

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ
И ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ**

Методические указания по методам контроля
МУК 4.2. ~~4067~~ -24

Москва 2024

Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. МУК 4.2. 4068-24

1. Разработаны ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (И.С. Королева, М.А. Королева, Г.В. Белошицкий, М.И. Грицай, Н.С. Чурилова, В.Г. Акимкин); ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Я.В. Подкопаев, Л.В. Домотенко, М.В. Храмов); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А.А. Мельникова).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой «21» сентября 2024 г.

3. МУК 4.2. 4068 -24 введены взамен МУК 4.2.1887-04 «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 04.03.2004.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации



А.Ю. Попова

А.Ю. Попова

«*27*» *сентября* 2024 г.

Дата введения «*31*» *декабря* 2024 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ И ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ

Методические указания по методам контроля
МУК 4.2. *4068* -24

I. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Настоящие методические указания по методам контроля (далее – МУК) описывают организационные и методологические принципы лабораторной диагностики менингококковой инфекции (далее – МИ) и гнойных бактериальных менингитов (далее – ГБМ).

1.2. Настоящие МУК разработаны для применения в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологические заключения на работу с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и лицензию на соответствующий вид деятельности в установленном порядке¹.

1.3. Настоящие МУК носят рекомендательный характер.

¹ Часть 1 статьи 12 Федерального закона от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности»; пункты 134, 135 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный № 62500), с изменениями, внесенными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 № 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный № 67587); от 25.05.2022 № 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный № 68934) (далее – СанПиН 3.3686-21).

II. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2.1. ГБМ – опасные и инвалидизирующие заболевания, которые характеризуются быстрым течением и серьезными последствиями для здоровья, экономики и социальной сферы, затрагивая людей всех возрастных групп во всех странах мира.

2.2. МИ и ГБМ могут вызывать летальный исход в течение 24 ч и пожизненную инвалидность у каждого пятого заболевшего.

2.3. Этиологическими агентами ГБМ являются *Neisseria meningitidis* (далее – *N. meningitidis*, менингококк), *Streptococcus pneumoniae* (далее – *S. pneumoniae*, пневмококк), *Haemophilus influenzae* (далее – *H. influenzae*, гемофильная палочка), бактерии рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, семейства *Enterobacteriaceae* и другие микроорганизмы. Совокупная доля менингококка, пневмококка и гемофильной палочки типа b в этиологической структуре ГБМ достигает более 80 % [1]. Прочие возбудители являются важным этиологическим фактором ГБМ² среди новорожденных (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*), лиц престарелого возраста (*Enterobacteriaceae*, *Proteus*, *Pseudomonas*), а также ГБМ, развившихся после травм и хирургических вмешательств (*Acinetobacter*, *Escherichia coli* (далее – *E. coli*), *Staphylococcus*). Клинические проявления ГБМ носят сходный характер, в связи с чем определение этиологического агента является приоритетной задачей эпидемиологического надзора за ГБМ и разработкой и корректировкой санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий.

2.4. Всемирной Организацией здравоохранения (далее – ВОЗ) в рамках концепции «Победить менингит к 2030 году» была разработана глобальная дорожная карта³. Глобальная дорожная карта определяет путь для устранения основных причин ГБМ (менингококк, пневмококк, гемофильная палочка и стрептококк группы В). Сформулированы три цели концепции победы над ГБМ:

- 1) ликвидировать эпидемии ГБМ;
- 2) уменьшить количество случаев и смертей от ГБМ, предупреждаемых с помощью вакцин;
- 3) снизить инвалидность и улучшить качество жизни после ГБМ.

Для достижения данных целей определены пять основных направлений: профилактика и борьба с эпидемиями, диагностика и лечение, эпидемиологический надзор, поддержка и уход за людьми, перенесшими менингит, информирование и вовлечение в проблему общественности.

Диагностические лабораторные исследования при ГБМ

2.5. Целью исследования является лабораторное подтверждение клинического, эпидемиологического и патологоанатомического диагноза МИ и ГБМ. Подтверждение основывается на выделении возбудителя из патологического

² Примечание: прочие возбудители – не основные возбудители ГБМ (таблица 6).

³ ВОЗ. Глобальная дорожная карта «Победа над менингитом к 2030 году», 2021 (англ. Defeating meningitis by 2030: a global road map, WHO 2021) – iris.who.int/bitstream/handle/10665/342010/9789240026407-eng.pdf?sequence=1 (в свободном доступе).

и секционного материала от людей, определении наличия в исследуемом материале нуклеиновых кислот, белков, антигенов возбудителя и антител к нему. Лабораторные исследования на МИ и ГБМ проводят с использованием бактериологических, серологических и молекулярно-генетических методов⁴. Они включают световую микроскопию, высевы на питательные среды, реакцию латекс-агглютинации (далее – РЛА), реакцию непрямой (пассивной) гемагглютинации (далее – РПГА), полимеразную цепную реакцию (далее – ПЦР), постановку дополнительных тестов идентификации выделенных культур, времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (англ. time-of-flight matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, далее – MALDI-TOF MS).

III. МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ, ОТБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА МАТЕРИАЛА И ПОДГОТОВКА ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ

3.1. Все работы по отбору, транспортировке и подготовке проб клинического и патологоанатомического материала от людей осуществляются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁵, а также методическими документами⁶.

Материалы для исследования

3.2. Очаг воспаления при ГБМ локализован в мягких мозговых оболочках головного и спинного мозга, в связи с чем основным материалом для исследования является спинномозговая жидкость (далее – СМЖ, ликвор). Также исследуется кровь. В случае летального исхода исследуется аутопсийный материал от человека: кровь, СМЖ, кусочки органов (мягкие мозговые оболочки, головной мозг, селезенка, надпочечники).

3.3. Для бактериологического подтверждения менингококкового назофарингита и выявления назофарингеального менингококкового носительства исследуют носоглоточную слизь. Бактериологический посев мазка из носоглотки для подтверждения клинического диагноза «генерализованная форма МИ» (далее – ГФМИ) представляется нецелесообразным и, если исследование все же проводится и при этом из носоглотки выделяется менингококк, то данный факт расценивается как выявление локализованных форм – назофарингита (если есть клинические признаки воспаления в носоглотке) или носительства (если нет клинических признаков локализованного воспаления).

⁴ Пункты 300 – 3008 СанПиН 3.3686-21.

⁵ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

⁶ МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 22.12.2009 (далее – МУ 1.3.2569-09).

Отбор, транспортировка, упаковка и хранение материалов для исследования

3.4. Отбор материала от больного (подозрительного на заболевание) человека проводят как до начала специфического лечения (предпочтительно), так и в течение всего периода клинических проявлений. Материал отбирают в асептических условиях.

3.5. Ликвор.

Ликвор отбирают после пункции поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков на этапе поступления в стационар. После пункции ликвор распределяют для исследования следующим образом:

- 1,0 мл направляется в клиническую лабораторию для проведения общего ликворологического и цитологического исследования;

- 0,2 мл направляется для постановки ПЦР;

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

- 0,5 мл засевают на шоколадный агар (далее – ША) (см. п. 1.8 приложения 1 к настоящим МУК) или агар на основе гидролизата рыбной муки (далее – ГБМ-агар) (см. приложение 7 к настоящим МУК) непосредственно «у постели больного». Далее чашку Петри с посевом хранят при температуре плюс 35 – 37 °С до доставки в лабораторию. Применение данной методики позволяет получить культуру возбудителя ГБМ на 18 – 24 ч раньше, чем по стандартной схеме посева материала в лаборатории и, тем самым, ускорить проведение исследования и выдачу ответа;

- 0,5 мл засевают в среду обогащения (5,0 мл 0,1 % полужидкого сывороточного агара (далее – СА) (см. п. 1.4 приложения 1 к настоящим МУК) непосредственно «у постели больного» и далее хранят при температуре плюс 35 – 37 °С до доставки в лабораторию.

3.6. Кровь.

При всех формах болезни для проведения бактериологического исследования отбирают цельную кровь. Образцы распределяют следующим образом:

- для бактериологического посева на двухфазную питательную среду (см. п. 1.14 приложения 1 к настоящим МУК) 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;

- 2,0 – 3,0 мл крови используют для серологических исследований с целью выявления специфических антител (РПГА). Для получения достоверных результатов о нарастании титров антител в реакции РПГА важно исследовать парные сыворотки, т.е. сыворотки крови, взятые в первые дни болезни при поступлении больного в стационар и затем на 10 – 12 день заболевания (для получения сыворотки крови отбирают венозную кровь в пробирки с активатором образования сгустка. При отсутствии таковых сыворотку крови получают следующим способом: пробирку с кровью оставляют при комнатной температуре на 15 минут, далее аккуратно обводят сгусток стеклянной палочкой, отделяя его от стенок пробирки, после чего образовавшуюся сыворотку переносят в стерильную пробирку с плотно закрывающейся крышкой);

- несколько капель крови наносят на предметное стекло для приготовления препарата «толстой капли» крови.

3.7. Аутопсийный материал.

Аутопсийный материал берут во время проведения вскрытия с соблюдением правил асептики стерильным инструментарием, желательнее в наиболее ранние сроки после смерти. Отбирают кровь, ликвор, кусочки органов (мягкие мозговые оболочки, головной мозг, надпочечники, селезенка) и помещают в одноразовые стерильные контейнеры, флаконы или пробирки.

3.8. Материал для бактериологических исследований доставляют в бактериологическую лабораторию немедленно после отбора в специальных контейнерах, способных поддерживать температуру плюс 35 – 37 °С. При невозможности быстрой доставки материала из отделения в лабораторию (в том числе, в ночное время, выходные и праздничные дни) материал хранят следующим образом: первичные посеы СМЖ на плотных питательных средах и в 0,1 % полужидком СА, посев крови в двухфазной питательной среде хранят при температуре плюс 35 – 37 °С. СМЖ и кровь для серологических исследований хранят в условиях холодильника при температуре плюс (5±3) °С. Если СМЖ посеяли «у постели больного», то в лаборатории ее используют только для бактериоскопии и постановки серологических реакций (например, РЛА). Для бактериологического посева хранившуюся в холодильнике СМЖ не используют.

3.9. Отбор проб для исследований производится медицинской организацией, в который госпитализирован больной в стерильную лабораторную посуду (предпочтительно однократного использования), соответствующую объему проб, с использованием стерильных (одноразовых) инструментов. Емкости с образцами материала маркируют, обрабатывают снаружи дезинфицирующим средством (6 % раствором перекиси водорода), герметизируют парафинизированной пленкой и упаковывают с соблюдением принципа «тройной» упаковки⁷, далее помещают первичные емкости с пробами внутрь пластикового или металлического вторичного контейнера с завинчивающейся крышкой, выложенного материалом, адсорбирующим влагу (вата, марля), в достаточном количестве для полного впитывания жидкости в случае повреждения первичного контейнера. Контейнер пломбируют или опечатывают, делают надпись «Верх, осторожно!».

3.10. В сопроводительном документе к пробам указывают, какой материал и в каком количестве направляют, кто направил, количество проб, вид тары и упаковки, место и дату отбора материала, условия транспортировки и хранения проб, основание для проведения исследований, диагноз. К сопроводительному документу прилагают опись с указанием места отбора каждой пробы и акт передачи образцов для исследования.

3.11. Транспортировка проб осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁸.

3.12. Биологический материал (СМЖ, кровь, аутопсийный материал, выделенные культуры), подготовленный для отправления в Референс-центр по мониторингу за бактериальными менингитами, на базе ФБУН ЦНИИ

⁷ Пункт 524 СанПиН 3.3686-21.

⁸ Пункты 512-520, 524, 530 СанПиН 3.3686-21.

эпидемиологии Роспотребнадзора⁹ (далее – Референс-центр по мониторингу за бактериальными менингитами) хранят в отдельных стерильных емкостях. Транспортировку проб в Референс-центр по мониторингу за бактериальными менингитами осуществляют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹⁰.

Подготовка проб к исследованию

3.13. Все работы по подготовке проб и исследованию материала, подозрительного на наличие возбудителей ГБМ, проводят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹¹.

Предварительная обработка проб для исследования методом ПЦР

3.14. Обеззараживание материала проводят в соответствии с методическими документами¹². После проведенных манипуляций 100 мкл обработанного образца переносят в пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл и добавляют лизирующий раствор в объеме, указанном в инструкции по применению к набору реагентов для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее – ДНК), и инкубируют 5 минут при температуре плюс 65 °С. После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

IV. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛА НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ

4.1. Основные принципы проведения исследований по этиологической расшифровке ГБМ и подтверждения клинического диагноза базируются на особенностях самого заболевания:

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

- ответ по определению этиологии заболевания должен быть не только быстрым, но и точным, так как заболевание полиэтиологично по своей природе. Данное обстоятельство целесообразно учитывать при организации работы лабораторий по этиологической расшифровке ГБМ.

4.2. Исследование материала на наличие возбудителя ГБМ проводится в два этапа:

⁹ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

¹⁰ Пункты 512-520, 524, 530 СанПиН 3.3686-21.

¹¹ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

¹² МУ 1.3.2569-09.

1) обнаружение возбудителя или его маркеров (ДНК, антигенов, антител) в клиническом материале больных людей и аутопсийном материале при летальном исходе заболевания;

2) выделение и идентификация культуры возбудителя с последующим изучением ее свойств.

4.3. Выделенные штаммы возбудителя ГБМ, клинический (СМЖ и кровь) и аутопсийный материал из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации и их филиалов передают в Референс-центр по мониторингу за бактериальными менингитами.

4.4. Передачу и транспортировку культур осуществляют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹³. Прилагают паспорт на штамм в одном экземпляре, сопроводительное письмо, акт упаковки и акт передачи¹⁴.

V. ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ МЕНИНГОКОККА, ПНЕВМОКОККА И ГЕМОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ

5.1. Предварительная идентификация *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* может быть проведена на основании цитологического и бактериоскопического исследования СМЖ, результатов окрашивания по Граму и специфической морфологии выросших колоний бактерий (см. гл. VI, VII, VIII, IX).

5.2. В сочетании с клинической картиной и результатами цитологического исследования СМЖ, характерными для бактериального менингита, предварительная экспресс-диагностика бактериального менингита, вызываемого *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* или *H. influenzae*, может быть проведена путем окрашивания по Граму осадка СМЖ, полученного при центрифугировании, или определения специфических антигенов в СМЖ с помощью РЛА. Положительные результаты в каком-либо из данных тестов могут дать быстрое подтверждение инфекции, даже при отсутствии роста культуры.

Цитологическое исследование СМЖ

5.3. Лабораторное исследование СМЖ является первым этапом подтверждения ГБМ. Цитологическое исследование предшествует центрифугированию и нагреванию СМЖ. Типичные изменения в СМЖ, связанные с бактериальным менингитом:

- помутнение;
- повышенное давление при пункции (более 180 мм вод. ст.);
- плеоцитоз (обычно полиморфноядерных (далее – ПМЯ) лейкоцитов);
- уровень лейкоцитов более 10 кл/мм³;
- сниженная концентрация глюкозы (менее 45 мг/дл).

¹³ Пункты 512-520, 524, 530 СанПиН 3.3686-21.

¹⁴ Пункты 512-527, 530 СанПиН 3.3686-21.

Обработка образцов СМЖ

5.4. После поступления СМЖ в микробиологическую лабораторию следует зафиксировать объем СМЖ, доступный для анализа. Если было получено менее 1 мл СМЖ, центрифугировать ее не следует; вместо этого СМЖ необходимо высеять на ША или ГБМ-агар, а также использовать для приготовления мазков, окрашенных по Граму. При получении более 1 мл СМЖ (т.е. если объем образца является достаточным для центрифугирования) ее следует отцентрифугировать с силой, достаточной для осаждения бактерий. Центрифугирование при $1000 \times g$ в течение 10–15 минут достаточно для осаждения бактерий. После центрифугирования образца супернатант следует отобрать пастеровской пипеткой и сохранить, если планируется идентификация с помощью РЛА. Осадок нужно энергично перемешать (например, в закрытой пробирке с помощью лабораторного вихревого смесителя). После хорошего перемешивания одну или две капли осадка используют для окрашивания по Граму, и одну каплю – для посева штрихом на среду для получения первичной культуры.

Примечание: g ($1 \times$ значение силы тяжести) обозначает относительную центробежную силу (далее – ОЦС), но рекомендуемая скорость центрифугирования в протоколах часто указана в оборотах в минуту (далее – об/мин). ОЦС зависит от длины радиуса ротора, поэтому при одном и том же значении об/мин на разных центрифугах может достигаться разное значение g . Поэтому для описания скорости центрифугирования следует использовать ОЦС. Если указано лишь значение в об/мин, ОЦС может быть рассчитано по формуле (1):

$$\text{ОЦС} = 0,000018 \times r \times n^2, \quad (1)$$

где: r – радиус ротора центрифуги, см;
 n – скорость вращения, об/мин.

Бактериоскопический метод

5.5. Метод позволяет быстро обнаружить присутствие микроорганизмов в СМЖ или крови и ориентировочно определить их родовую и видовую принадлежность. Эффективность бактериоскопии зависит от концентрации микроорганизма в клиническом материале, качества окраски и опыта исследователя.

5.6. Мазки готовят на предметных стеклах со шлифованным краем для маркировки стекла. На шлифованной поверхности каждого стекла проставляют номер пробы. Предметные стекла должны быть заранее тщательно вымыты и обезжирены.

5.7. Окрашивание СМЖ водно-спиртовым раствором метиленовой сини.

Окрашивание водно-спиртовым раствором метиленовой сини проводят с целью обнаружения бактерий в СМЖ. На предметное стекло наносят каплю СМЖ из осаденного после центрифугирования слоя и высушивают при комнатной температуре или в термостате при температуре плюс $35 - 37^\circ\text{C}$. Далее без

предварительной фиксации на препарат наносят краситель (водно-спиртовой раствор метиленовой сини) и после 2-х минутной экспозиции тщательно промывают водопроводной водой, избегая повреждения препарата. Препарат подсушивают и микроскопируют под масляной иммерсией, просматривая не менее 20 полей зрения или до обнаружения морфологически четких микробных клеток.

5.7. Окрашивание по Граму.

Окрашивание по Граму – метод дифференциации микроорганизмов по составу клеточной стенки. На основании окрашивания бактерии делятся на грамположительные (фиолетовый цвет) и грамотрицательные (розовый или красный цвет).

Окрашивание по Граму может также использоваться для оценки качества клинического образца. Для приготовления мазка СМЖ, окрашенного по Граму, СМЖ должна быть предварительно отцентрифугирована. Приготовление мазка с использованием осадка СМЖ необходимо контролировать для образования монослоя микроорганизмов, достаточно плотного для легкой визуализации, но достаточно тонкого для выявления морфологических характеристик. Для проведения качественного окрашивания необходимо перед работой с клиническим материалом провести валидацию метода с использованием тест-штаммов для контроля качества (далее – КК). В дополнение к штаммам *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, в качестве образца грамположительных кокков можно использовать *Staphylococcus aureus* (далее – *S. aureus*), а грамотрицательных палочек – *E. coli*.

Для приготовления мазка СМЖ на предметное стекло наносят 1 – 2 капли хорошо перемешанного осадка СМЖ. Для приготовления мазка выделенной культуры используют суточную культуру микроорганизма. После высушивания на воздухе мазок фиксируют химическим способом. Для этого предметное стекло с мазком опускают на 10 – 15 минут в один из следующих фиксаторов: 96 % этиловый спирт, метиловый спирт, ацетон, смесь Никифорова (96 % этиловый спирт и диэтиловый эфир в соотношении 1:1), жидкость Карнуа (96 % этиловый спирт, хлороформ, ледяная уксусная кислота в соотношении 6:3:1). Физическая фиксация мазка над пламенем горелки не рекомендуется из-за возможного образования микроаэрозоля, содержащего живые клетки микроорганизмов. Дальнейшую процедуру окрашивания проводят по стандартной методике.

Окрашенные по Граму мазки микроскопируют под масляной иммерсией.

N. meningitidis может обнаруживаться внутри ПМЯ лейкоцитов или вне клеток в виде грамотрицательных диплококков, имеющих форму кофейных зерен (рисунок 1).

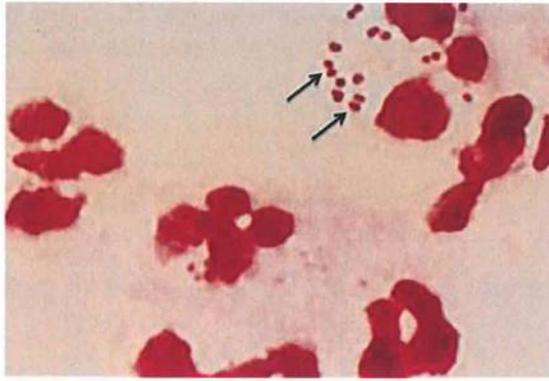


Рисунок 1. Окрашивание по Граму *N. meningitidis* внутри ПМЯ лейкоцитов в СМЖ

S. pneumoniae может обнаруживаться внутри и за пределами клеток в виде грамположительных ланцетовидных диплококков, иногда объединенных в короткие цепочки (рисунок 2).

