антигенов. Реакцию проводят при наличии признаков гнойного воспаления в ликворе и (или) при бактериоскопическом обнаружении в нем возбудителей.

19. Предварительно СМЖ необходимо прогреть в течение 5 (пяти) минут при температуре 100 °С и отцентрифугировать при 1 500-2 000 об./мин. Для проведения реакции используют прозрачную надосадочную жидкость. Одну каплю каждого латексного реактива (предварительно реактивы рекомендуется тщательно встряхнуть) наносят на специальные бумажные карты, приложенные к набору. Затем добавляют 30 мкл СМЖ (надосадочная фракция) к каждой капле латексного реактива. Перемешивают чистым аппликатором. Осторожно покачивают бумажную карту. Агглютинация в течение 2 минут с одним из латекс-диагностических препаратов свидетельствует о присутствии в испытуемом образце специфического антигена. Для выполнения реакции используют наборы латекс-диагностических препаратов.

Глава 8. Встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ – экспресс-метод)

20. Реакция позволяет с помощью специфических антисывороток выявлять полисахаридный антиген возбудителя в СМЖ и сыворотке крови больного уже в первый день исследования материала. Для проведения реакции необходимы: проба СМЖ (осадок, если ликвор мутный) и (или) сыворотка крови, преципитирующие антисыворотки, веронал-мединаловый буфер, 1 %-й агар на веронал-мединаловом буфере, любой аппарат для иммуноэлектрофореза, стеклянные пластины размером 9 X 12 см, трафареты, пробойники для агара, отсасывающие агар устройства, пастеровские пипетки или дозаторы с наконечниками, фильтровальная бумага, предметный столик или другой объект с идеально ровной поверхностью.

21. В аппарат для иммуноэлектрофореза заливают веронал-мединаловый буфер, содержащий в 1 л дистиллированной воды 21,9 г мединала и 3,35 г веронала (веронал предварительно нагревают на водяной бане в небольшом количестве дистиллированной воды до полного растворения). Измеряют рН и доводят его до уровня 8,6. Далее на веронал-мединаловом буфере (предварительно развести дистиллированной водой в 4 раза) готовят 1 %-й агар. На 100 мл буфера добавляют 1 г агара, нагревают на водяной бане до полного растворения и в горячем, но несколько охлажденном виде (при температуре 60-70 °С) в количестве 20 мл наносят на стеклянные пластины размером 9 X 12 см. Пластины предварительно помещают на ровную горизонтальную поверхность. После застывания агара специальным пробойником или металлической трубкой с диаметром 3 мм высекают два параллельных ряда отверстий по длине стекла на расстоянии 3 мм друг от друга.

22. Специфические антисыворотки вносят в лунки агара со стороны анода (+), а испытуемую пробу СМЖ и (или) сыворотку крови – со стороны катода (-). В отдельные лунки помещают положительный контроль. В качестве положительного контроля используют антигенный препарат (полисахарид) и гомологичную антисыворотку. Подготовленную пластину помещают в аппарат для иммуноэлектрофореза, соединяют стекло и буфер с помощью фильтровальной бумаги и включают аппарат в сеть. Время экспозиции 20-30 минут при силе тока 12 мА. Результат учитывают через 10 минут после выключения аппарата. Реакцию считают положительной, если между лунками проявляются четкие линии преципитации, которые хорошо видны в проходящем свете. Рекомендуется проведение повторного и окончательного учета результатов реакции через 24 часа, при этом стекла хранят во влажной камере или в эксикаторе с влажной атмосферой.

Глава 9. Реакция непрямой гемагглютинации

23. Исследование сыворотки больного в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (далее – РНГА) является вспомогательным методом диагностики менингококковой инфекции и позволяет существенно увеличить процент лабораторного подтверждения генерализованных форм менингококковой инфекции. Для получения достоверного результата обязательным условием является исследование сывороток крови

больного в динамике, то есть взятых в разные сроки заболевания (на 1-й и 10-12-й дни болезни).

24. РНГА можно выполнять как макро- так микрометодом с соблюдением соотношения ингредиентов.

25. Одной из модификаций микрометода является постановка РНГА в полистироловых пластинах с объемом лунок не менее 300 мкл с использованием автоматических дозаторов на 50 и 100 мкл.

Необходимые реагенты: диагностикумы эритроцитарные менингококковые полисахаридные серогрупп А и С; исследуемая сыворотка, разведенная 1:5; забуференный физиологический раствор (далее - ЗФР).

Приготовление ЗФР: в 0,5 л дистиллированной воды растворяют NaCl – 8,65 г, Na₂HPO₄ · 12H₂O – 1,92 г, KH₂PO₄ – 0,44 г. Объем раствора доводят до 1 л дистиллированной водой и проверяют pH раствора, который должен быть равен 7,2.

Ход исследования: два ряда полистироловой пластины (для выявления антител к менингококкам серогрупп А и С) заполняют по 100 мкл ЗФР, затем проводят двукратное титрование исследуемой сыворотки с разведения 1:5. В каждый ряд добавляют по 50 мкл соответствующего диагностикума. Пластины встряхивают и помещают в термостат на 2,0-2,5 часа при температуре 37 °С, после чего учитывают результаты. Обязательными контролями служит отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума и исследуемой сыворотки. Для этого к 100 мкл диагностикума добавляют 50 мкл ЗФР, а к 100 мкл сыворотки – 50 мкл 1 %-х эритроцитов барана. Учет результатов РНГА проводят по четырехкестной системе. Четырехкратное и более нарастание титра специфических антител в процессе болезни служит подтверждением диагноза.

Раздел 3. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов

Глава 10. Общие положения

26. Специфические клинические проявления генерализованных форм менингококковой инфекции и гнойного бактериального менингита являются обоснованием для проведения соответствующего обследования больного при поступлении его в стационар. Приоритетным при этих заболеваниях является комплексное исследование СМЖ и крови.

27. Общая схема проведения исследования ликвора представлена в Приложении № 2 к настоящему Методическим указаниям.

Глава 11. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции

28. Возбудителем менингококковой инфекции является менингококк (*Neisseriameningitidis*), который относят к роду нейссерий, включенному (согласно «Определителю бактерий Берджи») в состав 4-й группы микроорганизмов, озаглавленной как «Грамотрицательные, аэробные/ микроаэрофильные палочки и кокки». 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 СМЖ менингококки часто располагаются внутривейноцитарно и имеют форму кофейного зерна.

29. 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 А1 – протеаза), которые играют ведущую роль в формировании вирулентных свойств менингококков.

30. Менингококки - неподвижны, спор не образуют, жгутиков не имеют, являются строгими аэробами, чрезвычайно чувствительны к воздействию внешней среды. Температурный оптимум жизнедеятельности – 37 °С в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (5-10 %) и повышенной влажности. Менингококки нуждаются в средах, содержащих нативные белки или кровь животного происхождения. 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, Х, 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.

Существующие 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.

31. Лабораторную диагностику генерализованных форм менингококковой инфекции проводят в соответствии с общей схемой исследования материала при гнойных бактериальных менингитах. Лабораторное подтверждение ГФМИ и выявление менингококков выполняют по следующим тестам:

- а) обнаружение в нативном материале диплококков с характерными морфологическими признаками;
- б) характерный рост только на высокопитательных средах;
- в) типичная морфология культурального мазка по Граму;
- г) сахаролитическая активность в отношении глюкозы и мальтозы;
- д) выявление группоспецифических свойств;
- е) обнаружение специфических антигенов в ликворе и (или) сыворотке крови в реакциях латекс-агглютинации и ВИЭФ (экспресс-методы);
- ж) детекция специфических антител в сыворотке крови в реакции РНГА.

32. При бактериоскопии нативного ликвора или препарата крови «толстая капля» (окраска водно-спиртовым раствором метиленовой сини) на голубом фоне обнаруживают морфологически четкие окрашенные в темно-синий цвет кокки, диплококки, напоминающие кофейные зерна или семена бобов, прилегающие друг к другу вогнутыми сторонами, иногда выявляют капсулу. Микробные клетки могут располагаться как вне-, так и внутрилейкоцитарно. Интенсивность обсеменения СМЖ микробными клетками колеблется в значительных пределах и зависит от стадии развития инфекционного процесса в момент взятия материала. Если осуществлялось лечение антибиотиками, типичная морфология микробных клеток теряется.