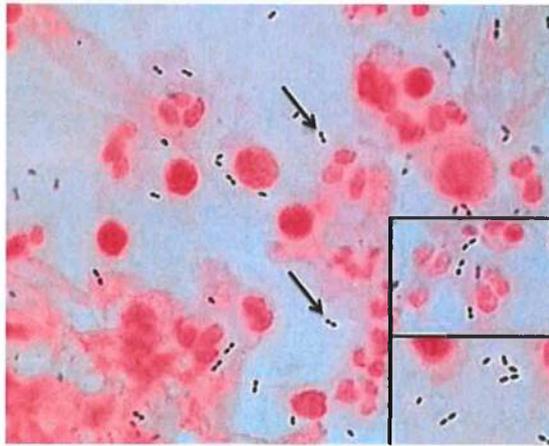


Рисунок 2. Окрашивание по Граму *S. pneumoniae* с лейкоцитами в СМЖ

H. influenzae обнаруживается в виде маленьких плеоморфных грамотрицательных палочек или коккобацилл, расположенных в случайном порядке (рисунок 3).



Рисунок 3. Окрашивание по Граму *H. Influenzae* в СМЖ

5.8 Мазок препарата «толстая капля» крови.

Мазок выполняют непосредственно «у постели больного» при его поступлении в стационар. На середину предметного стекла наносят каплю крови и распределяют с помощью стерильного аппликатора так, чтобы диаметр мазка составил 10–15 мм. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Далее препарат доставляют в бактериологическую лабораторию. Окраску мазка проводят водно-спиртовым раствором метиленового синего в течение 2–3 минут без предварительной фиксации. После окрашивания препарат осторожно промывают водой и подсушивают на воздухе. Окрашенный мазок микроскопируют под масляной иммерсией, просматривая не менее 20 полей зрения или до обнаружения морфологически четких микробных клеток.

Проведение реакции латекс-агглютинации

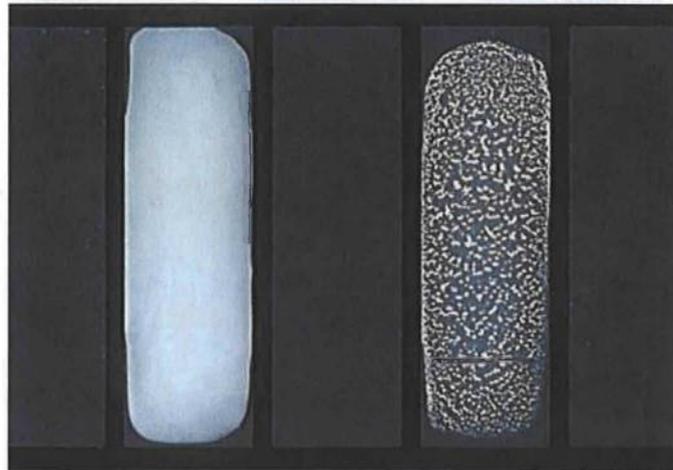
5.9. Данный метод позволяет в течение 15 минут дать заключение об отсутствии или наличии специфических антигенов в СМЖ больного. Реакцию проводят при наличии признаков гнойного воспаления в СМЖ и(или) при бактериоскопическом обнаружении в ней возбудителя. Для выполнения реакции используют зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке¹⁵ наборы латекс-диагностических препаратов.

Для получения достоверных результатов образец СМЖ должен быть исследован как можно скорее. Если немедленное исследование невозможно, образец СМЖ может быть помещен в холодильник при температуре плюс (5 ± 3) °С на несколько часов или заморожен при температуре минус 20 °С.

Постановка теста осуществляется в соответствии с инструкцией производителя.

Предварительно СМЖ прогревают в течение 5 минут при температуре плюс 100 °С и центрифугируют при 1500–2000 об/мин или фильтруют через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. 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 реагентов. 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 (рисунок 4).

¹⁵ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (далее – Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ); постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий» (далее – постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416).



Отрицательная реакция Положительная реакция

Рисунок 4. Отрицательная и положительная реакция латекс-агглютинации

Первичная культура. Бактериологический метод

5.10. При отборе и посеве исследуемого материала следует исключить случайную контаминацию материала посторонней микрофлорой и не допустить гибели возбудителя с момента взятия материала для анализа и до начала работы с ним в лаборатории. Первое условие обеспечивают правильным забором материала, соблюдением асептики; второе – доставкой образцов или посевов в лабораторию незамедлительно в теплом виде или временное сохранение до доставки при температуре плюс 35–37 °С в течение не более чем 12 часов. При бактериологическом выделении основных возбудителей отбор исследуемого материала следует проводить, по возможности, до начала антибактериальной терапии.

5.11. Выбор питательной среды для первичной культуры. В связи с тем, что при первичном посеве СМЖ этиологический агент неизвестен, необходимо использовать питательную среду, обеспечивающую рост наиболее широкого спектра микроорганизмов, включая *H. influenzae* – ША или ГБМ-агар. При этом кровяной агар (далее – КА, см. п. 1.7 приложения 1 к настоящим МУК) может быть использован в качестве вспомогательной питательной среды для первичной дифференциации микроорганизмов по типу гемолиза.

Наиболее предпочтительной питательной средой для выделения и культивирования *S. pneumoniae* является КА, поскольку позволяет наблюдать в зоне роста культуры α-гемолиз, что способствует первичной идентификации этого вида. На ША вокруг колоний пневмококка питательная среда приобретает желтовато-зеленоватый цвет, что не является истинным гемолизом, но также может служить дифференциальным признаком. На ГБМ-агаре в зоне роста *S. pneumoniae* происходит обесцвечивание питательной среды.

Для выделения и культивирования *H. influenzae* необходимо использовать ША или коммерческие питательные среды, содержащие факторы роста X (например, гемин) и V (например, никотинамидадениндинуклеотид, далее – НАД): Гемофилус агар, ГБМ-агар. КА не поддерживает рост гемофильной палочки, в связи с тем, что не подвергшаяся тепловой обработке кровь содержит ферменты,

разрушающие фактор роста V, при этом *H. influenzae* может расти на КА вблизи колоний *S. aureus* или *Enterococcus spp.* (сателлитный рост). Кроме того, *H. influenzae* растет на КА вокруг бумажных или картонных полосок или дисков, пропитанных НАД, а на простых средах – между двумя полосками, одна из которых пропитана НАД, а другая – геминном. Однако сателлитный рост на КА и полоски с факторами роста могут быть использованы только для целей идентификации этого микроорганизма, а не для его выделения или субкультивирования.

N. meningitidis растет как на КА, так и на ША, для выделения и культивирования менигококка, также можно использовать коммерческие питательные среды (приложение 7 к настоящим МУК). Для накопления чистой культуры при первичной изоляции целесообразно использовать СА (см. п. 1.5 приложения 1 к настоящим МУК). Поскольку *N. meningitidis* хорошо растет во влажной атмосфере, при подозрении на инфекцию, вызываемую *N. meningitidis*, целесообразно установить плоскую кювету с водой на дно термостата или положить намоченное бумажное полотенце в сосуд со свечой. Источник влаги следует регулярно заменять, чтобы не допустить загрязнения плесенью.

Для селективного выделения микроорганизмов из клинического материала, потенциально содержащего смешанную флору из бактерий и (или) грибов (например, из назофарингеальной слизи), или при загрязнении первичной культуры после выделения другими микроорганизмами, необходимо использовать питательные среды, содержащие селективные добавки.

Для выделения *N. meningitidis* может быть использован ряд комбинаций антимикробных препаратов (далее – АМП): ванкомицин (3 мг/л среды), полимиксин В (10 мг/л среды) и амфотерицин В (5 мг/л среды); ванкомицин (3 мг/л среды) и колистин (15 мг/л среды); ванкомицин (3 мг/л среды), колистин (7,5 мг/л среды) и нистатин (12 500 ед/л среды).

Для выделения *S. pneumoniae* используют: налидиксовая кислота (15,0 мг/л), амфотерицин В (5,0 мг/л), полимиксин В (10,0 мг/л); гентамицин (5 мг/л среды); гентамицин (2 мг/л среды), налидиксовая кислота (50 мг/л среды) и кристаллический фиолетовый (1:500 000); колистин (10 мг/л среды) и налидиксовая кислота (10 мг/л среды).

Для селективного выделения *H. influenzae* используют: бацитрацин (300,0 мг/л среды), ванкомицин (3,0 мг/л среды) амфотерицин В (5,0 мг/л среды); бацитрацин (300,0 мг/л среды), ванкомицин (5,0 мг/л среды) и клиндамицин (1,0 мг/л среды).

Для посевов крови используют флаконы с двухфазной питательной средой. Двухфазная питательная среда содержит факторы роста X и V. На ней хорошо растет менигококк, пневмококк, гемофильная палочка и другие менее требовательные к составу питательной среды микроорганизмы.

На весь спектр основных возбудителей ГБМ могут быть использованы сухие и готовые к применению питательные среды, а также необходимые ростовые и селективные добавки, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке¹⁶. Для выделения

¹⁶ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

прочих возбудителей ГБМ также используются среды и добавки, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке¹⁷.

Допустимым условием хранения чашек Петри или пробирок с готовыми питательными средами является температура бытового холодильника – плюс (5 ± 3) °С. Срок хранения готовых питательных сред не должен превышать 7 суток, если иные сроки не заявлены производителем.

5.12. КК питательной среды для первичной культуры. Все питательные среды для получения первичной культуры должны проходить КК для проверки способности среды поддерживать надлежащий рост *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*.

Испытанию подлежит каждая серия сухой или готовой к применению коммерческой питательной среды, а также каждая партия среды, изготовленная в лаборатории для собственного использования. Серию коммерческой сухой питательной среды оценивают на соответствие внешнего вида (физического состояния, цвета) и значения рН. Если процедура приготовления из сухих коммерческих сред валидирована, возможна проверка специфических свойств выборочно или однократно для вновь полученной серии. При введении в состав сред биологических жидкостей (кровь, сыворотка крови) или других добавок контроль осуществляют для каждой процедуры приготовления (варки в лаборатории) питательной среды.

При использовании коммерческих готовых питательных сред или сред, изготовленных в лаборатории для собственного использования, проверка качества осуществляется на соответствие внешнего вида, прозрачности, цветности, рН (для коммерческих сред при наличии указания в инструкции по применению), стерильности, специфических свойств (в том числе, ростовые, дифференцирующие, ингибирующие) и иных значимых показателей. Оценка специфических свойств питательных сред для определения чувствительности микроорганизмов к АМП проводят для каждой новой серии с набором АМП или дисков, их содержащих¹⁸.

Условия проведения процедуры КК каждой питательной среды приведены в приложении 1 к настоящим МУК.

5.13. Бактериологический посев СМЖ «у постели больного». Первичный бактериологический посев СМЖ выполняют непосредственно «у постели больного» в стационаре после проведения пункции. Чашки Петри или пробирки с питательной средой, так же, как и все необходимые для забора патологического материала принадлежности (пустые стерильные пробирки, пробирки с 0,1 % полужидким СА, 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.

¹⁷ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

¹⁸ ГОСТ Р 70393-2022 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Приготовление, производство, хранение и испытания питательных сред», введенный приказом Росстандарта от 13.10.2022 № 1132-ст (далее – ГОСТ Р 70393-2022).

Перед пункцией емкости с питательными средами достают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 10 минут. После проведения пункции непосредственно из пункционной иглы выполняют посев СМЖ на питательную среду: осторожно открывают чашку Петри и закапывают несколько капель СМЖ (3 – 4 капли) на поверхность среды. Далее закрывают чашку Петри с посевом, ставят на ровную поверхность и с помощью нескольких круговых движений чашки Петри по поверхности стола распределяют капли СМЖ по поверхности питательной среды. После того как СМЖ впитается (обычно 2 – 3 минуты), фиксируют дно и крышку чашки Петри (например, пластырем) во избежание ее случайного открывания.

Посев СМЖ в пробирку с 0,1 % полужидким СА проводят сразу после пункции. Для этого непосредственно из пункционной иглы 5 – 6 капель СМЖ вносят в пробирку с питательной средой. Если непосредственно «у постели больного» сделан посев СМЖ по вышеизложенному способу, то этап посева СМЖ в лаборатории (п. 5.13) следует исключить, а доставленную в лабораторию стерильную СМЖ исследуют только бактериоскопическим и серологическим методами. Емкости с посевами до доставки в лабораторию хранят при температуре плюс 35 – 37 °С или немедленно доставляют в бактериологическую лабораторию. В бактериологической лаборатории посеvy инкубируют при температуре плюс 35 – 37 °С в течение 24 – 48 часов в атмосфере, содержащей 5 – 10 % углекислого газа (анаэробат с газогенерирующим пакетом, обеспечивающим атмосферу с содержанием 5 – 10 % углекислого газа, «свечной» сосуд с парафиновой свечой или CO₂-инкубатор).

5.14. Бактериологический посев СМЖ в бактериологической лаборатории. 3 – 4 капли СМЖ (в зависимости от объема образца) вносят непосредственно на питательную среду в течение 1 ч после взятия образца. Посевы инкубируют при температуре плюс 35 – 37 °С в течение 24 – 48 часов в атмосфере, содержащей 5 – 10 % углекислого газа.

Если СМЖ уже центрифугировали, то для получения первичной культуры используют 1 каплю хорошо перемешанного осадка.

Часть осадка СМЖ необходимо внести в пробирку с 0,1 % полужидким СА.

При наличии роста на плотных питательных средах проводят визуальную оценку выросших колоний, готовят мазок по Граму, определяют оксидазу, каталазу, при наличии технических возможностей проводят идентификацию с использованием MALDI-TOF MS, и в зависимости от полученного результата проводят дальнейшую идентификацию возбудителя и определение чувствительности к АМП.

При наличии через 24 – 48 часов признаков роста в 0,1 % полужидком СА проводят высев на ША, ГБМ-агар или КА (наличие роста на полужидком СА исключает присутствие в образце *H. influenzae*, в связи чем допустимо использование КА). Инкубирование посевов проводят так же, как описано выше.

5.15. Бактериологический посев крови «у постели больного» и пересев первичной культуры в бактериологической лаборатории. Посев крови выполняют во флаконы с двухфазной питательной средой в соотношении крови к жидкой фазе 1:10 для уменьшения бактерицидного эффекта сыворотки человеческой крови.

Флакон с двухфазной питательной средой должен быть засеян немедленно (в течение 1 минуты) после венопункции, чтобы не допустить свертывания крови в шприце. Засеянный флакон с двухфазной питательной средой должен быть доставлен в бактериологическую лабораторию для инкубирования и пересева как можно скорее.

Если отправка засеянного флакона в бактериологическую лабораторию в тот же день невозможна, его помещают в термостат при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере, содержащей 5 – 10 % углекислого газа оставляют там до тех пор, пока не появится возможность транспортировки. Засеянные флаконы не следует помещать в холодильник. Ежедневно в течение 7 дней проверяют флаконы с двухфазной питательной средой на наличие бактериального роста, о чем может свидетельствовать помутнение жидкой фазы среды, наличие хлопьевидного осадка, газообразование, образование пленки или лизис эритроцитов, часто изменения жидкой фазы среды сопровождаются ростом колоний на плотной фазе среды. При появлении этих признаков следует немедленно произвести пересев на плотную питательную среду для получения первичной культуры.

В связи с тем, что рост некоторых микроорганизмов не приводит к визуальным изменениям жидкой фазы питательной среды, рекомендуется выполнить посев на ША или ГБМ-агар на 4-й и 7-й день инкубации, даже несмотря на отсутствие признаков микробного роста во флаконе.

В случае обнаружения роста микроорганизмов в двухфазной питательной среде флакон вскрывают. Перед вскрытием флакона несколько раз прокручивают, чтобы перемешать его содержимое. Перед вскрытием флакона резиновую пробку флакона дезинфицируют с помощью тампона, пропитанного 70 % этиловым спиртом.

Из бульона или выросших на плотной фазе колоний готовят мазок, окрашенный по Граму. Содержимое флакона в количестве 0,2 – 0,5 мл с помощью стерильного шприца с иглой или стерильной пипетки засевают на чашку Петри с питательной средой. Пересев выросших на плотной фазе двухфазной среды колоний микроорганизмов осуществляется бактериологической петлей методом истончающегося посева для получения изолированных колоний. По результатам предварительной идентификации возбудителя после бактериоскопического исследования посев может осуществляться, помимо ША или ГБМ-агара, на дополнительные питательные среды, соответствующие предполагаемому возбудителю (например, КА, желточно-солевой агар, среда Эндо) (см. главу IX). Инкубирование посевов осуществляется при температуре плюс 35 – 37 °С, посевы на ША, КА и ГБМ-агар инкубируют в атмосфере, содержащей 5 – 10 % углекислого газа. При обнаружении в мазке СМЖ или крови дрожжеподобных грибов производят посев на среду Сабуро и инкубируют при температуре плюс 21 – 25 °С. Все посевы инкубируют в течение 72 часов, ежедневно просматривая на предмет наличия роста возбудителя.

При наличии роста на плотных питательных средах проводят визуальную оценку выросших колоний, готовят мазок по Граму, определяют оксидазу, каталазу, при наличии технических возможностей проводят идентификацию с использованием MALDI-TOF MS, и в зависимости от полученного результата проводят дальнейшую идентификацию возбудителя и определение чувствительности к АМП.

Макроскопическое исследование колоний

5.16. Предварительная идентификация *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* может быть проведена по результатам оценки роста и морфологии колоний на плотных питательных средах, а также окрашивания по Граму (таблица 1, рисунки 5 и 6).

Таблица 1

Предварительная идентификация *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* по результатам оценки роста на питательной среде для получения первичной культуры и окрашивания по Граму

Рост на ША	Рост на КА	Окрашивание по Граму	Предварительная идентификация
+	+	Грамотрицательные диплококки	<i>N. meningitidis</i>
+	+	Грамположительные диплококки	<i>S. pneumoniae</i>
+	–	Грамотрицательные плеоморфные коккобациллы	<i>H. influenzae</i>



Рисунок 5. Рост *N. meningitidis* в нижней левой и *S. pneumoniae* в верхней левой части КА. *H. influenzae* на КА не растет

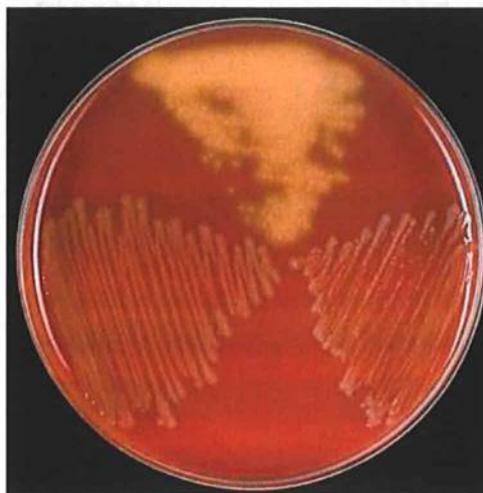


Рисунок 6. Рост *N. meningitidis* в нижней левой, *S. pneumoniae* в верхней и *H. influenzae* в нижней правой части ША

5.17. *N. meningitidis* проявляет следующие тинкториальные свойства:

- на 0,1 % полужидком СА менингококки вызывают интенсивное помутнение в верхней части столбика среды;

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

- на ША 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;

- на КА *N. meningitidis* формирует серые непигментированные колонии (рисунок 7), культуры старше 24 часов могут вызывать потемнение поверхности КА в зоне роста;

- на СА менингококки растут в виде полупрозрачных, нежных голубоватых колоний с ровными краями и гладкой блестящей поверхностью;

- на средах с добавлением желчи менингококки не растут.

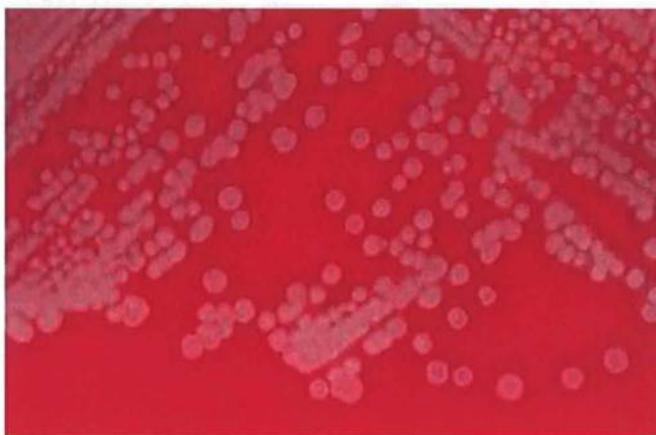


Рисунок 7. Колонии *N. meningitidis* на КА

5.18. Для суточной культуры *S. pneumoniae* характерна следующая морфология:

- на 0,1 % полужидком СА пневмококки растут в верхней части столбика среды с постепенным диффузным помутнением всего объема. При длительной инкубации выпадает хлопьевидный осадок;

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

- 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. На СА – мелкие (диаметром до 1 мм) прозрачные плоские колонии с центральным углублением. На КА – мелкие плоские прозрачные колонии, окруженные зеленым зоной α -гемолиза (рисунок 8). На ША вокруг колоний пневмококка питательная среда приобретает желтовато-зеленоватый цвет, что не является

истинным гемолизом, но также может служить дифференциальным признаком. На ГБМ-агаре в зоне роста *S. pneumoniae* происходит обесцвечивание питательной среды. Для колоний пневмококка старше 24 часов характерна уплощенная форма со вдавленной центральной частью (рисунок 9).

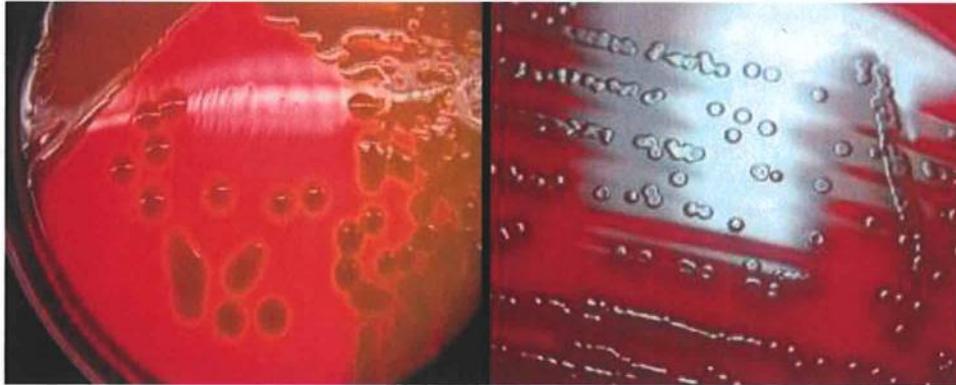


Рисунок 8. Колонии *S. pneumoniae* на КА

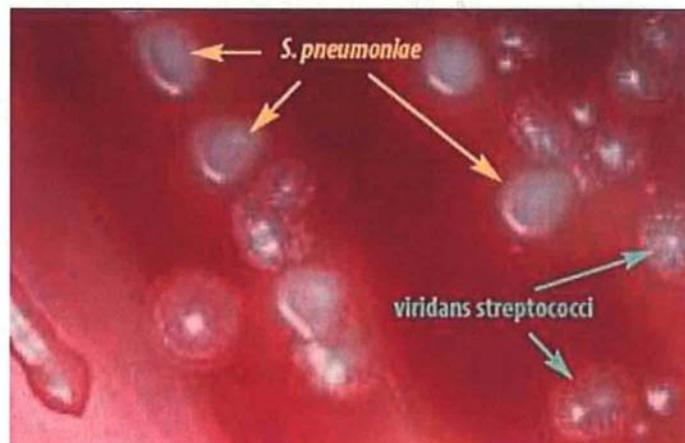


Рисунок 9. Колонии *S. pneumoniae* после 24 – 48 часов роста на КА имеют уплощенный вид и вдавленный центр, тогда как центральная часть колоний зеленеющего стрептококка остается приподнятой

5.19. *H. influenzae* проявляет следующие тинкториальные свойства:

- на сывороточных средах гемофильная палочка не растет, но на 0,1 % полужидком СА возбудитель может сохраняться в жизнеспособном состоянии до 48 часов;

- на «двухфазной» питательной среде отмечают рост на плотной фазе и отсутствие видимого роста в жидкой фазе среды;

- на ША *H. influenzae* растет в виде серых, слизистых, блестящих колоний с ровными краями, диаметром 0,2 – 2,0 мм. Колонии в R-форме мелкие, зернистые, с неровным краем, серовато-белого цвета (рисунок 10). Рост культуры часто сопровождается резким «мышинным» запахом (запах индола).

Рисунок 10. Колонии *H. influenzae* на ША

VI. ЛАБОРАТОРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Характеристика возбудителя

6.1. Менингококк (*N. meningitidis*) относят к семейству *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*, включенному (согласно «Определителю бактерий Берджи») в состав 4-й группы микроорганизмов, озаглавленной как «Грамотрицательные, аэробные/микроаэрофильные палочки и кокки». Морфологически клетка *N. meningitidis* имеет округлую форму и размеры порядка 0,6 – 1,0 мкм. В препаратах, приготовленных из жидкостей и органов пораженного организма *N. meningitidis* имеют парное расположение (диплококки), в форме кофейных зерен, которые могут встречаться внутри ПМЯ лейкоцитов или вне клеток. Менингококк неподвижен, спор не образует, жгутиков не имеет.

N. meningitidis – весьма прихотливый микроорганизм, который лучше всего растет при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа. При температуре ниже плюс 30 °С менингококк растёт плохо или вообще не растёт. Менингококк нуждается в высокопитательных средах, содержащих нативные белки или кровь животного происхождения (рисунок 11, 12). На средах с добавлением желчи менингококки не растут.

После множества пассажей на питательных средах лабораторные штаммы становятся менее прихотливыми к ростовым потребностям, чем свежие изоляты.

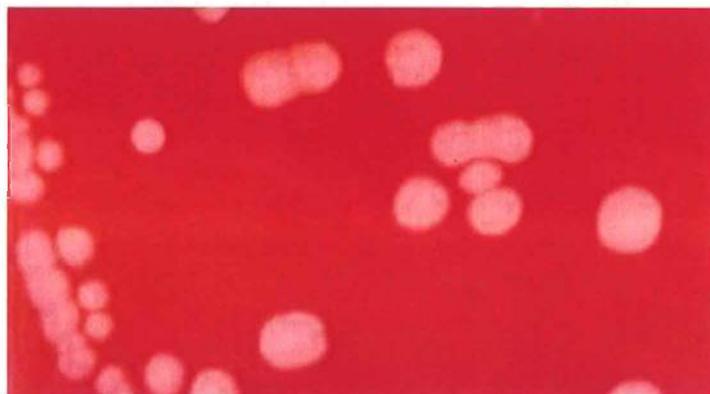
Рисунок 11. Колонии *N. meningitidis* на КА



Рисунок 12. Колонии *N. meningitidis* на ША

Антигенная структура менингококка сложна и включает капсульный полисахарид, липополисахарид, пили, белки наружной и внутренней мембран клеточной стенки. Менингококк может самостоятельно секретировать в окружающую среду ряд антигенов (например, иммуноглобулин А1 – протеаза), которые играют ведущую роль в формировании вирулентных свойств менингококка [2].

Биохимическая активность менингококка невелика: из углеводов он ферментирует только глюкозу и мальтозу с образованием кислоты без газа, не разжижает желатин, оксидазоположителен, каталазоположителен.

Штаммы *N. meningitidis* классифицируют по составу полисахарида на 12 серологических групп¹⁹: А, В, С, X, Y, Z, W, E, K, L, H, I, из которых только шесть (А, В, С, W, X, Y) отвечают за более чем 90 % случаев клинически выраженной ГФМИ. Штаммы менингококка серогрупп А, В, С, W, X, Y способны вызывать эпидемии и наиболее часто выделяются от больных ГФМИ. Другие серогруппы (Z и E) чаще выделяются из носоглотки носителей. Определение серогрупповой характеристики менингококка является важнейшей составляющей в системе эпидемиологического надзора за МИ. Существующие современные классификации менингококка по различным антигенным системам (например, белки, липополисахариды, пили) позволяют определять их популяционные особенности и отбирать наиболее иммуногенные компоненты для конструирования вакцинных препаратов нового поколения.

Для подтверждения принадлежности культур, морфологически соответствующих *N. meningitidis*, проводят тест на оксидазу и тест на утилизацию углеводов. Если тесты указывают на то, что изолят является *N. meningitidis*, следует провести серологические тесты для определения серогруппы. Метод идентификации и характеристики *N. meningitidis* с использованием молекулярных инструментов описаны в главе 10.

¹⁹ Примечание: на 18-й международной конференции по патогенным нейссериям (2012, Бюрцбург, Германия) специальным решением по номенклатуре в обозначении *N. meningitidis* серогрупп W-135 и 29E упразднены цифры, и по новой классификации их следует обозначать W и E соответственно.

Проведение теста на оксидазу

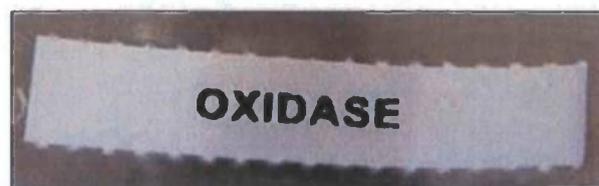
6.2. Для проведения теста на оксидазу могут быть использованы реактив Ковача (Kovac) – тетраметил-п-фенилендиамина дигидрохлорид (далее – тест Ковача), реагент Гордона и МакЛеода, реагент Нади, реагент Карпентера, Зурланда и Моррисона, а также коммерческие оксидазные диски и полоски, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке²⁰.

При проведении теста суточную культуру микроорганизма наносят одноразовой пластиковой петлей, стеклянной палочкой или деревянной зубочисткой (не допускается использование нихромовых или стальных петлей из-за возможной ложноположительной реакции) на сухую полоску, предварительно пропитанную реактивом для проведения оксидазного теста, или на коммерческую тест-полоску (диск). Учет результатов реакции проводят через 5 – 10 секунд после нанесения культуры микроорганизма. В случае положительной реакции происходит окрашивание фильтровальной бумаги или тест-полоски (диска) в синий или фиолетовый цвет за счет образования индофенола (см. рисунок 13). При отрицательной реакции изменения цвета не происходит.

Для проведения КК теста возможно использование музейных штаммов *P. aeruginosa* (положительный контроль) и *S. aureus* или *E. coli* (отрицательный контроль).



Положительный результат



Отрицательный результат

Рисунок 13. Тест Ковача на оксидазу: отрицательная и положительная реакция на фильтровальной бумаге

Утилизация углеводов *N. meningitidis*: метод с использованием цистин-триптиказного агара

6.3. Тесты на утилизацию углеводов используются для подтверждения того, что тестируемый штамм является именно *N. meningitidis*. Данный тест предусматривает добавление 4 разных углеводов (глюкоза, мальтоза, лактоза и сахароза) в цистин-триптиказный агар (далее – ЦТА) до достижения финальной концентрации 1%. В состав питательной среды входит кислотно-основной индикатор феноловый красный, который приобретает желтый цвет при значении

²⁰ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

pH ниже 6,8. Для тестирования каждого изолята используют блок из четырех пробирок с разными углеводами. *Neisseria spp.* образуют кислоту из углеводов путем окисления, а не сбраживания. *N. meningitidis* окисляет глюкозу и мальтозу, но не лактозу или сахарозу. Описаны редкие штаммы *N. meningitidis*, которые утилизировали глюкозу или мальтозу, но не одновременно оба данных углевода. Вместе с неизвестным изолятом необходимо тестировать стандартные тест-штаммы, рекомендованные инструкциями по применению питательных сред для КК, для подтверждения того, что исследование происходит надлежащим образом.

6.4. Проведение теста с сахарами на ЦТА.

6.4.1. Культивируйте изоляты для тестирования в течение 18 – 24 часов на КА или СА при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа.

6.4.2. Дайте четырем сахарам (глюкоза, мальтоза, лактоза и сахароза) нагреться до комнатной температуры (плюс 25 °С). Пометьте пробирки для добавления разных сахаров.

6.4.3. Возьмите 3 – 5 колоний с поверхности питательной среды с помощью одноразовой петли.

6.4.4. Произведите посев уколом, вводя петлю в верхние 10 мм столбика ЦТА с разными углеводами. Достаточно сделать приблизительно 8 уколов одной петлей. Используйте отдельные одноразовые иглы для инокуляции каждого тестируемого углевода.

6.4.5. Неплотно закрутите завинчивающиеся крышки пробирок (можно использовать ватно-марлевые, целлюлозные или резиновые пробки) и поместите пробирки в термостат при температуре плюс 35 – 37 °С. Инкубируйте пробирки с ЦТА и сахарами на протяжении, не менее 72 часов (и до 5 дней) перед тем, как отбросить их, констатировав отрицательный результат.

6.4.6. Наблюдайте за ЦТА с сахарами на предмет помутнения и окрашивания в желтый цвет.

6.4.7. Для КК проведите исследование (п.п. 6.4.1 – 6.4.5) с использованием известных (контрольных) штаммов *N. meningitidis*, *N. lactamica* и *N. sicca*, чтобы убедиться в том, что ЦТА с сахарами действуют надлежащим образом.

6.5. Интерпретация результатов теста на ЦТА с сахарами.

Заметное помутнение и окрашивание в желтый цвет верхней части питательной среды указывает на рост бактерий и выделение кислоты, и считается положительным результатом теста (рисунок 14). Хотя положительная реакция может обнаруживаться уже через 24 часа после инокуляции, в некоторых случаях реакция запаздывает, поэтому отрицательный результат определяют не менее чем после 72-х часов инкубирования. Пожелтение питательной среды без ее помутнения обычно положительной реакцией не является. Результаты утилизации углеводов, используемые для дифференцирования *N. meningitidis* от других *Neisseria spp.* и бактерий, перечислены в таблице 2.

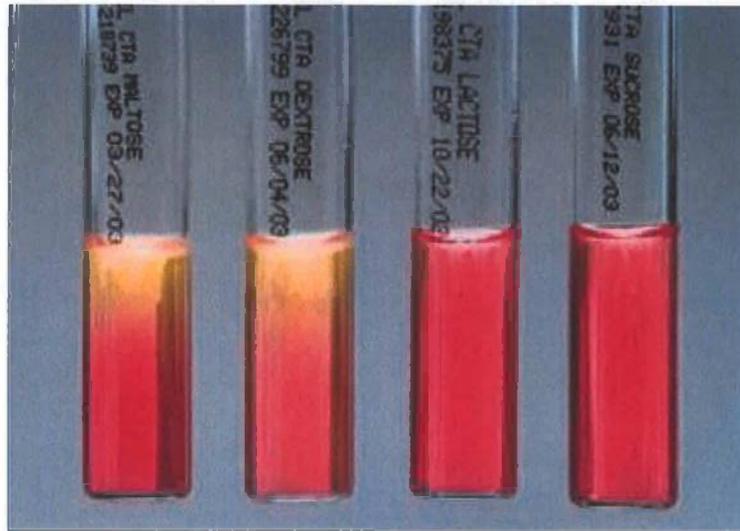


Рисунок 14. Реакции *N. meningitidis* на ЦТА с разными сахарами: утилизация глюкозы (декстрозы) и мальтозы, проявляющаяся продукцией кислоты (пожелтение раствора) и отсутствие утилизации лактозы или сахарозы

Таблица 2

Утилизация углеводов некоторыми *Neisseria* и *Moraxella spp*

Микроорганизм	Образование кислоты из:			
	Глюкоза	Мальтоза	Лактоза	Сахароза
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	+ ¹	-	-	-
<i>N. sicca</i>	+	+	-	+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	-

Примечание: ¹ – некоторые штаммы *N. gonorrhoeae* являются слабыми продуцентами кислоты и могут давать отрицательный результат на ЦТА с глюкозой.

Для идентификации *Neisseria spp.* существует несколько коммерчески доступных тест-систем, использующих биохимические и ферментные субстраты и позволяющих определить видовую принадлежность возбудителя. При использовании подобных наборов необходимо строго придерживаться инструкций производителя. Для уточнения биохимических свойств менингококка используют тест-системы, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке²¹.

Определение серогруппы *N. meningitidis*

6.6. Существуют коммерческие иммунные сыворотки, специфичные в отношении основных серогрупп (А, В, С, W, Y и X). На практике не всегда возможно провести тестирование на все серогруппы, для которых в лаборатории имеется иммунная сыворотка. В лабораториях может быть составлен алгоритм тестирования в соответствии с ранее накопленными знаниями о преобладании или отсутствии серогрупп в конкретном географическом регионе для того, чтобы в

²¹ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

первую очередь провести тесты на наиболее распространенные серогруппы. В алгоритм тестирования могут вноситься поправки на основании информации о текущих штаммах, циркулирующих в соответствующем регионе. Например, в Африке для определения большинства изолятов подходящим представляется тестирование с антисыворотками к серогруппам А и W (а также X в некоторых регионах), а также с использованием контрольного физиологического раствора для определения неспецифической агглютинации.

6.7. В Российской Федерации штаммы менингококка серогрупп А, В, С, W наиболее часто являются причиной возникновения ГФМИ. Поэтому в первую очередь с антисыворотками к штаммам этих серогрупп выполняют реакцию агглютинации. Штаммы, показавшие отрицательный результат в тестах с антисывороткой к полисахаридам серогрупп А, В, С, W, далее тестируют с другими доступными иммунными сыворотками, X и Y. Почти все изоляты, выделенные от больных ГФМИ (СМЖ, кровь), поддаются определению серогруппы при условии тестирования с использованием полного набора антисывороток и надлежащего контроля. Изредка встречаются изоляты, которые не реагируют ни с одной из иммунных сывороток или реагируют с несколькими из них и классифицируются как не поддающиеся зачислению в какую-либо группу (англ. nongroupable, далее – NG). Также может использоваться поливалентная иммунная сыворотка, содержащая комбинацию антител к полисахаридам нескольких серогрупп (например, А, В и С, или X, Y, W и Z).

6.8. Проведение реакции агглютинации на стекле (далее – РАС) для определения серогруппы изолятов *N. meningitidis*.

6.8.1. Культивируйте изоляты для тестирования в течение 18 – 24 часов на КА при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере 5 – 10 % углекислого газа. Реакцию проводят только с чистой культурой менингококка, прошедшей все этапы идентификации.

6.8.2. Очистите предметное стекло спиртом (также возможно использование предварительно очищенных стекол). Предметное стекло необходимо положить на дно чашки Петри для исключения аварийной ситуации, или проводить реакцию на дне стеклянной чашки Петри.

6.8.3. Разделите стекло на равные секции (например, на секции размером 11 – 22 мм на стандартном предметном стекле размерами 50 – 75 мм) с помощью жидкого водостойкого маркера или воскового карандаша.

Количество секций на предметном стекле для каждого изолята должно быть достаточным для тестирования всех имеющихся иммунных сывороток, а также отрицательного контроля (физиологический раствор).

6.8.4. С помощью микропипетки нанесите на нижнюю часть каждой секции, обозначенной на предметном стекле, по 10 мкл физиологического раствора.

В случае отсутствия микропипеток и наконечников, для переноса 10 мкл раствора могут использоваться одноразовые 10-мкл бактериологические петли, но они часто отмеривают неточный объем (в пределах 5 – 10 мкл).

6.8.5. С помощью стерильной одноразовой 10-мкл бактериологической петли соберите несколько колоний с поверхности КА после инкубации.

6.8.6. Суспендируйте бактерии в физиологическом растворе в нижней части каждой секции на предметном стекле. Не допускайте высыхания клеточной суспензии до добавления антисыворотки.

Если бактерии сложно перевести в состояние взвеси непосредственно на предметном стекле, приготовьте умеренно белесоватую суспензию (сопоставимую со стандартом мутности 6 по шкале Макфарланда [McFarland]) или тестируемой культуры в емкости с 250 мкл физиологического раствора и в течение 3 – 5 секунд перемешайте ее на лабораторном вихревом смесителе, чтобы разбить возможные сгустки. Нанесите 10 мкл данной суспензии в нижнюю часть секций на стекле.

6.8.7. С помощью микропипетки нанесите на верхнюю часть секций, обозначенных на предметном стекле, по 10 мкл специфических иммунных сывороток, а также физиологического раствора или фосфатно-буферного солевого раствора в качестве отрицательного контроля.

В случае отсутствия микропипеток и наконечников, для переноса 10 мкл антисыворотки могут использоваться одноразовые 10 – мкл бактериологические петли, но они часто отмеривают неточный объем (в пределах 5 – 10 мкл).

Выбрасывайте наконечник или бактериологическую петлю, использовавшуюся для переноса иммунной сыворотки, после каждого использования, чтобы предотвратить загрязнение сосуда с антисывороткой. Загрязненную посуду с антисывороткой следует заменить новой.

6.8.8. Слегка наклоните предметное стекло, чтобы смешать суспензию с иммунной сывороткой в каждой секции. Продолжайте слегка покачивать предметное стекло в течение 1 – 2 минут, чтобы добиться полного слияния содержимого нижней и верхней части секций. Не покачивайте стекло круговыми движениями, поскольку при этом возможно смешивание содержимого секций, содержащих разные антисыворотки, и их взаимное загрязнение.

6.8.9. Через 2 минуты оцените реакции при ярком свете, расположив их на черном фоне. Для оценки интенсивности агглютинации в каждой секции воспользуйтесь системой оценок, представленной на рисунке 15. Игнорируйте любую агглютинацию, которая происходит по истечении 2-минутного периода.

6.8.10. Зафиксируйте результаты РАС в лабораторном журнале.

6.9. Интерпретация результатов РАС

6.9.1. Оценка интенсивности реакции агглютинации.

Агглютинация происходит при связывании антител иммунной сыворотки с бактериальными клетками. В результате происходит агглютинация (образование комков) клеток, и клеточная суспензия становится прозрачной. Интенсивность реакции агглютинации может варьировать в зависимости от густоты клеточной суспензии и использовавшейся антисыворотки. Агглютинация подразделяется на 6 категорий интенсивности (рисунок 15):

1) 4+ агглютинации подверглись все клетки и клеточная суспензия выглядит прозрачной;

2) 3+ агглютинации подверглись 75 % клеток, и клеточная суспензия остается немного мутной;

3) 2+ агглютинации подверглись 50 % клеток и клеточная суспензия остается немного мутной;

4) 1+ агглютинации подверглись 25 % клеток и клеточная суспензия остается немного мутной;

5) +/- агглютинации подверглись менее 25 % клеток, и в растворе обнаруживается мелкозернистое вещество;

6) 0 отсутствие видимой агглютинации, суспензия остается мутной и однородной.