33. При посеве на питательные среды и дальнейшей инкубацией в течение 24 часов при температуре 37 °С в атмосфере с 5-10 % CO₂ и повышенной влажностью проявляются следующие тинкториальные свойства:

а) на полужидкой питательной среде (0,1 %-й полужидкий сывороточный агар) менингококки вызывают интенсивное помутнение в верхней части столбика среды;

б) на «двухфазной» питательной среде при посеве крови отмечают помутнение жидкой фазы и рост полупрозрачных сероватых колоний на границе плотной и жидкой фаз;

в) на чашках с «шоколадным» агаром менингококки растут в виде нежных полупрозрачных сероватых колоний с идеально ровными краями, с блестящей поверхностью, размером 1-2 мм. Имеют маслянистую консистенцию, не меняют цвета среды, не имеют запаха. С увеличением времени культивирования тинкториальные свойства меняются;

г) на чашках с сывороточным агаром менингококки растут в виде полупрозрачных, нежных голубоватых колоний с ровными краями и гладкой блестящей поверхностью;

д) на чашках без добавления нативных сыворотки и крови животного происхождения, так же на чашках с добавлением желчи менингококки не растут.

34. При определении сахаролитической активности проводят учет результатов посева чистой культуры на плотные питательные среды с углеводами. Метод дает возможность дифференцировать различные виды нейссерий и некоторые другие виды микроорганизмов в соответствии с приложениями № 3 и № 4 к настоящим Методическим указаниям.

Менингококки ферментируют глюкозу и мальтозу с образованием кислоты. Иногда наблюдают вариабельность сахаролитической активности у различных штаммов одного и того же вида. Для уточнения биохимических свойств менингококков используют тест-системы. Тест-системы позволяют провести расширенное изучение ферментативной и метаболической активности менингококков (по 13 (тринадцати) параметрам и более) и в течение 2 (двух) часов определить видовую принадлежность возбудителя.

Определение серогруппы у менингококков проводят в реакции агглютинации на стекле с набором агглютинирующих серогрупповых антисывороток (серогруппы А, В, С, X, Y, Z, W-135, 29E). Реакцию проводят только с чистой культурой менингококков, с успехом прошедшей все этапы идентификации. Менингококки серогрупп А, В и С наиболее часто являются причиной возникновения генерализованных форм менингококковой инфекции. Поэтому в первую очередь с антисыворотками к менингококкам этих серогрупп выполняют реакцию агглютинации. На предметное стекло, разделенное маркером на три части, наносят физиологический раствор (по капле на каждую часть). Далее стерильной петлей, деревянной палочкой или любым другим аппликатором с поверхности агаровой среды снимают культуру менингококков и тщательно растворяют в каплях физиологического раствора на стекле. После этого, если не выявлено спонтанной агглютинации с физиологическим раствором, в 3 (три) подготовленные части добавляют антисыворотки А, В и С (по капле) и перемешивают. Учет реакции проводят через 1-2 минут. Образование крупных хлопьев на фоне полного просветления агглютинационного поля указывает на положительную реакцию специфического взаимодействия антигена и антитела и позволяет определить серогруппу менингококков. Отсутствие реакции с одной из основных серогрупповых антисывороток, указывает на необходимость продолжения проведения аналогичных исследований с другими специфическими антисыворотками (X, Y, Z, W-135, 29E). Только в том случае, если подтвержденный всеми тестами штамм менингококка не показал положительного результата в реакции агглютинации с полным набором агглютинирующих антисывороток, его следует отнести к категории неагглютинирующегося штамма (НА).

35. Реакцию латекс-агглютинации с нативным ликвором (экспресс-метод) проводят при наличии в нем признаков гнойного воспаления и (или) при бактериоскопическом обнаружении возбудителей. Использование реакции позволяет в кратчайшие сроки (15-20 минут) выявить специфические антигены менингококков самых распространенных серогрупп (А, В, С, Y, W-135). Реакцию выполняют с помощью наборов, согласно инструкции по применению. Реакция встречного иммуноэлектрофореза (экспресс-метод) позволяет с помощью специфических антисывороток (преципитирующих) к различным

серогруппам менингококков в течение 30 минут выявлять полисахаридный антиген возбудителя в СМЖ и сыворотках крови, взятых у больных в первый день поступления в стационар.

36. Реакция непрямой гемагглютинации с «парными» сыворотками крови выявляет динамику нарастания титров специфических антител к менингококку и позволяет определить принадлежность возбудителя к наиболее распространенным серогруппам менингококков (А и С). Использование метода дает возможность провести ретроспективную лабораторную диагностику генерализованных форм менингококковой инфекции, так как окончательный ответ получают только через 12-14 дней после начала заболевания. Преимущественными возможностями метода является лабораторное подтверждение менингококцемии, при которой использование других методов лабораторной диагностики, как правило, малоэффективно. Характеристика эритроцитарных менингококковых диагностикумов, условия их хранения и техника постановки реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации изложены в инструкциях по применению препаратов.

37. Подробная схема проведения лабораторной диагностики менингококковых назофарингитов и бактерионосительства представлена в Приложении № 2 к настоящим Методическим указаниям. Окончательным этапом является серогруппирование менингококков и определение чувствительности к антибактериальным препаратам.

38. Менингококки остаются высокочувствительными к пенициллину, который является основным лекарственным препаратом при лечении больных генерализованными формами менингококковой инфекции. Несмотря на то, что в зарубежной печати появляются сообщения об обнаружении менингококков со сниженной чувствительностью к пенициллину, длительные динамические наблюдения за российскими штаммами менингококков не выявили резистентных и умеренно резистентных штаммов. Современная тактика проведения исследований по определению чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам предусматривает применение только тех методов, которые позволяют определять минимальную подавляющую концентрацию (далее - МПК) антибактериального препарата, при этом рекомендуется использовать методы серийных разведений в агаре или в бульоне и метод Е-тестов. Дискодиффузионный метод не используется для достоверного определения чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам из-за трудностей по интерпретации результатов. Наиболее широкое распространение в современных условиях получил количественный метод Е-тестов.

Для выполнения процедуры требуются: чашки с питательной средой Мюллер-Хинтон с 5 % крови барана, бактериальная суспензия менингококков, мутностью 0,5 по стандарту МакФарланд, стрипы Е-тестов бензилпенициллина, цефотаксима, цефтриаксона, хлорамфеникола, доксицилина, рифампицина и триметоприма. Бактериальную суспензию менингококков, мутностью 0,5 по стандарту МакФарланд, засевают на чашки с использованием ватного тампона. Тампон смачивают в суспензии, несколько отжимают о стенки пробирки и далее проводят посев путем тщательного втирания содержащейся в тампоне бактериальной массы в поверхность питательной среды. Е-тесты осторожно накладывают на поверхность чашки. Количество стрип на одной чашке определяют ее диаметром. На обычной чашке диаметром 90 мм можно наложить только 2 (два) стрипа, поэтому целесообразнее пользоваться чашками Петри большего диаметра (150 мм), применение которых позволяет наложить 5 (пять) стрипов. Чашки инкубируют при температуре 37 °С с 5 % CO₂ в течение 24 (двадцати четырех) часов и затем проводят учет результатов. Учитывая то, что стрипы Е-тестов содержат на своей поверхности различные концентрации антибактериального препарата, возможно определение той минимальной подавляющей концентрации (мкг/мл), которая еще лизирует бактериальную субстанцию. Оценку результатов проводят в соответствии с Приложением № 5 к настоящим Методическим указаниям.

39. Возбудителем пневмококковых менингитов является *Streptococcus pneumoniae* или пневмококк, который (согласно «Определителю бактерий Берджи») входит в состав рода *Streptococcus* (группа стрептококков ротовой полости), включенного в 17-ю группу «Грамположительные кокки» в соответствии с Приложением № 6 к настоящим Методическим указаниям.