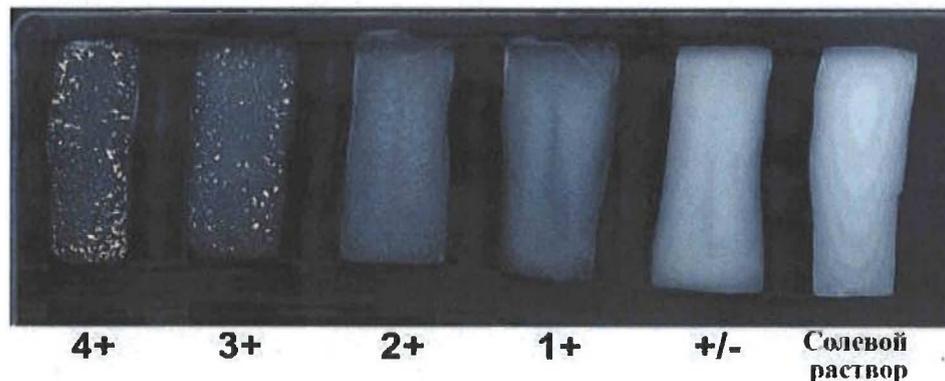


Рисунок 15. Оценка интенсивности реакции агглютинации

6.9.2. Определение серогруппы.

Положительным результатом считается агглютинация со степенью интенсивности 3+ или 4+ (сильная агглютинация), произошедшая в течение 1–2 минут, за исключением серогруппы В, для которой положительным результатом считается реакция агглютинации категории 2+ или выше.

Отрицательным результатом считается агглютинация со степенью интенсивности 0 (физиологический раствор), +/-, 1+ или 2+ (слабая агглютинация).

Серогруппу определяют только в случаях, когда положительная реакция наблюдается лишь с одной иммунной сывороткой, и отсутствует в секции с физиологическим раствором.

Если определить серогруппу не удалось, изоляту присваивают статус «негруппируемый» (не относимый к какой-либо группе). Статус «негруппируемый» присваивают в следующих случаях:

- агглютинация в секции с физиологическим раствором, независимо от интенсивности реакций с другими антисыворотками, свидетельствует об аутоагглютинации культуры;

- агглютинация с несколькими иммунными сыворотками в отсутствие агглютинации с физиологическим раствором характеризует культуру как полиагглютинирующую или обладающую перекрестной реактивностью;

- при отсутствии агглютинации с какой-либо иммунной сывороткой или физиологическим раствором культура считается инактивной (нераагирующей).

6.10. КК иммунной сыворотки для РАС. Перед тестированием неизвестных изолятов для КК иммунной сыворотки следует использовать набор стандартных штаммов *N. meningitidis*, относящихся к серогруппам А, В, С, W, X, Y, Z, Е (по одному на серогруппу), а также штамм *N. meningitidis*, не относимый к какой-либо конкретной группе. В качестве контроля могут быть использованы стандартные тест-штаммы, рекомендованные инструкциями по применению питательных сред для КК и тест систем. Процедура КК иммунных сывороток:

- проводится с каждой новой партией иммунной сыворотки, поступающей в лабораторию;

- проводится два раза в год после исходного КК;

- повторяется в случае, если партия подверглась воздействию температур выше плюс 4 °С, или при подозрении на загрязнение после исходного КК.

РАС проводят для КК каждой партии иммунной сыворотки, используя все стандартные штаммы, имеющиеся в лаборатории. Результаты РАС фиксируют в протоколе КК (см. таблицу 3).

6.11. Интерпретация результатов процедуры КК. Критерии успешного прохождения теста:

- иммунная сыворотка при смешивании с гомологичным антигеном в течение 1 – 2 минут должна обеспечить агглютинацию категории 3+ или 4+.

- иммунная сыворотка не должна реагировать с антигенами других серогрупп *N. meningitidis*, штаммом, не относимым к какой-либо серогруппе (негруппируемым штаммом), или физиологическим раствором.

Критерии непрохождения теста:

- иммунная сыворотка агглютинирует с одним или несколькими стандартными штаммами, и (или) со стандартным негруппируемым штаммом, и (или) с физиологическим раствором.

Пример протокола КК для тестирования иммунных сывороток ко всем серогруппам *N. meningitidis* представлен в таблице 3.

Таблица 3

**Пример протокола КК для тестирования иммунных сывороток
ко всем серогруппам *N. meningitidis***

	А (номер штамма)	В (номер штамма)	С (номер штамма)	W (номер штамма)	Х (номер штамма)	У (номер штамма)	Z (номер штамма)	Е (номер штамма)	NG (номер штамма)
А Партия №	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
В Партия №	-	++++	-	-	-	-	-	-	-
С Партия №	-	-	++++	-	-	-	-	-	-
W Партия №	-	-	-	++++	-	-	-	-	-
Х Партия №	-	-	-	-	++++	-	-	-	-
У Партия №	-	-	-	-	-	++++	-	-	-
Z Партия №	-	-	-	-	-	-	++++	-	-
Е Партия №	-	-	-	-	-	-	-	++++	-
Физиологический р-р	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Лабораторным подтверждением ГФМИ является:

- обнаружение в нативном материале диплококков с характерными морфологическими признаками;

- характерный рост только на высокопитательных средах;

- типичная морфология культурального мазка по Граму (грам-кокки);

- сахаролитическая активность в отношении глюкозы и мальтозы;

- выявление серогрупповой характеристики;

- обнаружение специфических антигенов в ликворе и (или) сыворотке крови в реакциях латекс-агглютинации и ДНК менингококка в ПЦР (см. главу X);

- детекция четырехкратного нарастания титров специфических антител в сыворотках крови, взятых на 1-й и на 12 – 14 день болезни в реакции РПГА (см. главу X).

VII. ЛАБОРАТОРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПНЕВМОКОККОВОГО МЕНИНГИТА

Характеристика возбудителя

7.1. Пневмококк (*S. pneumoniae*) (согласно «Определителю бактерий Берджи») относится к роду *Streptococcus*, семейству *Streptococcaceae*, порядку *Lactobacillaceae*, классу *Bacilli*, типу *Firmicutes*. Пневмококк – это овальный, иногда вытянутый вдоль оси ланцетовидный кокк диаметром 0,5 – 1,0 мкм, клетки располагаются парами и окружены общей капсулой. *S. pneumoniae* может встречаться внутриклеточно или внеклеточно в виде грамположительных ланцетных диплококков, но также может встречаться в виде одиночных кокков или коротких цепочек кокков. Строение клеточной стенки пневмококка 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.

S. pneumoniae – прихотливая бактерия, лучше всего растущая при температуре плюс 35 – 37 °С и атмосфере 5 – 10 % углекислого газа, однако только для 8 % клинических изолятов повышенное содержание углекислого газа является обязательным условием для роста [3]. Обычно его культивируют на средах, содержащих кровь. На КА колонии *S. pneumoniae* выглядят как мелкие, серые или прозрачные, влажные (иногда мукоидные) колонии, не склонные к слиянию, и характерно образуют зону α -гемолиза вследствие разрушения эритроцитов и превращения гемоглобина в метгемоглобин (рисунок 16). Колонии склонны к аутолизу, что связано с активностью внутриклеточных ферментов. Альфа-гемолитическое свойство отличает этот организм от многих видов, но не от комменсальных альфа-гемолитических (*viridans*) стрептококков. Отличить пневмококки от зеленающих стрептококков сложно, так как молодые пневмококковые колонии кажутся приподнятыми, как у зеленающих стрептококков. Однако, как только пневмококковая культура состарится в течение 24 – 48 часов, колонии уплощаются, а центральная часть становится вдавленной, чего не происходит с комменсальными альфа-гемолитическими стрептококками.

Капсула пневмококка является основным фактором вирулентности, защищающим микроб от опсонизации и последующего фагоцитоза. Некапсулированный штамм авирулентен. Среди других факторов патогенности наибольшее значение имеет уровень активности гиалуронидазы, пневмолизина, гемолизина и др. На выявлении специфического набухания капсулы возбудителя основана экспресс-диагностика пневмококка в патологическом материале с использованием поливалентной иммунной сыворотки (реакция Нейфельда). После нанесения поливалентной сыворотки на исследуемый материал при микроскопии

отмечают значительное увеличение капсулы пневмококка по сравнению с контролем.

По капсульному антигену также проводят типоспецифическую дифференцировку пневмококка. Существует по крайней мере 97 зарегистрированных клинических серотипов [4]. Серотиповой пейзаж пневмококка зависит от географической области, климатических условий, возраста больных, вида патологии и со временем может меняться.

S. pneumoniae можно идентифицировать с помощью одновременного окрашивания по Граму, теста на каталазу, теста с оптохином и теста с желчью. Если эти тесты показывают, что изолят представляет собой *S. pneumoniae*, можно провести серологические тесты для определения серотипа. Методы идентификации и характеристики *S. pneumoniae* с использованием молекулярных инструментов описаны в главе 10.



Рисунок 16. Колонии *S. pneumoniae* с окружающей зеленой зоной альфа-гемолиза (черная стрелка) на КА

Тест на каталазу

7.2. Каталаза – это фермент, расщепляющий перекись водорода на воду и кислород. Кислород выделяется в виде пузырьков в жидкости. Каталазный тест в основном используется для дифференциации грамположительных кокков. Представители рода *Staphylococcus* каталазоположительны, а представители родов *Streptococcus* и *Enterococcus* каталазоотрицательны.

Проведение теста на каталазу:

1) культивируйте исследуемые изоляты в течение 18 – 24 часов на КА при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере 5 – 10 % углекислого газа;

2) с помощью одноразовой пластиковой петли, инокуляционной петли или лопаточки возьмите часть колонии с поверхности питательной среды и поместите на предметное стекло;

3) добавьте на предметное стекло каплю 3 % раствора перекиси водорода и смешайте с нанесенной на стекло культурой. После первого открытия храните перекись водорода при температуре плюс (5±3) °С в плотно закрытой емкости, так как после открытия она будет медленно терять свою активность;

4) немедленно осмотрите бактериальную суспензию на предметном стекле на наличие сильного пузырения;

5) необходимо использовать известные штаммы в качестве положительного и отрицательного контроля. Штаммы *Staphylococcus* spp. можно использовать в качестве положительного контроля, а известный штамм *S. pneumoniae* или любой другой вид стрептококка, например, *S. pyogenes*, можно использовать в качестве отрицательного контроля. В качестве контроля могут быть использованы тест-штаммы, рекомендованные нормативными документами или инструкциями по применению производителей питательных сред для КК.

Интерпретация результатов теста на каталазу:

- отсутствие пузырьков из перенесенной колонии указывает на отрицательный результат теста;

- любое выделение пузырьков из перенесенной колонии указывает на положительный результат теста (рисунок 17).

КК.

Важно использовать известный положительный и отрицательный штамм. Вскрытые флаконы следует проверять на известных каталазоположительных организмах каждые 6 месяцев.

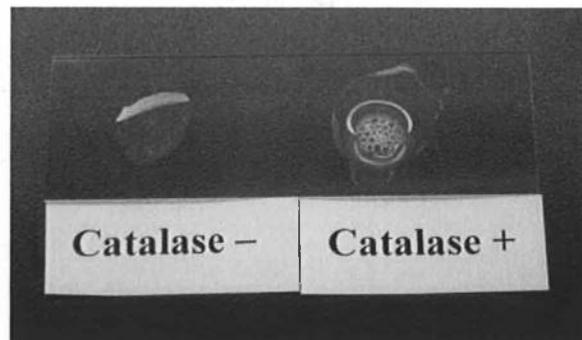


Рисунок 17. Отрицательные и положительные результаты теста на каталазу. Отсутствие пузырения указывает на отрицательный тест. Все стрептококки каталазоотрицательны

Тест с оптохином

7.3. Штаммы *S. pneumoniae* чувствительны к оптохину (гидрохлориду этилгидрокупрена). Чувствительность к оптохину позволяет предположительно идентифицировать альфа-гемолитические стрептококки как *S. pneumoniae*, хотя некоторые штаммы пневмококка устойчивы к оптохину. Другие виды альфа-гемолитических стрептококков устойчивы к оптохину.

Выполнение оптохинового теста. Диски Optochin (P) (6 мм, 5 мкг) часто называют «Р-дисками», и многие коммерческие версии помечены заглавной «Р». Если коммерческие Р-диски недоступны, раствор 1:4000 оптохина можно нанести на стерильные 6-миллиметровые диски из фильтровальной бумаги. Оптохиновый тест состоит из 4 этапов:

1) культивируйте исследуемые изоляты в течение 18 – 24 часов на КА при температуре плюс 35 – 37 °С с 5 – 10 % углекислого газа.

2) используйте одноразовую петлю, чтобы взять изолированную колонию с КА после инкубации и осуществите посев штрихом одной половины КА. Два разных изолята можно тестировать на одной и той же чашке, но необходимо следить за тем, чтобы культуры не перекрывались;

3) поместите Р-диск в отмеченную штрихом область на чашке и инкубируйте КА в течение ночи при температуре плюс 35 – 37 °С с 5 – 10 % углекислого газа.

4) просмотрите рост на КА возле Р-диска и измерьте зону ингибирования.

Интерпретация результатов оптохинового теста:

- при использовании диска диаметром 6 мм и нагруженностью 5 мкг зона ингибирования размером 14 мм или более свидетельствует о чувствительности и позволяет предположительно идентифицировать пневмококк (рисунок 18);

- зоны подавления роста следует измерять при снятой крышке чашки;

- для этих измерений используют штангенциркуль или линейку с прикрепленной ручкой. Если изолят полностью устойчив к оптохину, регистрируют диаметр зоны подавления роста как равный диаметру диска (6 мм).

КК.

Каждая новая партия оптохиновых дисков должна пройти тестирование с положительным и отрицательным контролем. Рост штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619 ингибируется оптохином, а рост штамма *S. mitis* ATCC 49456 оптохином не ингибируется.

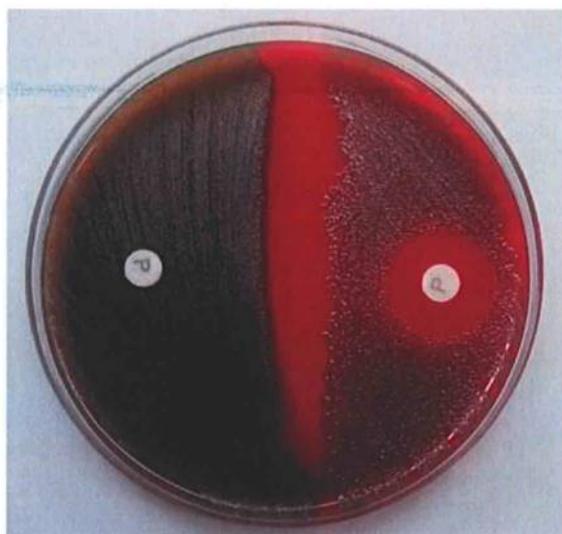


Рисунок 18. Оптохиновый тест на *S. pneumoniae* с использованием оптохиновых дисков. Штамм слева – *S. mitis*, устойчивый к оптохину без зоны ингибирования. Штамм справа чувствителен к оптохину и представляет собой *S. pneumoniae*

Чувствительность к желчным кислотам

7.4. Клеточная стенка пневмококка лизируется в присутствии желчных кислот. Тест на растворимость в желчи (и дезоксихолате натрия) отличает *S. pneumoniae* от всех других альфа-гемолитических стрептококков. *S. pneumoniae* растворяется в желчи (и дезоксихолате натрия), тогда как все другие альфа-гемолитические стрептококки желчеустойчивы. Чувствительность к желчным кислотам можно определить с помощью желчного теста или дезоксихолатной пробы.

Желчный тест:

1) исследуемые изоляты культивируют в течение 18 – 24 часов на КА при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере 5 – 10 % углекислого газа;

2) на выросшую культуру *S. pneumoniae* накладывают бумажный диск, содержащий 20 % раствор желчи крупного рогатого скота;

3) чашку инкубируют в термостате 1 – 2 часа при температуре плюс 35 – 37 °С;

4) вокруг диска с желчью появляется зона лизиса (1 – 2 мм) колоний (рисунок 5 приложения 4 к настоящим МУК). Другие стрептококки к воздействию желчи устойчивы. Диски не стандартизированы по содержанию желчных кислот, поэтому к результатам теста следует относиться с осторожностью.

Дезоксихолатная проба:

1) исследуемые изоляты культивируют в течение 18 – 24 часов на КА при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере 5 – 10 % углекислого газа;

2) используют 10 % 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»;

3) в пробирку «тест» следует добавить 3 – 4 капли 10 % раствора дезоксихолата натрия, в пробирку «контроль» – 3 – 4 капли 0,9 % хлорида натрия. Пробирки встряхивают и помещают на 1 – 2 часа в термостат при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере 5 – 10 % углекислого газа;

4) пробирки осматривают на отсутствие помутнения через 10 минут. Если через 10 минут результат будет отрицательным, то пробирки продолжают инкубировать в тех же условиях в течении 2 часов;

5) просветление (снижение мутности) жидкости в пробирке «тест» по сравнению с пробиркой «контроль» свидетельствует о принадлежности культуры к *S. pneumoniae* (рисунок 19).

6) каждая новая партия дезоксихолата натрия должна тестироваться с положительными и отрицательными контрольными штаммами. Штамм *S. pneumoniae* ATCC 49619 можно использовать в качестве положительного контроля, а штамм *S. mitis* ATCC 49456 можно использовать в качестве отрицательного контроля.

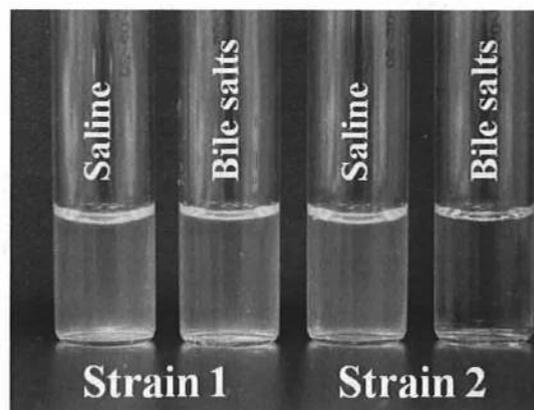


Рисунок 19. Результаты теста на растворимость в желчи показаны для двух разных штаммов бактерий. Для штамма 1 в пробирке с желчными солями наблюдается небольшое снижение мутности (2-я слева), но содержимое почти такое же мутное, как и в контрольной пробирке (крайняя слева); следовательно, штамм 1 не является *S. pneumoniae*. Для штамма 2 вся мутность в пробирке с солями желчных кислот (крайняя справа) рассеялась, что указывает на лизис клеток, в отличие от контрольной пробирки (2-я справа), которая остается мутной; следовательно, штамм 2 – это *S. pneumoniae*

Определение капсулярных серотипов *S. pneumoniae* с помощью серологических методов

7.5. Современные эффективные поливалентные вакцины нацелены на комбинации ключевых серотипов. Определение распределения серотипов, связанных с заболеванием в определенных регионах, дает информацию о потенциальной полезности применения существующих вакцин, а также имеет решающее значение для оценки воздействия вакцин. Распределение серотипов можно определить с помощью посева микроорганизма с последующим серологическим определением капсулярного типа путем латекс-агглютинации и реакции набухания клеточной стенки (реакция Нейфельда).

Для идентификации *S. pneumoniae*, а также определения серотипа пневмококка, доступны коммерческие тест-системы, которые используют тесты агглютинации на предметных стеклах. В этих идентификационных тестах используются суспензии латексных частиц с кроличьими антителами, специфичными к капсулярным антигенам *S. pneumoniae*. Видимая агглютинация происходит, когда капсулярный антиген *S. pneumoniae* реагирует с латексными частицами, покрытыми антителами. При использовании этих наборов необходимо точно следовать инструкциям производителя. Эти наборы следует регулярно подвергать КК с использованием непневмококковых стрептококков, поскольку они могут стать перекрестно-реактивными при длительном хранении.

Лабораторным подтверждением пневмококкового менингита является:

- обнаружение в нативном материале (ликвор и(или) кровь) диплококков, окруженных капсулой;
- рост на средах, содержащих кровь с образованием альфа-гемолиза;
- характерная морфология культурального мазка по Граму (грам + кокки);
- положительная проба с оптохином;
- чувствительность к желчным кислотам;
- выявление специфического антигена в реакции латекс-агглютинации и ДНК пневмококка в ПЦР (см. главу X).

VIII. ЛАБОРАТОРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ГЕМОФИЛЬНОГО МЕНИНГИТА

Характеристика возбудителя

8.1. Согласно «Определителю бактерий Берджи» гемофильную палочку (*H. 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 видов *Haemophilus*, причем только 2 из них – *H. influenzae* и *H. duckreyi* – являются патогенами человека.

8.2. Гемофильная палочка – небольшие (0,3 – 0,4 x 1 – 1,5 мкм) грамотрицательные, сферические, овальные и палочковидные клетки. Иногда образуют нитеподобные цепочки и имеют заметный полиморфизм, особенно в материале от больных, которые получали бета-лактамы АМП. Неподвижна, спор

не образует, медленно окрашивается анилиновыми красителями. Каталазоположительна. Оксидазоположительна.

8.3. Большинство видов *Haemophilus* при культивировании требуют присутствия в питательной среде факторов роста X и(или) V. Фактором роста X является железосодержащий протопорфирин IX, он термостабилен и остается активным в проавтоклавирированных питательных средах. Кровь, кристаллический гемин или гематин являются полноценными источниками этого фактора роста. Фактором роста V могут служить такие пиридиннуклеотиды, как никотинамид мононуклеотид, никотинамидрибозид, никотинамидгипоксантидинуклеотид (деамино-НАД), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), но чаще всего в питательных средах используют никотинамидадениндинуклеотид (далее – НАД). Фактор V синтезируется рядом бактерий (например, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Neisseria*) 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 таблице 4.

Таблица 4

Биохимические свойства различных видов рода *Haemophilus*

Вид	гемолиз	каталаза	оксидаза	порфириновый тест	потребность в факторах роста	Образование кислоты из:				
						глюкозы	фруктозы	сахарозы	лактозы	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. sequis</i>	-	+	-	+	V	+	+	+	-	-
<i>H. ducreyi</i>	-	+	+	-	X	-	-	-	-	-

8.4. Стандартной средой, используемой для роста *H. influenzae*, является ША, которую можно приготовить из подвергнутой нагреванию лошадиной крови, являющейся хорошим источником как гемина, так и НАД, хотя также можно использовать баранью кровь. В процессе нагревания также инактивирует ингибиторы роста.

8.5. На ША *H. influenzae* выглядят как серые, слизистые, блестящие колонии (рисунок 20). Инкапсулированные штаммы кажутся более слизистыми, чем неинкапсулированные штаммы, которые выглядят как более мелкие компактные серые колонии. Изменения цвета среды в зоне роста колоний не происходит. Не рекомендуется открывать чашки для того, чтобы почувствовать резкий запах культур *H. influenzae*.



Рисунок 20. Колонии *H. influenzae* на ША

8.6. *H. influenzae* можно идентифицировать с помощью оксидазного теста (см. п. 6.2) и определения необходимости гемина и НАД в качестве требований роста. Если тест на оксидазу положительный, следует провести тест на потребность в факторах роста (гемине и НАД).

8.7. В зависимости от состояния популяции на питательных средах капсульные штаммы *H. influenzae* формирует слизистые М-колонии (сочные, сероватые, с радужной окраской в проходящем свете) или блестящие S-колонии (полупрозрачные). Бескапсульные штаммы на плотных средах формируют очень мелкие R-колонии (с неровным краем, без радужной окраски в проходящем свете, серовато-белого цвета). Капсульные штаммы *H. 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 *H. influenzae* типа b, так как вызывает тяжелейшие менингиты, сепсис, пневмонии и другие инфекционные заболевания. Капсульный антиген *H. influenzae* типа b состоит из полирибозилрибитолфосфата (англ. PRP, далее – ПРФ). Определение метаболизма индола, уреазы и орнитиндекарбоксилазы (ОДС) является необходимым условием для биотипирования *H. influenzae*, которое позволяет определить биотип с I по VIII. Методы идентификации и характеристики *H. influenzae* с использованием молекулярных инструментов описаны в главе 10.

Идентификация на основе определения факторов роста – гемина и НАД

8.8. *H. influenzae* может быть идентифицирована на основе определения потребности в факторах роста – гемина и НАД. *H. influenzae* в отличие от большинства других видов *Haemophilus* нуждается как в гемине, так и в НАД. Аналогичными потребностями в гемине и НАД обладает *H. haemolyticus*, но в отличие от *H. influenzae* вызывает бета-гемолиз на средах с лошадиной или кроличьей кровью. Окончательная идентификация *H. influenzae* и *H. haemolyticus* с использованием только биохимических тестов является очень сложной

процедурой, и для дифференциации необходимо использовать другие методы, такие как молекулярное тестирование.

8.9. Выполнение теста на потребность в факторах роста (гемина и НАД) с использованием бумажных дисков и (или) полосок. Потребность в факторе роста можно определить с помощью бумажных дисков и (или) полосок, используя принципы диффузии в агар:

1) культивируйте исследуемые изоляты в течение 18 – 24 часов на ША при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере 5 – 10 % углекислого газа;

2) приготовьте умеренно густую суспензию клеток (сравнимую со стандартом МакФарланда 1,0) из выросшей культуры с чашки после инкубации в подходящем бульоне (триптиказо-соевый, сердечный или пептонная вода) и хорошо перемешайте с помощью лабораторного вихревого смесителя;

3) с помощью стерильной петли или тампона инокулируйте одну половину чашки с триптиказо-соевым агаром (англ. Trypticase Soy Agar, далее – TSA, см. п. 1.3 приложения 1 к настоящим МУК) 10 мкл клеточной суспензии и дайте суспензии высохнуть. Два разных изолята можно тестировать на одной и той же чашке, но необходимо следить за тем, чтобы культуры не перемешались;

4) поместите бумажные диски или полоски, содержащие гемина, НАД и гемина/НАД, на засеянную чашку после высыхания инокулята. При тестировании двух бактериальных штаммов на одной и той же чашке (рисунок 21) диски должны быть размещены точно так, как показано: разделите диски гемина, НАД-диски, и диски, содержащие оба фактора;

5) выполните шаги 1–4, используя *H. influenzae* и другой штамм *Haemophilus spp.*, чтобы убедиться, что диски или полоски с гемином и НАД работают правильно;

6) осторожно переверните чашку и инкубируйте в течение 18 – 24 часов при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере 5 – 10 % углекислого газа;

7) наблюдайте рост вокруг бумажных дисков или полосок.

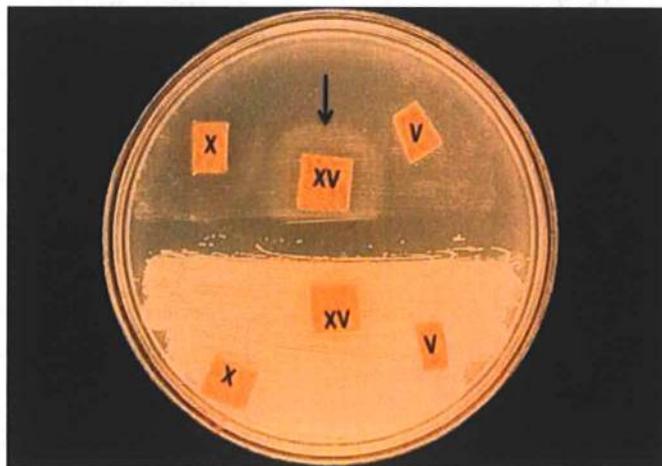


Рисунок 21. Идентификация гемина (X-фактор) и НАД (V-фактор) в качестве потребности роста с использованием бумажных дисков. Верхний штамм растет только вокруг диска, содержащего как гемина, так и НАД (черная стрелка), и предположительно идентифицируется как *H. influenzae*

8.10. Интерпретация теста на потребность в факторах роста гемина и НАД:

- *H. influenzae* будет расти только вокруг бумажного диска, содержащего как гемин, так и НАД, как показано на рисунке 21 в верхней половине чашки (см. черную стрелку).

- *H. haemolyticus* также будет расти только вокруг бумажного диска, содержащего как гемин, так и НАД. Чтобы различить эти два вида, необходимо проверить гемолиз на КА с лошадиной кровью или кровью кролика путем инокуляции клеточной суспензии, упомянутой выше, на агаре с 5 % кроличьей или лошадиной кровью.

- другие виды *Haemophilus*. будет расти вокруг диска, содержащего как гемин, так и НАД, и либо отдельного гемина, либо диска НАД.

8.11. Для идентификации *Haemophilus spp.* доступно несколько коммерческих систем идентификации, в которых используются биохимические или ферментативные субстраты. Для этих систем могут потребоваться дополнительные тесты, и необходимо учитывать дополнительные характеристики, такие как микроскопия и морфология колоний. Каждая система автономна, но может потребоваться добавление одного или нескольких реагентов для завершения определенных реакций. При использовании этих наборов необходимо точно следовать инструкциям производителя. Сахаролитическая и ферментативная активность *H. influenzae* отличается непостоянством. Из целого ряда сахаров *H. influenzae* утилизирует глюкозу с образованием кислоты. Для биохимической идентификации используют тест-системы, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке²². Использование некоторых наборов позволяет проводить полное биохимическое тестирование культуры в течение 2-х часов с определением биотипа возбудителя.

8.12. Некоторые коммерческие наборы для идентификации включают биотипирование *H. influenzae*. Биотипирование позволяет определить популяционные различия штаммов и методически основано на выявлении трех продуктов метаболизма микробной клетки: уреазы, индола и орнитиндекарбоксилазы (таблица 5).

Таблица 5

Биотипирование *H. influenzae*

Биотип	Индол	Уреаза	Орнитиндекарбоксилаза
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

Лабораторным подтверждением гемофильного менингита является:
- обнаружение в нативном ликворе нежных полиморфных палочек;

²² Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

- рост только на средах, содержащих X и V факторы роста (например, ША, GC агар, Гемофилус агар, ГБМ-агар);
- характерная морфология культурального мазка, окрашенного по Граму (грамотрицательные палочки);
- положительная сахаролитическая активность в отношении глюкозы;
- выявление потребности в X и V факторах роста;
- детекция специфических H1b-антигенов в реакции латекс-агглютинации и ДНК гемофильной палочки в ПЦР (см. главу X).

IX. ЛАБОРАТОРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ГНОЙНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕНИНГИТА, ОБУСЛОВЛЕННОГО ПРОЧИМИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ

9.1. ГБМ, при определенных условиях, может вызвать практически любой патогенный и условно-патогенный микроорганизм. Наиболее значимые возбудители «прочих» менингитов, распределенные по частоте встречаемости в этиологии ГБМ, приведены в таблице 6.

Таблица 6

Наиболее распространенные прочие возбудители гнойных бактериальных менингитов

Менингит	Этиологический фактор	Ранг	Возбудитель менингита
Стафилококковый	<i>Staphylococcus spp</i>	I	<i>S. aureus</i>
			<i>S. epidermidis</i>
Стрептококковый	<i>Streptococcus spp</i>	II	<i>S. agalactiae</i>
			<i>S. pyogenes</i>
Энтерококковый	<i>Enterococcus spp</i>	III	<i>E. faecalis</i>
Кишечной палочки	<i>Escherichia spp</i>	IV	<i>E. coli</i>
Клебсиеллезный	<i>Klebsiella spp</i>	V	<i>K. pneumoniae</i>
Псевдомонадный	<i>Pseudomonas spp</i>	V	<i>P. aeruginosa</i>
Ацинетобактерный	<i>Acinetobacter spp</i>	VI	<i>A. baumannii</i>
Листерийный	<i>Listeria spp</i>	VII	<i>L. monocytogenes</i>

9.2. Значимость прочих возбудителей в этиологической структуре ГБМ может значительно меняться, например, в зависимости от возраста (менингиты новорожденных, детские менингиты, менингиты пожилых), формы (внебольничные, нозокомиальные), условий возникновения (травматические, послеоперационные, после медицинских манипуляций).

9.3. Менингит новорожденных преимущественно обусловлен возбудителями, входящими в род *Streptococcus* (например, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*), род *Listeria* (*L. monocytogenes*), семейство *Enterobacteriaceae* (например, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *E. coli*). Заражение происходит при прохождении плода по родовым путям или трансплацентарно. При ГБМ у лиц пожилого возраста преобладают представители рода *Staphylococcus* (например, *S. epidermidis*, *S. aureus*), неферментирующих бактерий (рода *Pseudomonas*, рода *Acinetobacter*) и семейства *Enterobacteriaceae*. У пациентов, перенесших травмы или операционные вмешательства, важнейшими этиологическими факторами заболевания являются представители рода *Staphylococcus* (например, *S. aureus*,

S. epidermidis), семейство *Enterobacteriaceae* (например, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus spp.*), рода *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*, *P. mallei*), рода *Enterococcus* (*E. faecalis*). Менингиты у лиц с врожденным или приобретенным нарушением функций иммунной системы (например, тяжелые хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, легких, почек, печени, туберкулез, онкологические заболевания, ВИЧ) 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. baumannii*). На фоне тяжелых поражений иммунитета к бактериальным возбудителям иногда присоединяются дрожжеподобные грибы (род *Candida*, род *Cryptococcus*). Особенностью течения менингитов, вызванных прочими возбудителями, является неэффективность антибактериальной терапии, связанная с их резистентностью к широкому спектру АБП.

S. agalactiae (стрептококк группы В) обладает множеством факторов вирулентности, которые могут вызывать серьезные заболевания у восприимчивых людей. Наиболее часто этот микроорганизм вызывает тяжелые инвазивные бактериальные инфекции у новорожденных. Неонатальная инфекция может проявляться как заболевание с ранним или поздним началом. В ранних случаях бактерии передаются к младенцу в утробе матери. В этом случае заболевание проявляется в течение первых нескольких часов или дней жизни, чаще всего в виде пневмонии и дыхательной недостаточности, которые могут быстро прогрессировать до бактериемии и септического шока. Заболевание с поздним началом может возникать у детей в возрасте до нескольких месяцев и отличаться высокой частотой ГБМ. Дети, перенесшие менингит, вызванный стрептококком группы В, могут страдать от серьезных долгосрочных неврологических последствий, таких как судороги, потеря слуха и когнитивные нарушения. Помимо младенцев, в группе риска находятся и пожилые люди.

Предрасполагающими условиями для развития менингитов, вызванных *S. pyogenes* (стрептококк группы А), являются отит, синусит, пневмония, черепно-мозговые травмы, нейрохирургические вмешательства, алкоголизм. Для детей наиболее распространенным предрасполагающим фактором является отит.

S. aureus – микроорганизм, колонизирующий кожные покровы и слизистую оболочку верхних дыхательных путей. Этот вид достаточно тяжело проникает через гематоэнцефалический барьер, поэтому заболеваемость менингитами, этиологическим агентом которого является *S. aureus*, достаточно низкая по сравнению с другими патогенами. Наиболее часто заболевание возникает в результате черепно-мозговых травм или нейрохирургических операций. Факторами риска внебольничного менингита, вызываемого *S. aureus*, являются длительное нахождение патогена в крови пациента и вторичные очаги заболевания, такие как эндокардит или остеомиелит.

E. coli – условно-патогенный микроорганизм, колонизирующий кишечник человека и других млекопитающих. Несмотря на снижение уровня смертности, показатели заболеваемости остаются неизменными даже при использовании эффективных АМП и поддерживающей терапии. Ситуацию с этим патогеном усугубляют два фактора. Во-первых, постоянно растущее число штаммов *E. coli*, устойчивых к АМП. Во-вторых, гибель этого микроорганизма в кровотоке под

воздействием АМП, и в результате этого – высвобождение большого количества эндотоксина из мертвых бактерий вызывает массивный воспалительный ответ, приводящий к септическому шоку. Переболевшие менингитом, вызванным *E. coli* K1, страдают от серьезных неврологических осложнений, таких как умственная отсталость, потеря слуха и корковая слепота.

L. monocytogenes – единственный представитель рода листерий, способный вызывать инфекции центральной нервной системы. Основным путем ее проникновения в организм человека через зараженную пищу. Согласно зарубежным исследованиям этот микроорганизм является третьим по частоте возникновения возбудителем бактериального менингита после пневмококка и менингококка у взрослых [5]. Наиболее часто *L. monocytogenes* вызывают менингит у пациентов с ослабленным иммунитетом и пожилых людей, предрасполагающими факторами являются злокачественные новообразования и диабет. При этом заболевание отличается высокой летальностью.

Klebsiella – род условно-патогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. К представителям этого рода, способных стать этиологическим агентом бактериального менингита относятся *K. oxytoca*, *K. ozaenae* и *K. pneumoniae*. Случаи заболеваемости менингитами, вызываемого клебсиеллами, сравнительно редки и чаще всего вызваны *K. pneumoniae*. Обычно менингиты этой этиологии бывают нозокомиальными и возникают в результате нейрохирургических вмешательств.

Acinetobacter baumannii способен вызывать внутрибольничные менингиты и абсцессы головного мозга. Факторами риска развития ацинетобактерного менингита являются экстренное нейрохирургическое вмешательство, наружная вентрикулостомия (особенно проводимая более 5 дней), наличие цереброспинальной фистулы, нерациональное использование АМП в нейрохирургических отделениях реанимации и интенсивной терапии [6].

9.4. 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 исследований²³ может приводить к контаминации крови и ликвора. Для дифференциации истинной патогенетической роли микроорганизмов необходимо учитывать следующие факторы:

- клиника ГБМ должна сопровождаться цитологической картиной гнойного менингита в СМЖ (нейтрофильный плеоцитоз);

- морфологические особенности выросшей культуры (окраска по Граму) должны совпадать с морфологией микробных клеток при бактериоскопии СМЖ и «толстой капли» крови, а также не противоречить результатам не культуральных исследований (латекс-агглютинации, РПГА, ПЦР);

- рост из СМЖ и(или) крови двух и более микробных агентов чаще всего свидетельствует о контаминации материала;

- культуры, выросшие из крови и СМЖ, взятые от одного больного, должны иметь идентичные биологические свойства.

²³ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

9.5. Диагностику ГБМ, вызванных прочими возбудителями, выполняют по общей схеме исследования материала при ГБМ. В связи с тем, что инфицирование мягких оболочек и вещества мозга преимущественно происходит гематогенным путем, важное значение приобретает посев крови.

9.6. При обнаружении в мазке СМЖ или крови дрожжеподобных грибов, кокков или палочек, имеющих своеобразную морфологию, отличающую их от основных возбудителей ГБМ, дополнительно к посеву на ША необходимо произвести высев материала на соответствующие питательные среды (дрожжеподобные грибы – среда Сабуро, кокки – КА, желточно-солевой агар с маннитолом (далее – МЖСА), палочки – КА, среда Эндо).

9.7. В случае выявления роста прочих возбудителей ГБМ на ША, проводится микроскопия подозрительных колоний, постановка тестов на оксидазу и каталазу, при наличии технических возможностей проводят идентификацию с использованием MALDI-TOF MS. По результатам первичной идентификации выполняется высев колоний на соответствующие питательные среды с дальнейшим определением вида возбудителя (таблица 7).

Таблица 7

Дифференцирующие свойства наиболее значимых возбудителей прочих бактериальных менингитов

Возбудитель	Бактериоскопия	Оксидаза	Каталаза	Алгоритм действия
Род <i>Staphylococcus</i>	Грам+ кокки, в виде «виноградной грозди»	-	+	- посев на среду МЖСА; - идентификация: а) способность к плазмокоагуляции; б) наличие лецитиназы; в) ферментация маннита
Род <i>Streptococcus</i>	Грам+ кокки, короткие цепочки кокков	Х	-	- посев на КА; - определение α -, β -, γ -гемолиза вокруг колоний; - проба с бацитрацином (<i>S. pyogenes</i>); - ПИР-тест (<i>S. pyogenes</i>); - САМП-тест (<i>S. agalactiae</i>)
Род <i>Enterococcus</i>	Грам+ кокки, полиморфизм, иногда образуют короткие цепочки	Х	-	- посев на КА; - определение α -, β -, γ -гемолиза вокруг мелких кремовых или белых колоний; - редуцирование 0,1% метиленового синего в молочной среде; - рост при температуре плюс 10 °С и 45 °С; - гидролиз эскулина в присутствии желчи (среда ЖЭА); - рост в бульоне с 6,5 % NaCl
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	Грам- палочки, полиморфизм, иногда выраженная капсула	-	+	- посев на среду Эндо или Плоскирева; - пересев колонии на среду Клигlera (Олькиницкого); - идентификация по биохимическим свойствам

Возбудитель	Бактериоскопия	Оксидаза	Каталаза	Алгоритм действия
Род <i>Pseudomonas</i>	Грам- палочки	+	+	- зеленый пигмент; - феномен радужного лизиса; - синтез триметиламина (запах жасмина); - выраженная протеолитическая активность
Род <i>Acinetobacter</i>	Грам- палочки Выраженный полиморфизм, иногда короткие цепочки	-	+	- рост на среде Мак-Конки; - на КА меняет цвет среды на желто-коричневый; - напоминают колонии энтеробактерий; - неферментирующие
Род <i>Listeria</i>	Грам+ палочки, полиморфные	-	+	- рост на средах с 0,05 % теллуридом калия; - творожистый запах; - идентификация по биохимическим свойствам
Примечание: «-» – тест отрицательный, «+» – тест положительный, «X» – тест не определяется.				

9.8. Для диагностики ряда микробных возбудителей (*S. agalactiae*, *Streptococcus* гр. А, В, С, D, F, G, *Listeria spp.*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и дрожжевых грибов *Cryptococcus spp.*, *C. albicans*) используются наборы латексных препаратов, разрешенные к применению для этих целей в РФ в установленном порядке. При этом следует учитывать условия корректной работы препаратов, которые оговариваются в инструкции производителя, поскольку некоторые из них предназначены для выявления антигена возбудителя в СМЖ и(или) крови, а другие могут применяться только как идентификационный тест выделенной культуры.

X. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕНИНГИТА

10.1. Наиболее часто используемые методы для обнаружения и характеристики возбудителей бактериального менингита включают бактериоскопию, бактериологический посев, и латекс-агглютинацию. Посев считается золотым стандартом для подтверждения случая ГБМ в лаборатории, однако высеваемость возбудителей относительно низка из-за неоптимальных условий хранения и транспортировки, практики посева и (или) лечения АМП, назначаемого до взятия образца. Окраска по Граму с последующей бактериоскопией важна, недорога и должна проводиться по возможности, тем не менее этот метод позволяет лишь ориентировочно предположить род и вид этиологического агента. Интерпретация результатов латексной агглютинации является субъективной и может вызвать трудности, особенно когда бактериальная нагрузка образца низкая. Также невозможно провести КК латексной агглютинации. Бактериологический посев должен оставаться золотым стандартом, поскольку культивируемые бактерии являются источником данных о чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, о фенотипических, генетических свойствах, экспрессии антигенов, которые должны быть включены в будущие вакцины.