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 % CO₂). 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 альфа-гемолиза (по классификации Браун) серовато-зеленого цвета, вследствие разрушения эритроцитов и превращения гемоглобина в метгемоглобин. Колонии склонны к аутолизу, что связано с активностью внутриклеточных ферментов.

40. 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 другие

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

По капсульному антигену также проводят типоспецифическую дифференцировку 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.

41. Лабораторную диагностику пневмококковых менингитов проводят согласно общей схеме исследования материала при бактериальных менингитах. Идентификацию пневмококков выполняют по следующим тестам:

- а) обнаружение в нативном материале (ликвор и (или) кровь) диплококков, окруженных капсулой;
- б) рост на средах, содержащих кровь с образованием альфа-гемолиза;
- в) характерная морфология культурального мазка по Граму;
- г) положительная проба с оптохином;
- д) чувствительность к желчным кислотам;
- е) выявление специфического антигена в реакции латекс-агглютинации (экспресс-метод).

42. При бактериоскопии нативного ликвора или препарата крови «толстая капля» (окраска водно-спиртовым раствором метиленовой сини) обнаруживают овальные или ланцетовидные диплококки, окруженные капсулой, которые могут образовывать короткие цепочки. Капсула хорошо заметна на окрашенном фоне, выделяясь более светлым цветом. У больных, получавших антибиотики, типичная морфология пневмококка теряется, капсула истончается и малозаметна. В начальной стадии пневмококкового менингита в

ликворе можно наблюдать значительное количество микробных клеток при небольшом количестве клеточных элементов воспаления (сегментоядерные лейкоциты).

43. При посеве на питательные среды и дальнейшей инкубации в течение 24 (двадцати четырех) часов при температуре 37 °С в атмосфере 5-10 % CO₂ с повышенной влажностью выявляют следующие тинкториальные свойства:

а) на жидких и полужидких питательных средах (0,1 %-й сывороточный агар) пневмококки растут в верхней части столбика среды с постепенным диффузным помутнением всего объема. При длительной инкубации выпадает хлопьевидный осадок;

б) на «двухфазной» питательной среде отмечают помутнение жидкой среды и рост мелких прозрачных колоний на границе «жидкой» и «плотной» фазы;

в) на плотных питательных средах пневмококки растут в виде нежных мелких прозрачных колоний. Для R-форм характерны сферические колонии с неровными краями. Иногда встречаются слизистые (M-формы) колонии, особенно у серотипов пневмококка 3, 37. Просмотр чашек ведут визуально и с помощью лупы. Сывороточный агар – мелкие (диаметром до 1 мм) прозрачные плоские колонии с центральным углублением. «Шоколадный» агар – мелкие прозрачные колонии, окруженные зоной желто-зеленого альфа-гемолиза. Кровяной агар – мелкие плоские прозрачные колонии, окруженные зеленеющей зоной альфа-гемолиза.

Биохимическая активность пневмококков во многом совпадает с активностью других зеленеющих стрептококков. Для дифференциальной диагностики следует использовать пробу с оптохином и тесты на чувствительность к желчным кислотам.

Проба с оптохином (оптохин угнетает рост пневмококков): на чашку с кровяным агаром сплошным газоном засевают исследуемую культуру. На поверхность среды помещают диск, содержащий 5 мкг оптохина. После инкубации при температуре 37 °С в течение 18-24 часов вокруг диска образуется зона ингибирования > 14 мм (диск диаметром 6 мм) или > 16 мм (диск диаметром 10 мм). Положительный контроль – контрольная культура *S. pneumoniae*, отрицательный контроль – *S. salivarius*.

44. Чувствительность к желчным кислотам (пневмококки лизируются в присутствии желчных кислот) можно определить с помощью желчного теста или дезоксихолатной пробы:

а) желчный тест: на выросшую культуру *S. pneumoniae* накладывают бумажный диск, содержащий 20 %-й раствор желчи крупного рогатого скота. Чашку инкубируют в термостате 1-2 часа при температуре 37 °С. Вокруг диска с желчью появляется зона лизиса

(1-2 мм) колоний пневмококков. Другие стрептококки к воздействию желчи устойчивы. Диски не стандартизированы по содержанию желчных кислот, поэтому к результатам теста следует относиться с осторожностью;

б) дезоксихолатная проба: используют 10 %-й раствор дезоксихолата натрия. Для этого готовят суспензию исследуемой культуры в 1-2 мл дистиллированной воды или физиологическом растворе до мутности 1 по стандарту МакФарланд. Половину суспензии переносят в пробирку, маркированную словом «тест», другую половину оставляют в пробирке, маркированной словом «контроль». В пробирку «тест» следует добавить 3-4 капли 10 %-го раствора дезоксихолата натрия, в пробирку «контроль» – 3-4 капли 0,9 %-го хлорида натрия. Пробирки встряхивают и помещают на 1-2 часа в термостат при температуре 35 °С. Просветление жидкости в пробирке «тест» по сравнению с пробиркой «контроль» свидетельствует о принадлежности культуры к *S. pneumoniae*. Положительный контроль – контрольная культура *S. pneumoniae*, отрицательный контроль – *S. salivarius*.

Пневмококки каталазоотрицательны. Разлагают до кислоты глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, не ферментируют маннит, салицин, сорбит. Ферментируют инулин.

Для биохимической идентификации пневмококков также используют тест-системы.

Реакцию латекс-агглютинации с нативным ликвором (экспресс-метод) для выявления специфических антигенов пневмококков выполняют в случае обнаружения в нем

диплококков при бактериоскопическом исследовании или гнойного ликвора с помощью диагностических наборов. Получение четкой положительной реакции с латексным диагностическим препаратом на пневмококки позволяет в течение 15-20 минут определить этиологию возбудителя.

45. Изучение чувствительности пневмококков к антибиотикам проводят методом серийных разведений в бульоне или в агаре и дискодиффузионным методом. Для метода серийных разведений в бульоне рекомендуется использовать бульон Мюллер-Хинтон с добавлением лизированной лошадиной крови. Для метода серийных разведений в агаре и дискодиффузионного метода используют агар Мюллер-Хинтон с добавлением 5 % дефибринированной крови барана.

Учитывая, что агар Мюллер-Хинтон доступен не для всех практических лабораторий, возможно использование вместо него среды агар Гивенталья-Ведьминой (далее - АГВ) с добавлением 5 % дефибринированной крови барана. Используя в качестве основы АГВ, можно определять чувствительность пневмококков к оксациллину, кларитромицину, азитромицину, клиндамицину, офлоксацину, диаметры зон подавления роста которых не отличаются от результатов, полученных на агаре Мюллер-Хинтон. Однако АГВ в качестве основы не используют для определения чувствительности пневмококков к ко-тримоксазолу из-за повышенного содержания тимина и тимидина, снижающих антимикробную активность препарата *in vitro*.

Наиболее важным является определение чувствительности *S. pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам (пенициллину, аминопенициллинам, карбапенемам, цефалоспорином), хлорамфениколу, рифампицину, которые являются препаратами выбора для лечения пневмококковых менингитов. Дополнительно изучают чувствительность к макролидам, линкозамидам, ко-тримоксазолу. Включение в исследование эритромицина и клиндамицина позволяет выявить полную или частичную перекрестную устойчивость пневмококков к макролидам, линкозамидам и стрептограммам. Устойчивость к ко-тримоксазолу часто сопровождается резистентностью к пенициллину. Критерии оценки чувствительности штаммов *S. pneumoniae* к антибактериальным препаратам отражены в Приложении № 7 к настоящим Методическим указаниям.

Изучение лекарственной чувствительности пневмококков начинают с выявления пенициллинустойчивых штаммов. Это исследование проводят дискодиффузионным методом, с помощью скрининга с диском, содержащим 1,0 мкг оксациллина. При выявлении зоны ингибиции роста штамма пневмококка вокруг диска с 1 мкг оксациллина 20 мм, этот штамм расценивают как чувствительный ко всей группе бета-лактамов антибиотиков. Если зона задержки роста < 20 мм, необходимо дальнейшее изучение штамма с определением МПК к бета-лактамам антибиотикам (пенициллину, аминопенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам) с помощью Е-тестов или методом серийных разведений в бульоне, для выявления умеренно резистентных и резистентных штаммов. В первую очередь рекомендуется определять МПК к пенициллину, амоксициллину, цефотаксиму (цефтриаксону, цефепиму), имипенему (меропенему).