Образцы, из которых не получена культура, могут быть проанализированы молекулярно-генетическими методами, которые можно применять к ДНК, выделенной из клинических образцов (как правило, крови и СМЖ).

10.2. Исследование «парных» сывороток больного в реакции РПГА является вспомогательным методом диагностики МИ и позволяет существенно увеличить процент лабораторного подтверждения ГФМИ.

Молекулярно-генетическая идентификация и характеристика возбудителей бактериального менингита

10.3. Поскольку метод не требует живых или интактных клеток, ПЦР является ценным инструментом для обнаружения бактериальных патогенных агентов в клинических образцах, где бактерии легко погибают или лизируются из-за неподходящих условий хранения или предшествующего лечения АМП. В настоящее время ПЦР широко используется в диагностике и наблюдении за бактериальными патогенами из-за ее высокой чувствительности и специфичности, а также высокой пропускной способности.

10.4. Молекулярно-генетическую идентификацию возбудителей ГБМ проводят методом ПЦР с использованием зарегистрированных и разрешенных к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке²⁴ наборов реагентов. Предварительная обработка проб проводится в соответствии с п. 3.14. Работу проводят в соответствии с инструкциями производителей наборов для экстракции ДНК и ПЦР тест-систем.

10.5. Выявление ДНК менингококка, пневмококка, гемофильной палочки в образцах проводят с использованием ПЦР тест-систем с учетом результатов в режиме «реального времени» или методом электрофореза в агарозном геле. Для получения валидных результатов предпочтение отдается мультиплексным тест-системам, позволяющим одновременно выявлять несколько возбудителей ГБМ.

10.6. При выявлении ДНК менингококка его серогруппирование проводят с использованием мультиплексных ПЦР тест-систем с учетом результатов в режиме «реального времени».

10.7. Выявление в СМЖ специфической ДНК прочих возбудителей ГБМ методом ПЦР проводят с помощью коммерческих наборов реагентов.

10.8. Молекулярно-генетический анализ (методы мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ), полногеномного секвенирования) выделенных штаммов менингококка, пневмококка и гемофильной палочки, включающий проведение молекулярно-генетических исследований, относится к дополнительным методам исследования и осуществляется в Референс-центре по мониторингу за гнойными бактериальными менингитами.

²⁴ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РПГА)

10.9. РПГА с «парными» сыворотками крови выявляет динамику нарастания титров специфических антител к менингококку и позволяет определить принадлежность возбудителя к наиболее распространенным серогруппам менингококка (А и С). Метод позволяет провести ретроспективную лабораторную диагностику ГФМИ, так как окончательный ответ получают только через 12 – 14 дней после начала заболевания. Преимущественными возможностями метода является лабораторное подтверждение менингококкцемии, при которой использование других методов лабораторной диагностики, как правило, малоэффективны. Характеристика эритроцитарных менингококковых диагностикумов, условия их хранения и техника постановки РПГА изложены в инструкциях по применению препаратов.

10.10. Для получения достоверного результата обязательным условием является исследование сывороток крови больного в динамике, т.е. взятых в разные сроки заболевания (на 1-й и 12 – 14-й дни болезни). Исследование может выполняться макро- и микрометодом, с соблюдением соотношения ингредиентов.

10.11. Одной из модификаций микрометода является постановка РПГА в полистироловых пластинах с объемом лунок не менее 300 мкл с использованием автоматических дозаторов на 50 мкл 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 значение рН раствора, которое должно быть равно 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 разведением 1:5. В каждый ряд добавляют по 50 мкл соответствующего диагностикума. Пластины встряхивают и помещают в термостат на 2 – 2,5 часа при температуре плюс 35 – 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 % эритроцитов барана.

Учет результатов РПГА. Учет результатов РПГА проводят по четырехкrestной системе. Четырехкратное и более нарастание титра специфических антител в процессе болезни (на 12 – 14 день болезни) может служить подтверждением диагноза.

XI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕНИНГИТОВ (МЕНИНГОКОКК, ПНЕВМОКОКК, ГЕМОФИЛЬНАЯ ПАЛОЧКА) К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

11.1. *N. meningitidis* остается чувствительным ко многим АМП используемым при лечении и с целью химиопрофилактики. С 1985 года, после долгого периода использования, в ряде стран отмечено снижение чувствительности к пенициллину, основанное на изменениях в пенициллин-связывающих белках. Описано несколько штаммов *N. meningitidis* с высокой степенью резистентности к пенициллину, вызванной продукцией фермента бета-лактамазы. Периодически отмечается резистентность к рифампицину, что может являться следствием химиопрофилактики. Многие страны проводят мониторинг тенденций устойчивости *N. meningitidis* к АМП. Для сравнения данных между лабораториями, в том числе и лабораториями разных стран, используются стандартизованные протоколы определения чувствительности. Европейским обществом по изучению менингококковой инфекции» (англ. The European Monitoring Group of Meningococci, далее – EMGM)²⁵ в 1999 году принято заключение о необходимости применять стандартную методологию для определения минимальной подавляющей концентрации (далее – МПК) у штаммов *N. meningitidis*, особенно фокусируясь на методах серийных разведений и Е-тестов.

11.2. В глобальном масштабе растет распространенность резистентности пневмококка к АМП. В 60 – 70-х годах XX века чувствительность пневмококка к пенициллину и тетрациклину считалась неизменной. В 70-е годы устойчивые штаммы обнаруживались, но редко, и возможность их распространения рассматривалась как крайне маловероятная. В 90-х годах клиницисты и микробиологи столкнулись с растущим вызовом устойчивости пневмококка к АМП. Сообщения о снижении уровней чувствительности пневмококка к АМП, особенно в последние несколько лет, существуют во многих странах мира. Отмечена циркуляция полирезистентных штаммов пневмококка, т. е. устойчивых к трем и более АМП разных классов [7,8].

11.3 До недавнего времени самыми эффективными средствами лечения гемофильной инфекции являлись амоксициллин и ампициллин. Впервые о появлении ампициллин-резистентных штаммов сообщено в 1972 году и с тех пор у *H. influenzae* развилась резистентность к нескольким АМП [9,10].

Методы определения лекарственной чувствительности

11.4. В настоящее время методология определения чувствительности микроорганизмов к АМП разрабатывается двумя международными организациями – Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам (англ. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, далее –

²⁵ Официальный сайт Европейского общества по изучению менингококковой инфекции (англ. The European Meningococcal and Haemophilus Disease Society) – emgm.eu (в свободном доступе).

EUCAST)²⁶ и Институтом клинических и лабораторных стандартов (англ. Clinical and Laboratory Standards Institute, далее – CLSI)²⁷ Теоретически наиболее обоснованным представляется комплекс подходов к оценке чувствительности и интерпретации результатов, предлагаемый EUCAST, на котором базируются рекомендации Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (далее – МАКМАХ) по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам²⁸ (далее – рекомендации МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»).

11.5. Методы определения чувствительности микроорганизмов подразделяют на методы серийных разведений и диффузные методы. Методы серийных разведений в бульоне и агаре основаны на прямом воздействии АМП и количественном определении МПК АМП по отношению к исследуемому микроорганизму.

Метод разведений в бульоне может быть выполнен в микро- и макроформате. Метод микроразведений в бульоне признан референтным методом для оценки чувствительности быстрорастущих аэробных бактерий²⁹.

11.6. Диско-диффузионный метод основан на регистрации диаметра зоны подавления роста микроорганизма вокруг бумажного диска с АБП. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста пропорциональна величине МПК, поэтому диско-диффузионный метод позволяет косвенно судить о величине МПК. Оценка результатов проводится с использованием критериев интерпретации, разработанных на основе корреляции значений диаметров зон подавления роста и МПК АМП.

Он позволяет классифицировать исследуемый микроорганизм по клиническим категориям чувствительности на основании вероятности клинической эффективности АМП.

С 2019 г. в методологии EUCAST приняты следующие названия и определения клинических категорий чувствительности: Чувствительный при стандартном режиме дозирования (Ч) / (S) – микроорганизм оценивается как «Чувствительный при стандартном режиме дозирования» при высокой вероятности эффективности терапии при стандартном режиме дозирования; –Чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата (У) / (I) – микроорганизм оценивается как «Чувствительный при увеличенной экспозиции», при высокой вероятности

²⁶ Официальный сайт Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (англ. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) – eucast.org (в свободном доступе).

²⁷ Официальный сайт Института клинических и лабораторных стандартов (англ. Clinical and Laboratory Standards Institute) – clsi.org (в свободном доступе).

²⁸ Методические рекомендации Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам – www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations (в свободном доступе).

²⁹ ГОСТ Р 20776-1-2022 «Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод микроразведений в бульоне для лабораторного исследования активности антимикробных агентов по отношению к быстрорастущим аэробным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания», введенный приказом Росстандарта от 10.11.2022 № 1266-ст (далее – ГОСТ Р 20776-1-2022).

эффективности терапии при увеличении экспозиции препарата путем коррекции режима дозирования или благодаря его концентрации в очаге инфекции; Резистентный (P)/(R) – микроорганизм оценивается как «Резистентный» при высокой вероятности терапевтической неудачи даже при увеличенной экспозиции препарата.

Диско-диффузионный метод хорошо стандартизован. Благодаря простоте исполнения диско-диффузионный метод является наиболее распространенным в практических бактериологических лабораториях.

Диско-диффузионный метод разработан для двух основных возбудителей ГБМ – *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Для *N. meningitidis* критерии интерпретации результатов в стандартах EUCAST не установлены.

11.7. Показания для исследования чувствительности микроорганизмов к АБП, практическое использование методов описано в методических документах³⁰.

11.8. Для оценки чувствительности микроорганизмов к АМП используют питательные среды, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке³¹, в зависимости от используемой методологии тестирования.

При тестировании *S. pneumoniae* и *H. influenzae* диско-диффузионным методом по методологии EUCAST используют агар Мюллера-Хинтон (англ. Mueller-Hinton agar, далее – АМХ) с добавлением 5 % дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-никотинамидадениндинуклеотида (далее – β-НАД). При работе по методологии CLSI для *S. pneumoniae* используют агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5 % бараньей крови или агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5 % дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД, а для *H. influenzae* – агар со средой для тестирования гемофил (англ. Haemophilus Test Medium, далее – НТМ), представляющий собой агар Мюллера-Хинтон с добавлением дрожжевого экстракта (5 г/л), β-НАД (15 мг/л) и гемина (15 мг/л).

Тестирование чувствительности *S. pneumoniae* и *H. influenzae* к АМП методом микроразведений в бульоне по методологии EUCAST выполняют в бульоне Мюллера-Хинтон с добавлением 5 % лизированной лошадиной крови и 20 мг/л β – НАД. При работе по методологии CLSI для *S. pneumoniae* используют бульон Мюллера-Хинтон с добавлением 2,5 – 5 % лизированной лошадиной крови, а для *H. influenzae* – НТМ бульон.

Для определения чувствительности *N. meningitidis* к АМП следует использовать один из методов определения МПК³². EMGM рекомендует для определения МПК *N. meningitidis* использовать среду с добавлением 5 % крови как методом Е-тестов, так и методом разведения в агаре.

³⁰ МР 4.2.0160-19 «Определение чувствительности основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов (менингококк, пневмококк, гемофильная палочка) к антибактериальным препаратам диффузным методом Е-тестов», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации; рекомендации МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

³¹ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

³² Таблица 2.14 раздела 2 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

11.8. Интерпретация результатов оценки чувствительности микроорганизма к АМП заключается в отнесении его к одной из трех категорий клинической чувствительности³³ (см. п. 11.6): чувствительный при стандартном режиме дозирования, чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата и устойчивый – в соответствии с критериями, разработанными для конкретного вида бактерий. Интерпретация проводится путем сопоставления величин МПК или диаметров зоны подавления роста, полученных в результате исследования, с пограничными значениями этих параметров изучаемого вида возбудителя.

11.10. Для обеспечения достоверности и точности результатов, полученных при испытаниях на чувствительность, важно, чтобы в лаборатории была установлена система КК.

Мониторинг качества выполнения исследований по определению чувствительности к АМП проводится с использованием специальных контрольных штаммов³⁴, получаемых из государственных или референтных коллекций микроорганизмов. Методика проведения КК осуществляется в соответствии с методическими документами³⁵.

Для сохранения свойств и чистоты контрольные штаммы необходимо хранить в лиофилизированном или замороженном состоянии (минус 80 °С). «Рабочие» культуры хранят в пробирках на скошенном агаре или в столбиках агара, оптимального для роста каждого вида микроорганизма, при температуре плюс 2 – 8 °С, с еженедельным пересевом. Перед использованием для КК определения антибиотикограммы референтный штамм двукратно пересевается.

Допустимые диапазоны значений МПК зон подавления роста контрольных штаммов АБП оцениваются в соответствии с методическими документами³⁶.

Определение чувствительности менингококка к АМП

11.11. Современная тактика проведения исследований по определению чувствительности менингококка к АМП предусматривает применение только тех методов, которые позволяют определять МПК АМП, при этом рекомендуется использовать метод микроразведений в бульоне и метод Е-тестов. Диск-диффузионный метод не используется для достоверного определения чувствительности менингококка к АМП из-за отсутствия критериев интерпретации.

11.12. При тестировании изолятов *N. meningitidis* методом Е-тестов в качестве среды используют АМХ с добавлением бараньей крови.

³³ Пункт 2.1 раздела 2 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

³⁴ Пункт 2.9.2 раздела 1 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

³⁵ Пункт 2.9 раздела 1 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

³⁶ Пункт 2.10 раздела 1 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

АМХ по содержанию ионов двухвалентных металлов (кальция, магния, марганца и цинка) и тимидина должен соответствовать документам по стандартизации³⁷.

11.13. Наиболее важным является определение чувствительности *N. meningitidis* к бензилпенициллину, цефтриаксону, хлорамфениколу, рифампицину, ципрофлоксацину, меропенему, ко-тримоксазолу³⁸.

11.14. КК проводят с тест-штаммами *E. coli* ATCC 25922 и *S. pneumoniae* ATCC 49619 в соответствии с рекомендациями³⁹. Результаты интерпретируют в соответствии с рекомендациями⁴⁰.

Определение чувствительности пневмококка к АМП

11.15. Изучение чувствительности пневмококка к АБП проводят методом микроразведений в бульоне, методом Е-тестов и диско-диффузионным методом. Референтным методом является метод микроразведений в бульоне⁴¹.

11.16. Диско-диффузионный метод выполняют на АМХ с добавлением 5 % дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД, инкубируя посеы в течение (18±2) часов в атмосфере 5 % углекислого газа при температуре плюс (35±1) °С.

При тестировании изолятов *S. pneumoniae* методом Е-тестов используют АМХ с добавлением лошадиной крови и β-НАД.

11.17. Наиболее важным является определение чувствительности *S. pneumoniae* к бета-лактамам (пенициллину, аминопенициллинам, карбапенемам, цефалоспорином), цефтриаксону, хлорамфениколу, рифампицину, которые являются препаратами выбора для лечения пневмококкового менингита. Дополнительно изучают чувствительность к макролидам, линкозамидам, ко-тримоксазолу. Включение в исследование эритромицина и клиндамицина позволяет выявить полную или частичную перекрестную устойчивость пневмококка к макролидам, линкозамидам и стрептограминам. Устойчивость к ко-тримоксазолу часто сопровождается резистентностью к пенициллину.

Тестирование чувствительности с использованием диска с оксациллином 1 мкг или определение МПК бензилпенициллина следует использовать для исключения механизмов резистентности к бета-лактамам. При отрицательном результате скрининга (зона подавления роста ≥20 мм или МПК бензилпенициллина

³⁷ ГОСТ Р 59786-2021 «Клинические лабораторные исследования. Критерии приемлемости партий дегидратированных агара и бульона Мюллера-Хинтон, применяемых для оценки чувствительности к антибиотикам», введенный приказом Росстандарта от 22.10.2021 № 1262-ст (далее – ГОСТ Р 59786-2021).

³⁸ Лабораторные методы диагностики менингита, вызванного *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, Руководство ВОЗ, 2011 (англ. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, WHO Manual, 2nd edition, 2011 – apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO_IVB_11.09_eng.pdf (в свободном доступе) (далее – ВОЗ. Руководство по лабораторной диагностике, 2011).

³⁹ Пункт 2.9.2 раздела 1 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»

⁴⁰ Таблица 2.14 раздела 2 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

⁴¹ ГОСТ Р 20776-1-2022.

$\leq 0,06$ мг/л) изоляты оцениваются как чувствительные ко всем бета-лактамам, для которых в данном документе приведены пограничные значения (и (или) примечания), без дальнейшего тестирования, за исключением цефаклора, который, при необходимости сообщения результата, должен быть оценен, как «чувствительный при увеличенной экспозиции» (У). При положительном результате скрининга (зона подавления роста < 20 мм или МПК бензилпенициллина $> 0,06$ мг/л).

11.18. КК проводят с *S. pneumoniae* ATCC 49619 в соответствии с методическими документами⁴². Результаты интерпретируют в соответствии с методическими документами⁴³.

Определение чувствительности гемофильной палочки к АМП

11.19. Дisko-диффузионный метод предоставляет информацию о клинической категории чувствительности, но метод E-тестов может предоставить более подробную информацию о значении МПК. При тестировании изолятов *H. influenzae* методом E-тестов используют АМХ с добавлением лошадиной крови и β -НАД. Референтным методом является метод микроразведений в бульоне⁴⁴.

11.20. Наиболее важным является определение чувствительности *H. influenzae* к ампициллину, амоксиклаву, хлорамфениколу, цефтриаксону⁴⁵.

11.21. КК проводят с *H. influenzae* ATCC 49766 в соответствии с методическими документами⁴⁶. Результаты интерпретируют в соответствии с методическими документами⁴⁷.

ХII. ВЫДАЧА ЗАКЛЮЧЕНИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА ГНОЙНЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ МЕНИНГИТ

12. Временной график выполнения лабораторных исследований на ГБМ указан в приложении 6 к настоящим МУК.

⁴² Пункт 2.9.2 раздела 1 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

⁴³ Таблица 2.9 раздела 2 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

⁴⁴ ГОСТ Р 20776-1-2022.

⁴⁵ ВОЗ. Руководство по лабораторной диагностике, 2011.

⁴⁶ Пункт 2.9.2 раздела 1 части 1 МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

⁴⁷ Таблица 2.11 раздела 2 части 1 МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕНИНГОКОККА, ПНЕВМОКОККА, ГЕМОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ

1. Все питательные среды, используемые для культивирования, транспортирования, выделения, идентификации и определения чувствительности возбудителей к АМП при лабораторной диагностике МИ и ГБМ готовятся в соответствии с документами по стандартизации⁴⁸, которые распространяются как на коммерческие питательные среды, так и среды, приготовленные в лаборатории.

1.1 КК питательных сред. Каждая партия питательной среды, приготовленная в лаборатории или полученная от производителя, должна быть протестирована с использованием надлежащих стандартных штаммов на предмет стерильности, способности поддерживать рост целевого(-ых) микроорганизма(-ов) и(или) способности обеспечивать нужные биохимические реакции. Должен вестись журнал КК для всех питательных сред, приготовленных в лаборатории или полученных из коммерческих источников, с фиксацией, в том числе дат приготовления или приобретения и результатов КК. Регистрации подлежат любые необычные характеристики среды, такие как цвет или структура, или медленный рост стандартных штаммов.

1.2. Все плотные среды должны готовиться с соблюдением стерильности и разливаться в чашки Петри. После разлива чашки следует подержать при комнатной температуре (плюс 25 °С) несколько часов для предотвращения избыточной конденсации пара на крышках. Для оптимального роста чашки должны быть помещены в стерильный пластиковый пакет и до использования храниться в перевернутом состоянии при (плюс 5±3) °С. Все жидкие питательные среды до использования следует хранить в надлежащих емкостях при температуре плюс (5 ± 3) °С.

1.3 ТСА.

ТСА – питательная среда общего назначения, используемая с добавлением крови или без таковой для выделения и культивирования ряда микроорганизмов. Данная питательная среда должна иметь палевый цвет (от желтоватого до золотистого). ТСА также используется для определения потребности *H. influenzae* в гемине (фактор X) и НАД (фактор V).

Приготовление питательной среды:

- 1) приготовьте необходимый объем ТСА в колбе, следуя инструкциям производителя;
- 2) автоклавируйте при температуре плюс 121 °С в течение 20 минут;
- 3) охладите до температуры плюс 50 °С на водяной бане и разлейте в чашки Петри. Дайте питательной среде затвердеть, а конденсату подсохнуть;
- 4) поместите чашки в пластиковые пакеты и храните до использования при температуре плюс (5±3) °С.

⁴⁸ ГОСТ Р 70393-2022.