Изучение чувствительности к макролидам (эритромицин), линкозамидам (клиндамицин), хлорамфениколу, рифампицину, ко-тримоксазолу проводят дискодиффузионным методом по общепринятой методике. Для этих целей возможно использование тест-систем, разрешенных к применению на территории Приднестровской Молдавской Республики.

Глава 11. Гемофильные менингиты, обусловленные *Haemophilus influenzae* типа «b»

46. Согласно «Определителю бактерий Берджи» *Haemophilus influenzae* наряду с другими многочисленными представителями (более 15 видов) относят к роду *Haemophilus*, который входит в семейство Pasteurellaceae (подгруппа 3), относящееся к 5 группе микроорганизмов, включающей все факультативно-анаэробные

грамотрицательные палочки. Из организма человека можно выделить 8 (восемь) видов гемофилов, причем только 2 из них – *Haemophilus influenzae* и *Haemophilus duckreyi* являются основными патогенами человека. *Haemophilus influenzae* – небольшие (0,3-0,4; 1,0-1,5 мкм) грамотрицательные, сферические, овальные и палочковидные клетки. Иногда образуют нити и имеют заметный полиморфизм, особенно в материале от больных, которые получали бета-лактамы антибиотики. Гемофилы неподвижны, спор не образуют, медленно окрашиваются анилиновыми красителями.

Гемофилы 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 избытке 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 сарцинами, 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, которые приведены в Приложении № 8 к настоящим Методическим указаниям.

Haemophilus influenzae нуждается как в X-, так и в V-факторах роста. Температурные границы роста гемофилов составляют 24-43 °С, оптимальная температура 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 M-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, серовато-белого цвета). Капсульные бактерии *Haemophilus influenzae* содержат капсульный полисахарид одного из 6 типов (a, b, c, 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 (далее - 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 (далее - ОДС) является необходимым условием для биотипирования Hib, которое позволяет определить биотип с I по VIII.

47. Лабораторную диагностику проводят согласно общей схеме исследования материала при бактериальных менингитах. Идентификацию менингитов, обусловленных *Haemophilus influenzae* типа «b» проводят по следующим тестам:

- а) обнаружение в нативном ликворе нежных полиморфных палочек;
- б) рост только на средах, содержащих X- и V-факторы роста («шоколадный» агар);
- в) характерная морфология культурального мазка, окрашенного по Граму;
- г) положительная сахаролитическая активность в отношении глюкозы;
- д) выявление потребности в X и V факторах роста;
- е) детекция специфических Hib-антигенов в реакции латекс-агглютинации.

48. При бактериоскопии нативного ликвора (окраска водно-спиртовым раствором метиленовой сини) обнаруживают мелкие, нежные, полиморфные палочки или коккобациллы, которые обладают капсулой разной степени выраженности и образуют короткие и длинные (нитеподобные) цепочки. В бактериоскопическом препарате палочковидные микробные клетки располагаются вне- и внутрилейкоцитарно.

При посеве на питательные среды и дальнейшей инкубации в течение 24 (двадцати четырех) часов при температуре 37 °С в атмосфере с 5-10 % CO₂ и повышенной влажностью выявляют следующие тинкториальные свойства:

а) на полужидких питательных средах (0,1 %-й сывороточный агар) роста нет, но возбудитель сохраняется в жизнеспособном состоянии до 48 (сорока восьми) часов;

б) на «двухфазной» питательной среде отмечают рост на «плотной» фазе и отсутствие видимого роста на «жидкой» фазе;

в) на «шоколадном» агаре *Haemophilus influenzae* растут в виде серых, слизистых, блестящих колоний с ровными краями, диаметр – 0,2-2,0 мм. Колонии в R-форме мелкие, зернистые, с неровным краем, серовато-белого цвета. Рост культуры часто сопровождается резким «мышинным» запахом (запах индола).

На сывороточных средах *Haemophilus influenzae* не растут.

При бактериоскопии культуры (окраска по Граму) видны грамотрицательные полиморфные палочки или коккобациллы размером от точечных до средних, обычно менее 1 мкм в ширину и различные по длине, часто просматривают капсулу, расположены беспорядочно. Иногда обнаруживают короткие и длинные (нитеподобные) цепочки.

Сахаролитическая и ферментативная активность *Haemophilus influenzae* отличается непостоянством. Из целого ряда сахаров они разлагают глюкозу до кислоты. Для уточнения биохимических свойств используют тест-системы в установленном порядке. Использование некоторых наборов позволяет проводить полное биохимическое тестирование культуры в течение 2 (двух) часов с определением биотипа возбудителя. Биотипирование позволяет определить популяционные различия штаммов и методически основано на выявлении трех продуктов метаболизма микробной клетки: уреазы, индола и орнитиндекарбоксила в соответствии с Приложением № 9 к настоящим Методическим указаниям.

Потребность в X- и V-факторах роста определяют путем посева чистой культуры на сывороточный агар, не содержащий факторы роста.

Далее на поверхность засеянной чашки накладывают диски, пропитанные X- и V-факторами роста. Расстояние между дисками 5 мм. Колонии *Haemophilus influenzae* растут только между дисками.

Реакцию латекс-агглютинации с нативным ликвором (экспресс-метод) проводят при наличии признаков гнойного воспаления и (или) при обнаружении бактериальных клеток. Применяют наборы латекс-диагностикумов, которые позволяют выявлять специфические антигены гемофильных палочек типа «b» в ликворе и /или крови. С помощью латекс-диагностического препарата проводят определение типовой принадлежности у выделенной из ликвора и крови культуры *Haemophilus influenzae*. Четкая реакция латекс-агглютинации Нib-латекс-диагностикума и тестируемой культуры *Haemophilus influenzae*, предварительно прошедшей этапы идентификации, позволяет отнести ее к *Haemophilus influenzae* типа «b».

49. Результаты определения лекарственной чувствительности *Haemophilus influenzae* используют для выбора наиболее эффективного антибактериального препарата для лечения больных и для сбора эпидемиологической информации об устойчивости к антибактериальным средствам микроорганизмов, циркулирующих в определенных регионах и представляющих угрозу для общественного здравоохранения. Контроль за лекарственной чувствительностью *Haemophilus influenzae* приобретает особую актуальность из-за возрастания потенциала резистентных к антибактериальным препаратам штаммов. Наибольшее значение имеет приобретенная резистентность к ампициллину, обусловленная продукцией плазмидных бета-лактамаз. Данное

обстоятельство указывает на ограничения при использовании бета-лактамовых антибиотиков при лечении гнойно-септических инфекций, вызванных *Haemophilus influenzae* и необходимость выбора наиболее эффективных препаратов на основании данных антибиотикограммы. Для изучения чувствительности используют диско-диффузионный метод и диффузионный количественный метод Е-тест.

Особые требования предъявляют к выбору питательной среды, и наиболее приемлемым вариантом признана питательная среда *Haemophilus Test Medium* (далее НТМ), содержащая в своем составе необходимые для гемофил факторы роста и позволяющая достоверно интерпретировать результаты.

Среду НТМ можно приготовить в лаборатории на основе бульона или агара Мюллер-Хинтон. После растворения основы в нее добавляют дрожжевой экстракт (до конечной концентрации 5 мг/мл) и раствор гематина (до конечной концентрации 15 мг/л). Для приготовления основного раствора гематина 50 мг порошка помещают в 100,0 мл 0,01 N NaOH (0,01 моль/л) и нагревают при тщательном перемешивании до полного растворения. В подготовленную для автоклавирования среду на 1 л вносят 30,0 мл основного раствора гематина. После автоклавирования и охлаждения основы до температуры 48-50 °С в нее асептически вносят раствор никотинамидадениндинуклеотид (далее НАД) до конечной концентрации 15 мг/л. Раствор НАД стерилизуют фильтрацией через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм. Следует помнить, что при определении чувствительности к сульфаниламидам и триметоприму в охлажденную до температуры 48-50 °С среду асептически вносят также раствор тимидинфосфорилазы до конечной концентрации 0,2 ед./мл.

Выполнение дискодиффузионного метода предусматривает посев чистой, свежей культуры на чашки со средой НТМ. Предварительно готовят микробную суспензию мутностью 0,5 по стандарту МакФарланд. Ватный стерильный тампон смачивают в суспензии, несколько отжимают о стенку пробирки и выполняют посев на поверхность среды путем тщательного втирания бактериальной суспензии. Далее накладывают на поверхность среды диски обычным способом, не более 5 (пяти) дисков на чашку диаметром 90 мм. Чашки инкубируют при температуре 37 °С на протяжении 24 (двадцати четырех) часов в атмосфере с 5-10 % CO₂. Затем проводят учет результатов путем замера зон задержки роста и сопоставления полученных данных с оценочной таблицей. Метод позволяет классифицировать исследованные штаммы на чувствительные, умеренно резистентные и резистентные. Рекомендуемый перечень антибактериальных препаратов для определения чувствительности *Haemophilus influenzae* приведен в Приложении № 10 к настоящим Методическим указаниям, а критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Haemophilus influenzae* приведены в Приложении № 11 к настоящим Методическим указаниям.

Глава 12. Гнойные бактериальные менингиты, обусловленные «прочими» возбудителями

50. В структуре бактериальных менингитов, вызываемых «прочими» возбудителями, можно условно выделить менингиты новорожденных, посттравматические и послеоперационные менингиты, «вторичные» менингиты и менингиты иммунокомпромированных больных.

Менингиты новорожденных преимущественно обусловлены возбудителями, входящими в род *Streptococcus* (*S. agalactiae*, *S. pyogenes* и другие), 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 другие), семейство *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*,

Proteusspp. и другие), рода *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. mallei* и другие), рода *Enterococcus* (*E. faecalis*).

Менингиты у лиц с врожденным или приобретенным нарушением функций иммунной системы (тяжелые хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, легких, почек, печени, туберкулез, онкологические заболевания, ВИЧ и так далее) в первую очередь связаны с широким спектром грамотрицательных бактерий, входящих в семейство *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Serratiaspp.*), род *Pseudomonas*, род *Acinetobacter* (*A. baumannii*), 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 так далее).

51. Так называемые «прочие» возбудители широко распространены во внешней среде и составляют основной спектр условно-патогенной микрофлоры, поэтому несоблюдение правил сбора и транспортирования материала для исследования, нарушение требований по асептике при выполнении лабораторных процедур может приводить к контаминации крови и ликвора. Для дифференциации истинной патогенетической роли микроорганизмов необходимо учитывать следующие факторы:

а) клиника бактериального менингита должна сопровождаться цитологической картиной гнойного менингита в ликворе (нейтрофильный плеоцитоз);

б) морфологические особенности выросшей культуры (окраска по Граму) должны совпадать с морфологией микробных клеток при бактериоскопии нативного ликвора и «толстой капли» крови, а также не противоречить результатам серологических исследований (латекс-агглютинация, ВИЭФ, РНГА);

в) рост из ликвора и (или) крови двух и более микробных агентов может свидетельствовать о контаминации материала;

г) культуры, выросшие из крови и ликвора, взятые от одного больного должны быть идентичны по биологическим свойствам.

52. Лабораторную диагностику «прочих» возбудителей гнойных бактериальных менингитов выполняют по общей схеме исследования материала при бактериальных менингитах. В связи с тем, что инфицирование мягких оболочек и вещества мозга преимущественно происходит гематогенным путем, особенно важное значение приобретает посев крови на гемокультуру.

При обнаружении в мазке нативного ликвора или крови дрожжеподобных грибов, кокков или палочек, имеющих своеобразную морфологию, отличающую их от основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов, дополнительно к посеву на чашки с «шоколадным» агаром необходимо произвести высев материала на соответствующие питательные среды (дрожжеподобные грибы – среда Сабуро, кокки – кровяной агар, желточно-солевой агар с маннитолом, палочки – кровяной агар, среда Эндо).

В случае выявления роста «прочих» возбудителей гнойных бактериальных менингитов на «шоколадном» агаре, проводят предварительную идентификацию изолята с помощью простых тестов в соответствии с Приложением № 12 к настоящим Методическим указаниям с дальнейшим определением вида возбудителя.

Раздел 4. Питательные среды и реактивы

Глава 13. Питательные среды

53. Сывороточный агар:

а) основой служит 1,2-1,5 %-й агар (рН 7,4), приготовленный на бульоне из рыбного гидролизата, из бульона из переваре Хоттингера (аминный азот 150-180 мг/мл) или на сухом питательном агаре специального назначения;

б) к 80,0 мл расплавленного и остуженного до температуры 50 °С агара добавляют 20,0 мл инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 минут сыворотки, консервированной хлороформом или без консерванта. После перемешивания среду разливают в чашки.

54. Сывороточная среда с линкомицином:

а) к 80,0 мл расплавленного и остуженного агара добавляют 20,0 мл сыворотки и 0,5 мл раствора линкомицина в концентрации 1 000 мкг/мл. Конечная концентрация антибиотика в среде 5 мкг/мл. Плотные среды с углеводами;

б) готовят на той же питательной основе, что и сывороточные среды;

в) к 75,0 мл агаровой основы добавляют 0,9 г одного из углеводов (глюкоза, мальтоза, сахароза, лактоза, фруктоза) и 3,9 мл раствора индикатора фенолового красного. Стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 минут или при 0,5 атмосфер в течение 30 минут;

г) индикатор феноловый красный получают, смешивая 0,4 г порошка фенол-рот с 16,0 мл 0,1 N раствора NaOH. Затем раствор доводят до объема 200 мл дистиллированной водой, разливают во флаконы и стерилизуют при 1 атмосфере в течение 20 минут.

55. Желчно-сывороточный агар:

а) растворяют в 100 мл дистиллированной воды 5 г сухой бычьей желчи, фильтруют, доводят pH до 7,2-7,4, стерилизуют текучим паром 3 дня;

б) к 80,0 мл расплавленного и охлажденного до температуры 50 °С питательного агара добавляют 4 мл стерильного раствора желчи, перемешивают, затем добавляют 20,0 мл сыворотки животных, снова перемешивают и разливают по чашкам. Конечная концентрация желчи в среде 0,2 %.

56. Полужидкий 0,1 %-й сывороточный агар: в качестве основы используют мясопептонный бульон, перевар Хоттингера, рыбный гидролизат, Мартеновский бульон и другие К 4,0 мл 0,1 %-го полужидкого питательного агара, pH 7,4, добавляют 1,0 мл предварительно инактивированной сыворотки. Пробирки ставят на сутки в термостат для контроля.

57. Кровяной агар:

а) основой агара служит колумбийский агар, агар для бруцелл, эритрит-агар, АГВ (агар Гивенталья-Ведьминой) и так далее, pH 7,2-7,4;

б) к расплавленному и охлажденному до температуры 50 °С агару добавляют 5 % дефибринированной крови барана, лошади, крупного рогатого скота;

в) тщательно перемешивают, избегая образования пузырьков и пены, и разливают в чашки Петри.

58. «Шоколадный» агар:

а) основой агара служит колумбийский агар, агар для бруцелл, эритрит-агар, АГВ (агар Гивенталья-Ведьминой) и так далее;

б) к 100 мл растопленного 2 %-го агара с 0,5 %-й глюкозой (pH 7,4) небольшими порциями прибавляют 8-10 мл дефибринированной крови лошади или человека. Агар тщательно перемешивают и подогревают на водяной бане при температуре 70-80 °С, постоянно встряхивая, пока цвет агара не станет шоколадным.

59. «Двухфазная» питательная среда:

а) «Плотная» фаза («шоколадный» агар) – готовят простой питательный агар (на основе триптического перевара Хоттингера, триптикоза-соевого и другие), разливают во флаконы по 50,0 мл, которые автоклавируют при температуре 120 °С в течение 20 минут. В горячий флакон с агаром добавляют по 3,0-5,0 мл крови, перемешивают и прогревают при 65-80 °С в течение 10 минут двукратно. Среду скашивают.