КК среды:

1) вырастите штамм *H. influenzae*, используемый для КК, в течение 18 – 24 ч на ША при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа;

2) приготовьте умеренно густую клеточную суспензию (сопоставимую со стандартом мутности 1 по шкале МакФарланда) из культуры, выращенной на ША, в подходящем бульоне (триптиказо-соевый, с сердечной вытяжкой или пептонный), и хорошо перемешайте ее на лабораторном вихревом смесителе (вортексе);

3) инокулируйте половину чашки с ТСА 10 мкл клеточной суспензии, используя стерильную бактериологическую петлю или тампон и дайте суспензии подсохнуть;

4) поместите бумажные диски или полоски, пропитанные гемином, НАД и гемином/НАД, на инокулированную чашку после подсыхания суспензии микроорганизмов;

5) осторожно переверните чашки и инкубируйте в течение 18 – 24 часов при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа;

6) наблюдайте за ростом бактерий на чашке с ТСА вокруг дисков/полосок фильтровальной бумаги;

7) в качестве теста на стерильность инкубируйте неинокулированную чашку в течение 48 часов при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа.

Критерии прохождения КК:

- рост *H. influenzae* должен наблюдаться только вокруг дисков с гемином/НАД;

- после 48 часов инкубирования чашка, использовавшаяся в тесте на стерильность, должна оставаться чистой.

1.4. Полужидкий 0,1 % СА. В качестве основы используют мясопептонный бульон, перевар Хотгингера, рыбный гидролизат, Мартеновский бульон. К 4,0 мл 0,1 % полужидкого питательного агара, рН 7,4, добавляют 1,0 мл предварительно инактивированной сыворотки. Пробирки ставят на сутки в термостат для контроля.

1.5. СА. Основой служит 1,2 – 1,5 % агар (рН 7,4), приготовленный на бульоне из рыбного гидролизата, из бульона на переваре Хотгингера (аминный азот 150 – 180 мг/мл) или на сухом питательном агаре специального назначения (АВС, ТСА); менингоагар (только для выделения). К 80,0 мл расплавленного и остуженного до 50 °С агара добавляют 20,0 мл инактивированной при температуре плюс 56 °С в течение 30 минут лошадиной или бычьей сыворотки, консервированной хлороформом или без консерванта. После перемешивания среду разливают в чашки.

1.6. Сывороточная среда с линкомицином. К 80,0 мл расплавленного и остуженного агара добавляют 20,0 мл сыворотки и 0,5 мл раствора линкомицина в концентрации 1000 мкг/мл. Конечная концентрация АМП в среде — 5 мкг/мл.

1.7. КА. Основой агара служит, например, колумбийский агар, ТСА, АМХ, агар для бруцелл, эритрит-агар, агар Гивенталья-Ведьминой, рН 7,2 – 7,4. КА используется в качестве универсальной кровяной агаризированной питательной среды. Она используется для выращивания и тестирования *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*. Среда должна иметь ярко красный цвет. Если среда имеет темно-

красный цвет, то она либо старая, либо кровь была добавлена к слишком горячему агару. Чашки с подобной средой следует утилизировать надлежащим образом и приготовить новую партию.

Приготовление питательной среды:

1) приготовьте необходимый объем основы КА в колбе по инструкциям, изложенным на этикетке упаковки коммерческой питательной среды. Питательная среда должна быть нагрета до полного растворения порошка. Перед началом автоклавирования остатки порошка на стенках сосуда должны отсутствовать;

2) автоклавируйте при температуре 121 °С в течение 20 минут;

3) охладите до температуры плюс 60 °С;

4) добавьте 5 % стерильной дефибринированной крови барана, лошади, крупного рогатого скота (к 100 мл агара может быть добавлено 5 мл крови). Если готовится другой объем основной питательной среды, количество крови должно быть надлежащим образом скорректировано до 5 % (например, 50 мл крови в расчете на 1 литр среды). Кровь человека не используется;

5) разлейте полученную среду по 20 мл в чашки Петри 15x100 мм. Дайте питательной среде затвердеть, и подсохнуть конденсату;

6) поместите чашки в стерильные пластиковые пакеты и храните при температуре плюс (5±3) °С до использования.

КК среды:

1) вырастите тест-штаммы *S. pneumoniae* или *N. meningitidis*, рекомендованные нормативными документами или инструкциями по применению производителей питательных сред для КК, в течение 18 – 24 часов на КА при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа;

2) рассмотрите чашки КА для выявления колоний со специфической морфологией и признаков гемолиза;

3) в качестве теста на стерильность инкубируйте неинокулированную чашку в течение 48 часов при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа.

Критерии прохождения КК:

- колонии тест-штаммов *S. pneumoniae* должны быть мелкими серыми/серо-зелеными, окруженными отчетливым зеленым ореолом (альфа-гемолиз);

- колонии тест-штаммов *N. meningitidis* должны быть крупными, округлыми, гладкими, влажными, блестящими и выпуклыми, серого цвета с четко различимым краем;

- после 48 часов инкубирования чашка, использовавшаяся в тесте на стерильность, должна оставаться чистой.

1.8. ША. Основой агара служит колумбийский агар, ТСА, агар Мюллера-Хинтон, агар для бруцелл, эритрит-агар, агар Гивенталья-Ведьминой. ША – это питательная среда, которая содержит особые факторы роста (гемин и НАД), необходимые для выделения прихотливых микроорганизмов, таких как *H. influenzae*, при инкубировании в среде с 5 – 10 % углекислого газа при температуре плюс 35 – 37 °С.

Приготовление питательной среды:

1) к 100 мл растопленной стерильной основе (рН 7,4) небольшими порциями прибавьте 5 – 10 мл дефибринированной крови барана, лошади, крупного рогатого

скота, тщательно перемешивают и подогревают на водяной бане при температуре плюс 70 – 80 °С, постоянно встряхивая, пока цвет агара не станет шоколадным;

2) разлейте примерно по 20 мл в чашки Петри и(или) по 4 – 5 мл в пробирки в зависимости от размера. Дайте питательной среде затвердеть, и подсохнуть конденсату. Пробирки перед затвердением питательной среды разместите под углом для получения скошенного агара;

3) поместите чашки и пробирки с ША в стерильные пластиковые пакеты и храните до использования при температуре плюс (5±3) °С;

4) в качестве теста на стерильность инкубируйте неинокулированную чашку в течение 48 часов при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа.

КК среды:

1) вырастите тест-штаммы *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, рекомендованные нормативными документами или инструкциями по применению производителей питательных сред в течение 18 – 24 часов на ША при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа.

2) рассмотрите чашки с ША для выявления колоний со специфической морфологией и гемолиза.

Критерии прохождения КК:

- колонии тест-штаммов *N. meningitidis* и *H. influenzae* на ША должны быть крупными, округлыми, гладкими, выпуклыми, бесцветными/серыми, непрозрачными, не изменяющими цвет питательной среды;

- колонии тест-штаммов *S. pneumoniae* на ША должны быть мелкими, серыми/зелеными, с зеленоватой зоной вокруг колоний;

- после 48 часов инкубирования чашка, использовавшаяся в тесте на стерильность, должна оставаться чистой.

1.9. Модифицированный агар Тайера-Мартина (англ. Modified Thayer-Martin [agar], далее – МТМ).

МТМ – селективная питательная среда, которая используется для улучшения первичного выделения *N. meningitidis* из образцов, содержащих смешанную бактериальную и(или) грибковую флору. МТМ – это ША, содержащий ванкомицин, колистин, нистатин и триметоприма лактат.

Приготовление питательной среды:

1) растворите в колбе 7,2 г основы питательной среды для выделения гонококка (GC агар) в 100 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешайте, нагрейте с частым размешиванием и доведите до кипения на 1 мин для полного растворения порошка;

2) автоклавируйте колбу при температуре плюс 121 °С в течение 15 минут;

3) охладите до температуры плюс 50 °С.

4) добавьте 100 мл теплой дистиллированной воды к 2 г растворимого порошка гемоглобина. Смешайте порошок с 5 – 10 мл дистиллированной воды до образования однородной пасты. Постепенно добавляйте остатки воды до получения гомогенного раствора. Непрерывно перемешивайте раствор по мере добавления воды. В качестве альтернативы, возможно использование 100 мл готового 2 % стерильного раствора гемоглобина, подогретого до 50 °С;

5) автоклавируйте раствор при температуре плюс 121 °С в течение 15 минут;

6) охладите до температуры плюс 50 °С;

7) растворите лиофилизированную ростовую добавку, содержащую НАД и гемин, добавив к ней, соблюдая стерильность, 10 мл прилагающегося разбавителя с помощью стерильного шприца с иглой. Встряхните раствор, чтобы гарантировать полное растворение порошка. Приготовленный раствор следует использовать немедленно или можно хранить до 2 недель при температуре плюс (5±3) °С;

8) соблюдая стерильность, добавьте 100 мл стерильного раствора гемоглобина и ростовой добавки к 100 мл основы GC агара, приготовленной по п. 1. Тщательно, но осторожно перемешайте, чтобы не допустить образования в агаре пузырьков;

9) затем добавьте следующие ингредиенты: 3,0 мкг/мл ванкомицина, 7,5 мкг/мл колистина, 12,5 ед/мл нистатина, 5,0 мкг/мл триметоприма лактата;

10) разлейте в чашки Петри. Дайте питательной среде затвердеть, а конденсату подсохнуть;

11) поместите чашки в стерильные пластиковые пакеты и храните до использования при температуре плюс (5±3) °С.

КК среды:

1) вырастите тест-штамм *N. meningitidis*, рекомендованные нормативными документами или инструкциями по применению производителей питательных сред, в течение 18 – 24 часов на чашке с МТМ при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа;

2) рассмотрите чашку с МТМ для выявления колоний со специфической морфологией;

3) в качестве теста на стерильность инкубируйте неинокулированную чашку в течение 48 часов при температуре плюс 35 – 37 °С в атмосфере 5 – 10 % углекислого газа.

Критерии прохождения КК:

- колонии *N. meningitidis* на чашке с МТМ должны быть крупными, округлыми, гладкими, выпуклыми, бесцветными/серыми, непрозрачными, не изменяющими цвет питательной среды.

- после 48 часов инкубирования чашка, использовавшаяся в тесте на стерильность, должна оставаться чистой.

1.10. Двухфазная питательная среда. Плотная фаза (ША) – приготовьте простой питательный агар (на основе триптического перевара Хотгингера, ТСА, колумбийского агара), разлейте во флаконы по 50 мл, автоклавированные при температуре плюс 121 °С в течение 20 минут. В горячий флакон с агаром добавьте по 3,0 – 5,0 мл крови, перемешайте и прогрейте при температуре плюс 65 – 80 °С в течение 10 минут двукратно. Среду скосите. Жидкую фазу приготовьте из сахарного бульона на переваре Хотгингера, добавив в объеме 50 мл в каждый флакон. Для приготовления сахарного бульона требуются 200 г перевара Хотгингера, 800 мл воды, 10 г глюкозы и 5 г хлорида натрия (NaCl). Далее стерилизуйте при 0,5 атм в течение 30 минут, рН 7,3 – 7,4. Готовую двухфазную среду хранят при температуре плюс (5±3) °С в холодильнике, перед посевом патологического материала согревают в термостате.

1.11. Плотные среды с углеводами. Готовят на той же питательной основе, что и сывороточные среды. К 75 мл агаровой основы добавьте 0,9 г одного из

углеводов (глюкоза, мальтоза, сахароза, лактоза, фруктоза) и 3,9 мл раствора индикатора фенолового красного. Стерилизуйте текучим паром 3 дня по 30 минут или при 0,5 атм в течение 30 минут. Индикатор феноловый красный получают, смешивая 0,4 г порошка фенолового красного с 16,0 мл 0,1 N раствора гидроксида натрия (NaOH). Затем раствор доведите до объема 200 мл дистиллированной водой, разлейте во флаконы и стерилизуйте при 1 атм в течение 20 минут.

1.12. ЦТА с 1 % углеводов (полужидкая питательная среда).

Приготовление питательной среды:

1) Следуя инструкциям производителя, определите количество ЦТА, которое должно быть растворено в 900 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешайте, нагрейте с частым размешиванием и доведите до кипения на 1 минуту для полного растворения порошка.

2). Автоклавируйте колбу при температуре плюс 121 °С в течение 15 минут.

3). Охладите до температуры плюс 50 °С.

4). Приготовьте 10 % раствор глюкозы, добавив 10 г глюкозы к 100 мл дистиллированной воды. Простерилизуйте через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

5). Соблюдая стерильность, добавьте 100 мл 10 % раствора глюкозы, приготовленного на шаге 4, к 900 мл питательной среды ЦТА, чтобы получить раствор с конечной концентрацией глюкозы 1 %.

6). Соблюдая стерильность, разлейте по 7 мл питательной среды в стеклянные пробирки.

7). Повторите данную процедуру с 3 другими углеводами (мальтоза, лактоза и сахароза).

8). Храните при температуре плюс (5±3) °С, нагревая перед использованием до комнатной температуры (плюс 20 – 25 °С).

КК среды:

1) вырастите штаммы *N. meningitidis*, *N. lactamica* и *N. sicca*, рекомендованные нормативными документами или инструкциями по применению производителей питательных сред для контроля качества, в течение 18 – 24 часов на КА при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа.

2) дайте пробиркам с ЦТА и углеводами (глюкозой, мальтозой, лактозой или сахарозой) нагреться до комнатной температуры (плюс 20 – 25 °С), и промаркируйте пробирки, указав на них название штамма для КК.

3) возьмите 3 – 5 колоний с выросшей культурой на КА с помощью 1 мкл одноразовой бактериологической петли.

4) произведите посев уколом, вводя петлю в верхние 10 мм питательной ЦТА с разными углеводами. Используйте отдельные одноразовые иглы для инокуляции каждого тестируемого углевода.

5) неплотно закройте крышки пробирок и поместите пробирки в термостат при температуре плюс 35 – 37 °С без углекислого газа. Инкубируйте пробирки с ЦТА и сахарами на протяжении, по меньшей мере, 72 часов (и до 5 дней) перед тем, как отбросить их, констатируя отрицательный результат.

6) наблюдайте за ЦТА с сахарами на предмет помутнения и окрашивания в желтый цвет.

Критерии прохождения КК:

- заметное помутнение и пожелтение верхней части питательной среды указывает на рост бактерий и выработку кислоты, и классифицируется как положительный результат теста;

- *N. meningitidis* должны утилизировать глюкозу и мальтозу, но не лактозу или сахарозу;

- *N. lactamica* должны утилизировать глюкозу, мальтозу и лактозу, но не сахарозу;

- *N. sicca* должны утилизировать глюкозу, мальтозу и сахарозу, но не лактозу;

1.12. АМХ.

Питательная среда должна соответствовать документам по стандартизации⁴⁹ по содержанию ионов двухвалентных металлов (кальция, магния, марганца и цинка) и тимидина.

Приготовление питательной среды:

1) приготовьте АМХ из коммерческой сухой среды, следуя инструкциям производителя.

2) после автоклавирования охладите среду до температуры плюс 45 – 50 °С на водяной бане или на воздухе.

3) разлейте среду в стерильные стеклянные или пластиковые чашки Петри, находящиеся на ровной горизонтальной поверхности, таким образом, чтобы толщина слоя агара составляла $4,0 \pm 0,5$ мм (приблизительно 25 мл в круглую чашку диаметром 90 мм, 31 мл – в круглую чашку диаметром 100 мм, 71 мл – в круглую чашку диаметром 150 мм, 40 мл – в квадратную чашку размером 100x100 мм). Использование большего или меньшего количества агара повлияет на результаты оценки чувствительности.

4) дайте питательной среде затвердеть, а конденсату подсохнуть.

5) рН должен составлять 7,2 – 7,4.

6) поместите чашки в пластиковые пакеты и храните до использования при температуре (5 ± 3) °С. Перед использованием необходимо убедиться, что поверхность агара сухая. На поверхности агара или на внутренней стороне крышки не должно быть видимых капель влаги. При необходимости чашки следует подсушить при температуре плюс 20 – 25 °С в течение 16 – 20 часов или при температуре плюс 35 °С с открытыми крышками в течение 15 минут. Чашки нельзя пересушивать.

КК среды:

1) вырастите тест-штаммы *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, рекомендованные нормативными документами или инструкциями по применению производителей питательных сред для контроля качества, в течение 18 – 20 часов на чашке со средой № 1 ГРМ или ГРМ-агаром с АМХ при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа (в эксикаторе, газогенерирующем пакете или в сосуде со свечой).

2) посейте штрихом на АМХ в трех направлениях каждый тест-штамм для определения ростовых свойств среды.

⁴⁹ ГОСТ Р 59786-2021.

3) для контроля показателя чувствительности тест-штаммов к АБП после инкубации культуры тест-штаммов бактериологической петлей перенесите в пробирки со стерильным 0,9 % раствором натрия хлористого и доведите концентрацию микробной взвеси каждого тест-штамма до 5 единиц по отраслевому стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-86).

4) приготовьте стандартную микробную взвесь путем разведения полученных микробных взвесей каждого тест-штамма в соотношении 1:2 (1 мл микробной взвеси и 2 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлористого) до концентрации примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, что соответствует мутности стандарта МакФарланда 0,5.

5) произведите посев каждого тест-штамма, используя стерильный тампон (например, из вискозы, ваты). Погрузите тампон в стандартную суспензию микроорганизма на 5 – 10 с, избыток инокулята удалите, отжимая тампон о стенки пробирки. Затем тампоном равномерно в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°, распределите суспензию каждого тест-штамма микроорганизма по поверхности среды.

6) разложите диски с АМП, с которыми предположительно будете работать, не позднее, чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды. Увеличение интервала времени между посевом и аппликацией дисков может привести к искажению результатов. Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15 – 20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 90 мм помещают 4 диска с АМП, аккуратно прижав их пинцетом к поверхности среды.

7) желательно использовать диски с АБП, для которых диаметры зон подавления роста тест-штаммов зависят от качества среды (от содержания ионов кальция, магния, марганца, цинка и тимидина): диски с гентамицином, левофлоксацином, меропенемом, тетрациклином, тигециклином, цефепимом, триметоприм /сульфаметоксазолом.

8) поместите чашки с посевами в термостат сразу после наложения дисков и инкубируйте при температуре плюс (35 ± 1) °С в течение (18 ± 2) часов.

9) измерьте с точностью до миллиметра при помощи линейки или штангенциркуля диаметры зон подавления роста на АМХ без добавок в отраженном свете, Чашку Петри с закрытой крышкой располагайте дном кверху над темной матовой поверхностью. Для АМХ с добавкой крови учитывайте результаты в отраженном свете дном чашки книзу.

10) сравните полученные значения с пограничными значениями диаметров зон подавления роста для интерпретации результатов и определите клинические категории чувствительности⁵⁰.

Критерии прохождения КК:

- колонии тест-штаммов должны быть типичными: *E. coli* в виде круглых слегка выпуклых колоний светло желтого цвета с гладкой блестящей поверхностью, *S. aureus* в виде круглых, выпуклых, с гладкой блестящей

⁵⁰ Пункт 2.10 раздела 1 части 1 Рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»

поверхностью непрозрачные колонии желтого цвета, *P. aeruginosa* в виде плоских, неправильной формы с волнистыми краями колоний от желто-зеленого до зеленого цвета, *E. faecalis* в виде полупрозрачных, круглых колоний;

- диаметры зон подавления роста контрольных штаммов вокруг дисков с исследованными АБП должны находиться в пределах допустимого диапазона.

1.13. АМХ с 5 % бараньей крови. АМХ с 5 % бараньей крови используется для тестирования чувствительности *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*.

Приготовление питательной среды:

1) приготовьте АМХ как описано в разделе 1.12 до шага 2.

2) добавьте к питательной среде 5 % стерильной дефибринированной бараньей (т.е. 50 мл крови в расчете на 1 литр среды или 25 мл крови в расчете на 500 мл среды).

3) рН должен составлять 7,2 – 7,4.

4) Разлейте агар в стерильные стеклянные или пластиковые чашки Петри, находящиеся на ровной горизонтальной поверхности, следуя рекомендациям раздела 1.12 шаги 3 – 6.

КК среды:

1) вырастите штаммы *S. pneumoniae* ATCC 49619 или *E. coli* ATCC 25922, используемые для КК, в течение 18 – 24 часов на чашке с АМХ с 5 % бараньей крови при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа.

2) дальнейшую процедуру КК провести, следуя рекомендациям шагов 2 – 10 пункта 1.12 подпункта «КК среды» с учетом требований инкубации тест-штамма *S. pneumoniae* ATCC 49619 (атмосфера 5 – 10 % углекислого газа) и использования дисков с АБП, соответствующих целям дальнейших исследований.

Критерии прохождения КК:

- колонии тест-штамма должны быть типичными: *S. pneumoniae* должны быть мелкими серыми/серо-зелеными, окруженными отчетливым зеленым ореолом (альфа-гемолиз), *E. coli* – прозрачными серового цвета без гемолиза.

- диаметры зон подавления роста контрольного штамма вокруг дисков с исследованными АБП должны находиться в пределах допустимого диапазона.

1.14. АМХ с 5 % лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД. Питательная среда используется для тестирования чувствительности *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* по методологии EUCAST.

Приготовление питательной среды:

1. Приготовьте среду как описано в разделе 1.12 до шага 2.

2. Добавьте к питательной среде 5 % стерильной дефибринированной лошадиной крови (т.е. 50 мл крови в расчете на 1 л среды или 25 мл крови в расчете на 500 мл среды) и 20 мг/л β-НАД (β-никотинамидадениндинуклеотида).

3. рН среды должен составлять 7,2 – 7,4.