б) «Жидкую» фазу готовят из сахарного бульона на переваре Хоттингера, который в объеме 50,0 мл добавляют в каждый флакон. Для приготовления сахарного бульона требуются 200 г перевара Хоттингера, 800 мл воды, 10 г глюкозы и 5 г NaCl. Далее стерилизуют при 0,5 атмосферах в течение 30 минут, pH 7,3-7,4. Готовую «двухфазную» среду хранят при температуре 4 °С в холодильнике, перед посевом патологического материала прогревают в термостате.

Глава 14. Рецепты приготовления красок

60. Водно-спиртовой раствор метиленовой сини: готовят насыщенный спиртовой раствор метиленовой сини, для чего 8-9 г метиленовой сини растворяют в 100 мл этилового спирта (960). Далее 1,0 мл насыщенного спиртового раствора метиленовой сини разбавляют в 30,0 мл дистиллированной воды.

61. Растворы для окраски по Грамму в модификации Калины:

а) 0,5 %-й спиртовой раствор бриллиантовой зелени:

- 1) бриллиантовой зелени 0,05 г;
- 2) спирта этилового чистого 10,0 мл.

Смешивают и хранят во флаконе с резиновой пробкой;

б) основной реактив:

- 1) 0,5 %-й спиртовой раствор йодистого калия – 96,0 мл;
- 2) 5 %-й спиртовой раствор основного фуксина – 2,0 мл;
- 3) 5 %-й спиртовой раствор йода – 2,0 мл.

При подогревании на водяной бане готовят 0,5 %-й спиртовой раствор йодистого калия.

После полного растворения навески йодистого калия в спирту раствор соединяют с раствором фуксина и йода. Полученную смесь хранят во флаконе из желтого стекла с притертой или резиновой пробкой;

в) раствор спирта:

- 1) спирта этилового 960 – 30,0 мл;
- 2) дистиллированной воды – 70,0 мл;

г) водный раствор фуксина:

- 1) основной фуксин Циля – 1,0 мл;
- 2) дистиллированной воды – 9,0 мл.

Раствор рекомендуется ежедневно обновлять.

Приложение № 1 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

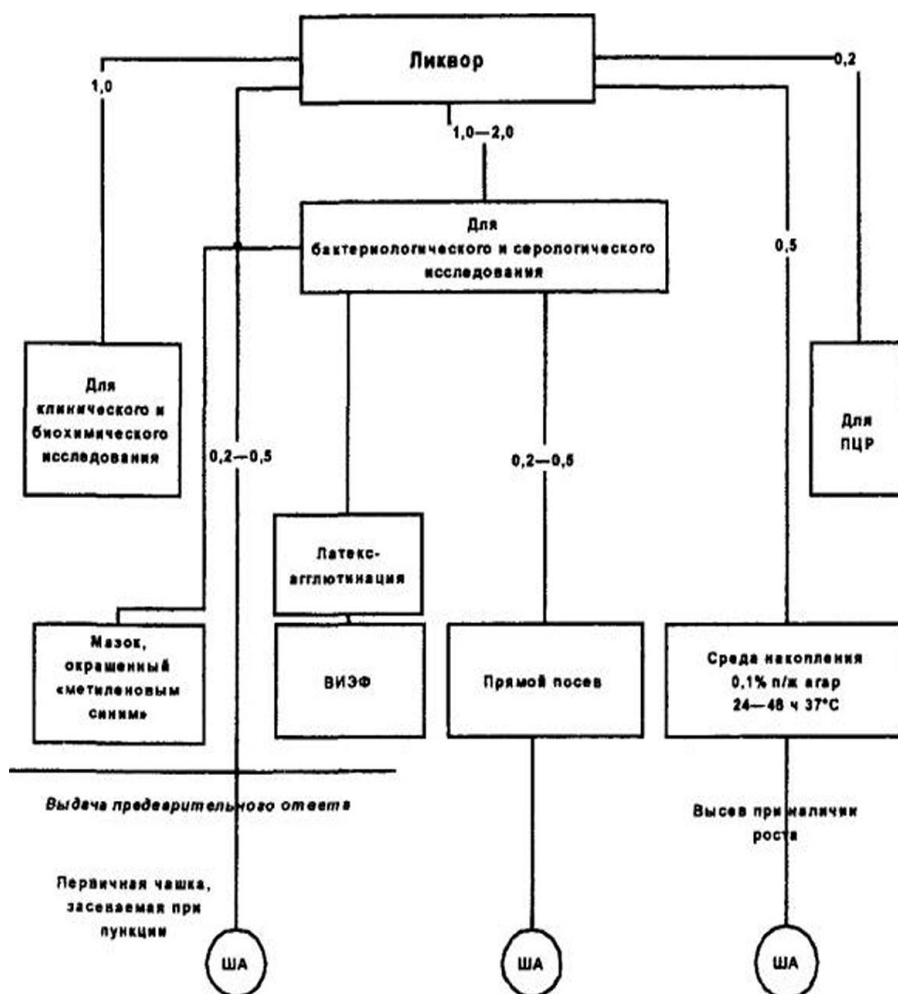
Свойства основных возбудителей менингитов, учитываемые через 24 (двадцать четыре) часа от начала бактериологического исследования

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

рисунок 1

**Исследование ликвора для выделения и идентификации
возбудителей генерализованных форм
менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов**

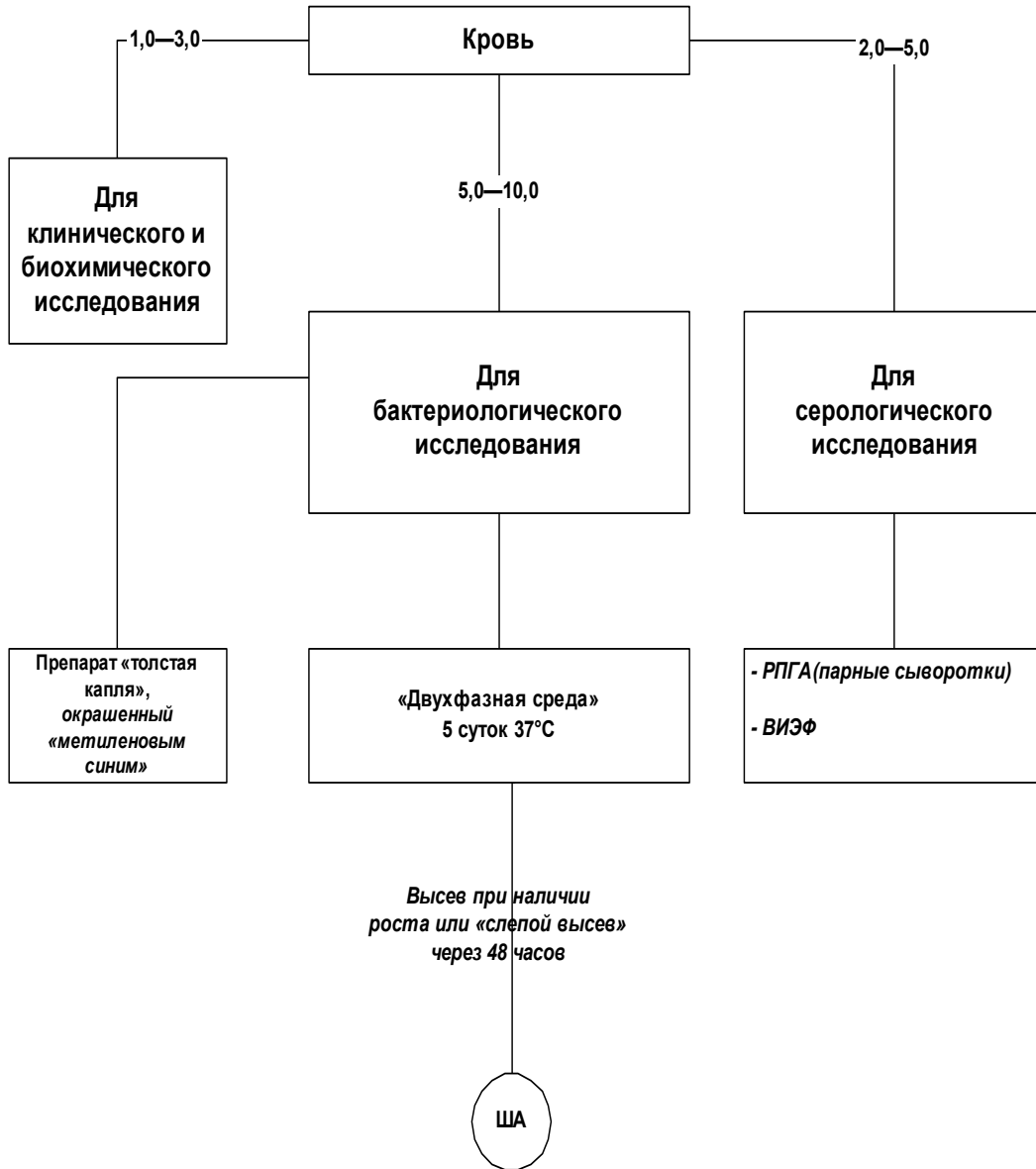
**Материал отбирается при поступлении больного в стационар
до назначения антибиотиков**



Инкубация чашек в течении 24-48 ч, при 37°C 5% CO₂

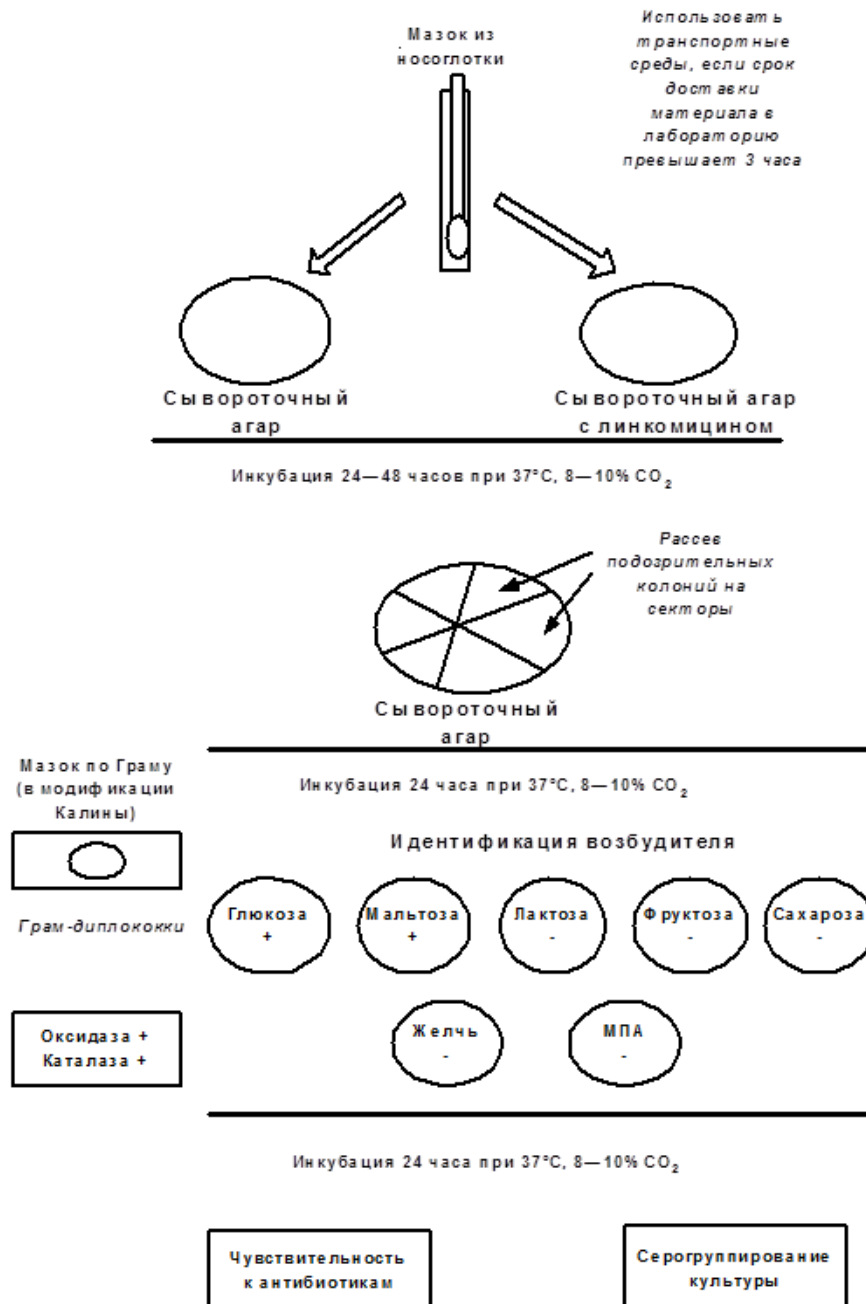
**Исследование крови для выделения и идентификации
возбудителей генерализованных форм
менингококковой инфекции и гнойных бактериальных
менингитов**

*Материал отбирается при поступлении больного в стационар
до назначения антибиотикотерапии*



Инкубация чашек в течение 24—48 ч, при 37°C, 5% CO₂

Исследование носоглоточной слизи на менингококковую инфекцию



Приложение № 3 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Сахаролитическая активность *Neisseria* и *Moraxella*

Вид	Сахара			
	глюкоза	мальтоза	лактоза	сахароза
<i>Neisseriameningitidis</i>	+	+	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	-	-	-
<i>Neisseria sicca</i>	+	+	-	+
<i>Neisseria lactamica</i>	+	+	+	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	-

Приложение № 4 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных 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					глюкоза	мальтоза	сахара роза	лактоза	фруктоза		нитратов	нитритов
	сывороточном агаре 37°C	бессывороточном агаре 37°C	среде с 0,2% желчи										
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	+	-	к	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	-	-	+	-	к	к	-	-	-	-	-	-
<i>N. subflava</i>	+	+	+	-	+	к	к	-	-	-	-	-	+
<i>N. perflava</i>	+	-	+	-	+	к	к	к	-	к	+	-	+
<i>N. flava</i> <i>N. sicca</i>	+	(+)	+	-	+	к	к	к	-	к	+	-	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	+	-		к	к	к	-	к	+	+	+
<i>N. flavescens</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+		+
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	-	+	к	к	-	к	-	-	+	+
<i>N. (Br.) catarrhalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечание: к- образование кислоты, (-) – редко,

Приложение № 5 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам методом Е-тестов (мкг/мл)

Критерии чувствительности	Антибактериальные препараты						
	PG	CT	CTX	CL	DC	RI	TS
S	< 0,06	< 0,5	< 0,25	< 8	< 0,25	< 1	< 2
I	0,12-1	–	–	16	0,5-1	–	4-16
R	> 2	–	–	> 32	> 2	> 4	> 32

Обозначения: S – чувствительные, I – умеренно резистентные, R– резистентные; PG – бензилпенициллин, CT – цефотаксим, CTX – цефтриаксон, CL – хлорамфеникол, DC – доксициклин, RI – рифампицин, TS – триметоприм.

Приложение № 6 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Дифференцирующие свойства стрептококков, вызывающих менингит

	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. faecalis</i> (гр.Д)	<i>S. agalactiae</i> (гр.В)	«Зеленящие»
Гемолиз на 5% кровяном агаре	α	α, β, γ	β	α
САМР - тест	-	-	+	-
Лизис на кровяном агаре вокруг диска с 20% желчью	+	-	-	-
Рост после прогрева при 600 С, 30 минут	-	+	-	-
Разложение маннита	+ или -	+	-	-
Тест с оптохином	+	-	-	-

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

Приложение № 7 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Критерии оценки чувствительности пневмококков. Пограничные значения диаметров
зоны задержки роста и величин минимальной подавляющей концентрации (далее - МПК)
антибиотиков

Антибактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Диаметры зон ингибиции (мм)			МПК (мг/л)		
		R	I	S	R	I	S
Бензилпенициллин	1 мкг оксациллина	—	—	≥ 20	≥ 2	0,12-1,00	≤ 0,06
Амоксициллин	—	—	—	—	≥ 8	4	≤ 2
Цефотаксим	—	—	—	—	≥ 2	1	≤ 0,5
Цефтриаксон	—	—	—	—	≥ 2	1	≤ 0,5
Цефепим	—	—	—	—	≥ 2	1	≤ 0,5
Имипенем	—	—	—	—	≥ 1	0,25-0,50	≤ 0,12
Меропенем	—	—	—	—	≥ 1	0,5	≤ 0,25
Эритромицин	15	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 1	0,5	≤ 0,25
Линкомицин	15	≤ 17	17-20	≥ 21	≥ 8	4-8	≤ 2
Клиндамицин	2	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 1	0,5	≤ 0,25
Тетрациклин	30	≤ 18	19-22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2
Хлорамфеникол	30	≤ 20	—	≥ 21	≥ 8	—	≤ 4
Рифампицин	5	≤ 16	17-18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1
Ко-тримоксазол	1,25/23,75	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 4/76	1/19-2/38	≤ 0,5/9,5
Ванкомицин	30	—	—	≥ 17	—	—	≤ 1

Приложение № 8 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Биохимические свойства различных видов рода *Haemophilus*.

Вид	Гемолиз	Каталаза	Оксидаза	Порфириновый тест	Потребность в факторах роста	Образование кислоты				
						из глюкозы	из фруктозы	из сахарозы	из лактозы	из маннозы
<i>H. influenzae</i>	—	+	+	—	X, V	+	—	—	—	—
<i>H. parainfluenzae</i>	—	±	+	+	V	+	+	+	—	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	—	X, V	+	±	—	—	—
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	±	+	+	V	+	+	+	—	—
<i>H. aphrophilus</i>	—	—	—	±	—	+	+	+	+	+
<i>H. paraparhrophilus</i>	—	—	+	+	V	+	+	+	+	+
<i>H. seqnis</i>	—	±	—	+	V	±	±	±	—	—

<i>H. ducreyi</i>	-	+	+	-	X	-	-	-	-	-
-------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Приложение № 9 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Биотипирование *Haemophilus influenzae*

Биотип	Индол	Уреаза	ОДК*
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-
ОДК* – орнитиндекарбоксилаза.			

Приложение № 10 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Рекомендуемый перечень антибактериальных препаратов для определения чувствительности *Haemophilus influenzae*

Препараты выбора	Дополнительные АБП
<ul style="list-style-type: none"> • Ампициллин • Ампициллин/сульбактам или амоксициллин/клавулат • Тест с нитроцефином для выявления продукции бета-лактамаз 	<ul style="list-style-type: none"> • Тетрациклин или доксициклин • Ко-тримоксазол • Хлорамфеникол • Фторхинолоны • Цефотаксим или цефтриаксон

Примечание:

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности

Haemophilus influenzae: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК* (мг/л) антибактериального препарата

Приложение № 11 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Антибактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	4	5	6	7	8
БЕТА-ЛАКТАМЫ**							
Ампициллин	10	≤ 18	19 - 21	≥ 22	≥ 4	2	≤ 1
Ампициллин/сульбактам	10/10	≤ 19	–	≥ 20	≥ 4/2	–	≤ 2/1
Амоксициллин/клавуланат	20/10	≤ 19	–	≥ 20	≥ 8/4	–	≤ 4/2
Цефаклор	30	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 32	16	≤ 8
Цефамандол	–	–	–	–	≥ 16	8	≤ 4
Цефуросим	30	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 16	8	≤ 4
Цефотаксим	30	–	–	≥ 26	–	–	≤ 2
Цефтриаксон	30	–	–	≥ 26	–	–	≤ 2
Цефтазидим	30	–	–	≥ 26	–	–	≤ 2
Цефтибутен	30	–	–	≥ 28	–	–	≤ 2
Цефиксим	5	–	–	≥ 21	–	–	≤ 1
Цефподоксим	10	–	–	≥ 21	–	–	≤ 2
Цефепим	30	–	–	≥ 26	–	–	≤ 2
Азтреонам	30	–	–	≥ 26	–	–	≤ 2
Имипенем	10	–	–	≥ 16	–	–	≤ 4
Меропенем	10			≥ 20			≤ 0,5
Эртапенем	10			≥ 19			≤ 0,5
МАКРОЛИДЫ							
Кларитромицин	15	≤ 10	11 - 12	≥ 13	≥ 32	16	≤ 8
Азитромицин	15	–	–	≥ 12	–	–	≤ 4
ХИНОЛОНЫ							
Ципрофлоксацин	5	–	–	≥ 21	–	–	≤ 1
Офлоксацин	5	–	–	≥ 16	–	–	≤ 2
Левифлоксацин	5	–	–	≥ 17	–	–	≤ 2
Спарфлоксацин					–	–	≤ 0,25
Моксифлоксацин	5	–	–	≥ 18	–	–	≤ 1
Гатифлоксацин	5	–	–	≥ 18	–	–	≤ 1
ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ							
Тетрациклин	30	≤ 25	26 - 28	≥ 29	≥ 8	4	≤ 2
Хлорамфеникол	30	≤ 25	26 - 28	≥ 29	≥ 8	4	≤ 2
Рифампицин	5	≤ 16	17 - 19	≥ 20	≥ 4	2	≤ 1
Ко-тримоксазол	1,25/ 23,75	≤ 10	11 - 15	≥ 16	4/76	1/19- 2/38	≤ 0,5/9,5
Примечание: * Критерии интерпретации результатов тестирования с определением МПК применимы только для метода серийных разведений. ** Для прогнозирования чувствительности к бета-лактамам антибиотикам целесообразно проводить непосредственное выявление выработки бета-лактамаз в тесте с нитроцефином. Описаны штаммы устойчивые к ампициллину, но не продуцирующие бета-лактамазы. Их следует расценивать как устойчивые к защищенным пенициллинам и цефалоспорином II поколения.							

Приложение № 12 к
Методическим указаниям
МУК МЗ ПМР 4.2.1887-24
«Лабораторная диагностика
менингококковой инфекции и
гнойных бактериальных менингитов»

Простые дифференцирующие признаки «прочих» возбудителей
гнойных бактериальных менингитов

Возбудитель	Рост на «шоколадном» агаре	Бактериоскопия	Оксидаза	Каталаза
Семейство Enterobacteriaceae	Круглые, выпуклые, иногда слизистые колонии. Гнилостный запах	Грам – палочки	–	+
Род Pseudomonas	Крупные слизистые колонии, специфический запах мыла, зеленоватый пигмент	Грам – палочки	+	+
Род Acinetobacter	Небольшие непрозрачные колонии серого цвета без гемолизирующих свойств	Грам – палочки, цепочки	–	+
Род Listeriae	Слизистые тонкие колонии, иногда в виде налета. Специфический запах творога или молочной сыворотки	Грам + палочки	–	+
Род Streptococcus	Мелкие колонии без тенденции к слиянию. Альфа-, бета-, гамма-гемолиз вокруг колоний	Грам + кокки, цепочки	X	–
Род Enterococcus	Мелкие непрозрачные сероватые колонии. Альфа-, бета-гемолиз вокруг колоний	Грам + кокки, цепочки	X	–
Род Staphylococcus	Гладкие выпуклые непрозрачные колонии белого или золотистого цвета	Грам + кокки, гроздь	–	+
Дрожжеподобные грибы	Крупные кремовые колонии с бахромой по периферии. Напоминают «капли майонеза»	Грибы	X	X
– тест отрицательный + тест положительный X тест не определяется				

Примечание:

Особенностью течения «прочих» менингитов часто является неэффективность антибактериальной терапии, связанная с резистентностью возбудителей к широкому спектру антибиотиков. Правильный и быстрый подбор препарата может сыграть решающее значение при лечении больного.

Чувствительность к антибактериальным препаратам определяют дискодиффузионным методом и методом серийных разведений, в первую очередь к бета-лактамам (пенициллину, аминопенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам), хлорамфениколу, рифампицину, фторхинолонам, с учетом биологических особенностей возбудителей.