4. Разлейте агар в стерильные стеклянные или пластиковые чашки Петри, находящиеся на ровной горизонтальной поверхности, следуя рекомендациям раздела 1.12 шаги 3 – 6.

КК и критерии прохождения КК:

Описание см. в разделе 1.13.

1.15. Питательная среда для тестирования чувствительности *Haemophilus* (англ. *Haemophilus test medium*, далее – НТМ). НТМ используют для тестирования

чувствительности *H. influenzae* к АБП. АМХ, используемый для получения НТМ, не должен содержать тимидина для получения достоверных результатов при проверке на предмет чувствительности к котримоксазолу.

Приготовление:

1) приготовьте свежий базовый раствор гемина, растворив 50 мг порошка гемина в 100 мл 0,01 моль/л NaOH, подогревая и помешивая до полного растворения порошка.

2) приготовьте базовый раствор НАД, растворив 50 мг β-НАД в 10 мл дистиллированной воды. Простерилизуйте раствор посредством фильтрации.

3) приготовьте АМХ из коммерческой среды, следуя инструкциям производителя (или см. протокол в разделе 1.12), добавив 5 г дрожжевого экстракта и 30 мл базового раствора гемина к 1 л АМХ.

4) после автоклавирования охладите питательную среду до температуры плюс 45 – 50 °С на водяной бане.

5) соблюдая стерильность, добавьте 3 мл базового раствора β-НАД.

6) разлейте среду в стерильные стеклянные или пластиковые чашки Петри, находящиеся на ровной горизонтальной поверхности. таким образом, чтобы толщина слоя агара составляла $4,0 \pm 0,5$ мм (приблизительно 25 мл в круглую чашку диаметром 90 мм, 31 мл – в круглую чашку диаметром 100 мм, 71 мл – в круглую чашку диаметром 150 мм, 40 мл – в квадратную чашку размером 100x100 мм).

7) дайте питательной среде затвердеть, а конденсату подсохнуть.

8) рН должен составлять 7,2 – 7,4.

9) поместите чашки в пластиковые пакеты и храните до использования при температуре плюс (5 ± 3) °С.

КК среды:

1) вырастите штамм *H. influenzae* ATCC 49766, используемый для контроля качества на ША в течение 18 – 24 часов при температуре плюс 35 – 37 °С в присутствии 5 – 10 % углекислого газа.

2) далее следуйте пп. 2 – 10 раздела 1.12 подраздела «КК среды» с учетом требований инкубации тест-штамма (атмосфера 5 – 10 % углекислого газа) и использования дисков с АБП, соответствующих целям дальнейших исследований.

Критерии прохождения КК:

- колонии тест-штамма должны быть типичными: крупными, округлыми, гладкими, выпуклыми, бесцветными/серыми, непрозрачными, не изменяющими цвет питательной среды.

- диаметры зон подавления роста контрольного штамма вокруг дисков с исследованными АБП должны находиться в пределах допустимого диапазона.

1.16. Питательная среда для выделения возбудителей ГБМ (ГБМ-агар); питательная среда для выделения возбудителей ГБМ, готовая к применению (Шоколадный агар); питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению (Гемофилус агар).

Приготовление, КК проводят в соответствии с инструкциями производителя.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ

2.1. Реагенты для окрашивания по Граму.

I. Аммония оксалат – кристаллический фиолетовый:

- 1) растворите 2,0 г кристаллического фиолетового из проверенной партии в 20,0 мл 95 % этанола;
- 2) растворите 0,8 г аммония оксалата в 80,0 мл дистиллированной воды;
- 3) смешайте два раствора и дайте смеси отстояться в течение ночи при комнатной температуре (плюс 25 °С);
- 4) перед использованием отфильтруйте через крупноячеистую фильтровальную бумагу;
- 5) храните при комнатной температуре (плюс 25 °С).

II. Раствор йодистого калия для окраски по Граму (храните в защищенном от света месте):

- 1) разотрите в ступке 1,0 г йода (кристаллического) и 2,0 г калия йодида. При приготовлении раствора может быть полезно добавление небольших количеств дистиллированной воды;
- 2) добавьте 300,0 мл дистиллированной воды.

III. Храните при комнатной температуре (плюс 25 °С) в бутылки, обернутой в фольгу. Обесцвечивающее средство – 95 % этанол.

IV. Вещество для контрастного окрашивания (возможно 2 варианта: сафранин или карболфуксин). Сафранин:

- 1) добавьте 2,5 г сафранина-О к 100,0 мл 95 % этанола;
- 2) добавьте 10,0 мл раствора сафранина в этаноле, приготовленных на шаге 1, к 90,0 мл дистиллированной воды;
- 3) храните при комнатной температуре (плюс 25 °С).

Карбол-фуксин по Цилю-Нильсену (может быть более эффективным средством для контрастного окрашивания по сравнению с сафранином):

- 1) растворите 0,3 г основного фуксина в 10,0 мл 95 % этанола;
- 2) добавьте 5,0 мл расплавленных кристаллов фенола в 95,0 мл дистиллированной воды;
- 3) добавьте 5 % фенольного раствора в раствор фуксина и оставьте на ночь;
- 4) профильтруйте через крупноячеистую фильтровальную бумагу;
- 5) храните при комнатной температуре (плюс 25 °С) в бутылки, обернутой в фольгу, на протяжении до 1 года.

2.2. Водно-спиртовой раствор метиленового синего. Готовят насыщенный спиртовой раствор метиленового синего, для чего 8–9 г метиленового синего растворяют в 100 мл этилового спирта (96°). Далее 1,0 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего разбавляют в 30,0 мл дистиллированной воды.

2.3. Стандарты мутности по МакФарланду:

- 1) приготовьте 1 % раствор хлорида бария;
- 2) приготовьте 1 % раствор серной кислоты;

3) объедините и полностью смешайте растворы бария хлорида и серной кислоты до образования мутной суспензии сульфата бария, соблюдая конкретные соотношения для каждого стандарта мутности по Макфарланду (таблица 8).

Таблица 8

Стандарты мутности по Макфарланду

Номер стандарта мутности по Макфарланду	0,5	1	2	3	4
1 % бария хлорид (мл)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
1 % серной кислоты (мл)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6
Плотность клеток (1×10^8 КОЕ/мл)	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0

4) поместите полученную смесь в пробирку с закручивающейся крышкой, покрытую фольгой.

5) храните стандарты Макфарланда при комнатной температуре (плюс 25 °С). Готовьте свежий стандарт каждые 6 месяцев. Со временем в стандартах мутности по Макфарланду образуется осадок и сгустки, и перед каждым использованием их следует энергично перемешивать на вортексе. Отметьте уровень жидкости на пробирке и проверяйте его перед каждым использованием, чтобы убедиться в отсутствии испарения раствора.

Возможно использование отечественных стандартов мутности с учетом пересчета (например, мутность бактериальной суспензии, приготовленной по отраслевому стандартному образцу мутности 5 единиц (по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-86) (5 МЕ)⁵¹) и разведенной в соотношении 1:2 (1 мл микробной взвеси и 2 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлористого), и по стандарту МакФарланда 0,5 практически одинаковы и соответствуют концентрации бактериальной суспензии $1 - 2 \times 10^8$ КОЕ/мл.

⁵¹ Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания.

**КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕНИНГОКОККА, ПНЕВМОКОККА,
ГЕМОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ
ПРЕПАРАТАМ: ПОГРАНИЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ДИАМЕТРОВ ЗОН
ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА (ММ) И ВЕЛИЧИН МПК (МГ/Л)
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ⁵²**

3.1. Диско-диффузионный метод определения антимикробной чувствительности в отношении *N. meningitidis* не регламентирован. Оценка антимикробной чувствительности проводится только методами, позволяющими определять МПК АМП, а интерпретации результатов исследования чувствительности - в соответствии с критериям, указанными в МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (таблица 9). Условия необходимые для определения антимикробной чувствительности *N. meningitidis*:

Питательные среды:

- агар Мюллера-Хинтон + 5 % дефибринированной бараньей крови (если в инструкции производителя не указано иное);
- инокулюм: микробная взвесь 0,5 по стандарту МакФарланда;
- инкубация: 5 – 10 % углекислого газа, температуре плюс (35±1) °С, (18±2) ч.

Таблица 9

**Интерпретации результатов исследования чувствительности к АБП
менингококка**

Антибиотики	МПК (мг/л)		Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон ингибиции (мм)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Пенициллины					
Бензилпенициллин	0,25	0,25	-	-	-
Цефалоспорины					
Цефотаксим	0,125	0,125	-	-	-
Цефтриаксон	0,125	0,125	-	-	-
Карбапенемы					
Меропенем	0,25	0,25	-	-	-
Фторхинолоны					
Ципрофлоксацин	0,03	0,03	-	-	-
Тетрациклины					
Тетрациклин	2	2	-	-	-
Миноциклин	1	1	-	-	-
Другие антибиотики					
Хлорамфеникол	2	2	-	-	-
Рифампицин	0,25	0,25	-	-	-
Примечание: S – чувствительный при стандартном режиме дозирования; R – устойчивый.					

⁵² Таблица 2.9, 2.11, 2.14 раздела 2 части 1 рекомендаций МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2021 года.

3.2. Интерпретации результатов исследования чувствительности *S. pneumoniae* к АМП проводится в соответствии с критериями, указанными в МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (таблица 10). Условия необходимые для определения антимикробной чувствительности *S. pneumoniae*:

- питательная среда: агар Мюллер-Хинтон + 5 % дефибрированной лошадиной крови и 20 мг/л β -NAD;
- инокулюм: микробная взвесь 0,5 по стандарту МакФарланда (КА) или 1 по стандарту МакФарланда (ША);
- инкубация: 5 % углекислого газа, температуре плюс $(35\pm 1)^\circ\text{C}$, (18 ± 2) часов.

Таблица 10

**Интерпретации результатов исследования чувствительности к АБП
пневмококка**

Антибиотики	МПК (мг/л)		Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон ингибиции (мм)	
	S \leq	R $>$		S \leq	R $>$
Пенициллины					
Бензилпенициллин (при менингите)	0,06	0,06	-	-	-
Оксациллин (скрининг)	-	-	1	20	-
Цефалоспорины					
Цефаклор	0,001	0,5	30	50	28
Цефепим	1	2	-	-	-
Цефотаксим (при менингите)	0,5	0,5	-	-	-
Цефтриаксон (при менингите)	0,5	0,5	-	-	-
Карбопенымы					
Меропенем (при менингите)	0,25	0,25	-	-	-
Фторхинолоны					
Норфлоксацин (скрининг)	-	-	10	10	-
Левифлоксацин	0,001	2	5	50	16
Моксифлоксацин	0,5	0,5	5	22	22
Гликопептиды и липогликопептиды					
Тейкопланин	2	2	30	17	17
Ванкомицин	2	2	5	16	16
Макролиды, линкозамиды и стрептограминны					
Эритромицин	0,25	0,5	15	22	19
Кларитромицин	0,25	0,5	-	-	-
Азитромицин	0,25	0,5	-	-	-
Клиндамицин	0,5	0,5	2	19	19
Телитромицин	0,25	0,5	15	23	20
Тетрациклины					
Доксициклин	1	2	-	-	-
Тетрациклин	1	2	30	25	22
Миноциклин	0,5	0,5	30	24	24
Оксазолидиноны					
Линезолид	2	2	10	22	22
Другие антибиотики					
Хлорамфеникол	8	8	30	21	21
Рифампицин	0,125	0,5	5	22	17
Триметоприм-сульфаметоксазол	1	2	1,25 – 23,75	13	10

Примечание: S – чувствительный при стандартном режиме дозирования; R – устойчивый.

3.3. Интерпретации результатов исследования чувствительности *H. influenzae* к АМП проводится в соответствии с критериями, указанными в МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (таблица 11). Условия необходимые для определения антимикробной чувствительности *H. influenzae*:

- питательная среда: агар Мюллер-Хинтон + 5 % дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β -NAD (МН-F)
- инокулом: микробная взвесь 0,5 McFarland
- инкубация: 5 % углекислого газа, температуре плюс (35±1) °С, (18±2) ч.

Таблица 11

**Интерпретации результатов исследования чувствительности
к АБП гемофильной палочки**

Антибиотики	МПК (мг/л)		Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон ингибиции (мм)	
	S ≤	R >		S ≤	R >
Пенициллины					
Бензилпенициллин (скрининг)	-	-	1 ЕД	12	-
Ампициллин	1	1	2	18	18
Ампициллин-сульбактам	1	1	10-10	-	-
Амоксициллин	2	2	-	-	-
Амоксициллин-клавуланат	2	2	2-1	15	15
Цефалоспорины					
Цефиксим	0,125	0,125	5	26	26
Цефепим	0,25	0,25	30	28	28
Цефотаксим	0,125	0,125	5	27	27
Цефтриаксон	0,125	0,125	30	32	32
Цефуроксим	1	2	30	27	25
Карбопенемы					
Меропенем (при менингите)	0,25	0,25	-	-	-
Фторхинолоны					
Налидиксовая кислота (скрининг)	-	-	30	23	-
Ципрофлоксацин	0,06	0,06	5	30	30
Левифлоксацин	0,06	0,06	5	30	30
Моксифлоксацин	0,125	0,125	5	28	28
Офлоксацин	0,06	0,06	5	30	30
Тетрациклины					
Тетрациклин	1	2	30	25	22
Миноциклин	1	2	30	24	24
Доксициклин	1	2	-	-	-
Другие антибиотики					
Хлорамфеникол	2	2	30	28	28
Рифампицин	1	1	5	18	18
Триметоприм-сульфаметоксазол	0,5	1	1,25 – 23,75	23	20

Примечание: S – чувствительный при стандартном режиме дозирования; R – устойчивый.

ИЛЛЮСТРАЦИИ

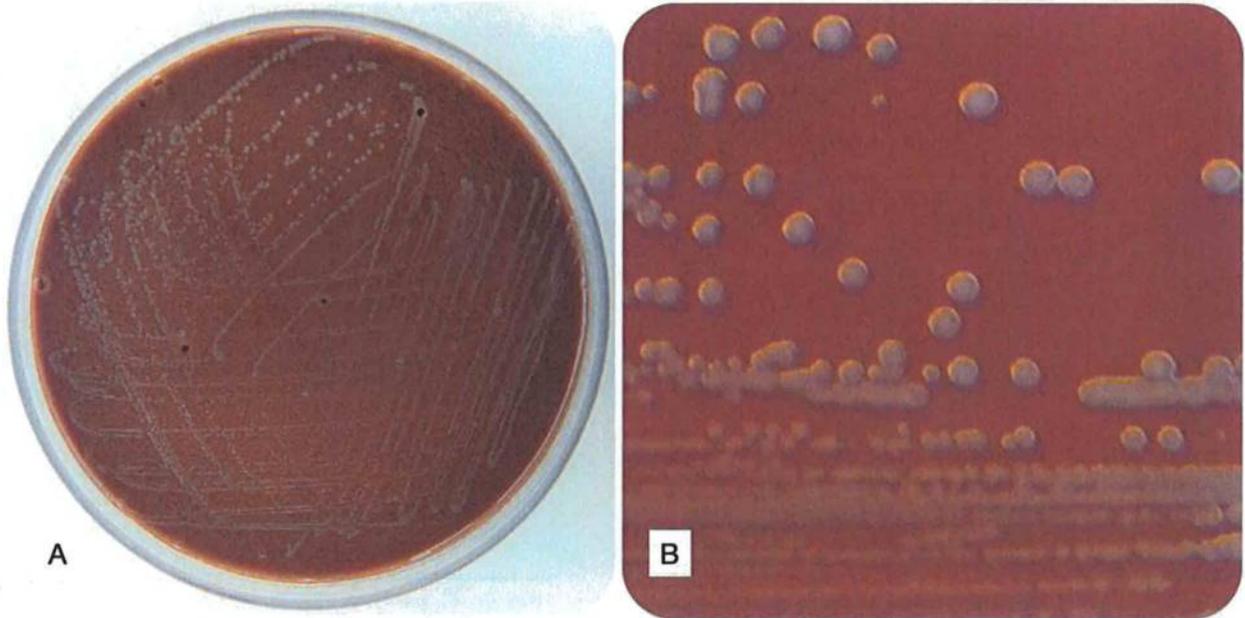


Рисунок 22. Демонстрация ША с культурой менингококка (А) и единичных колоний (В)

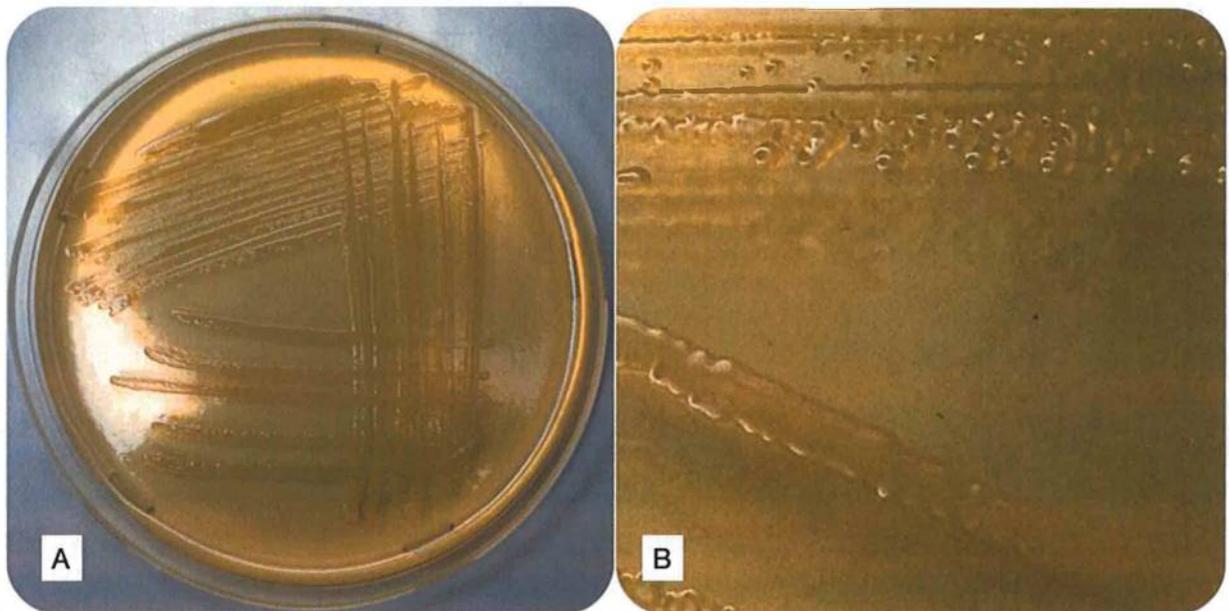


Рисунок 23. Демонстрация чашки с СА с культурой менингококка (А) и единичных колоний (В)

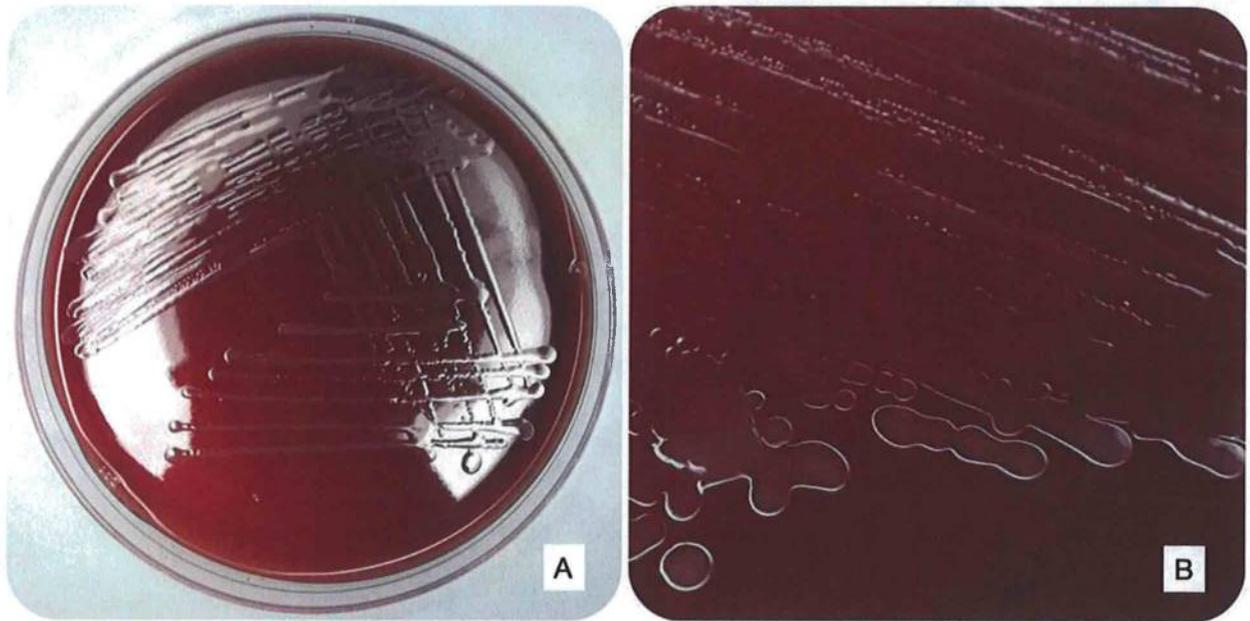


Рисунок 24. Демонстрация КА с культурой менингококка (А) и единичных колоний (В)

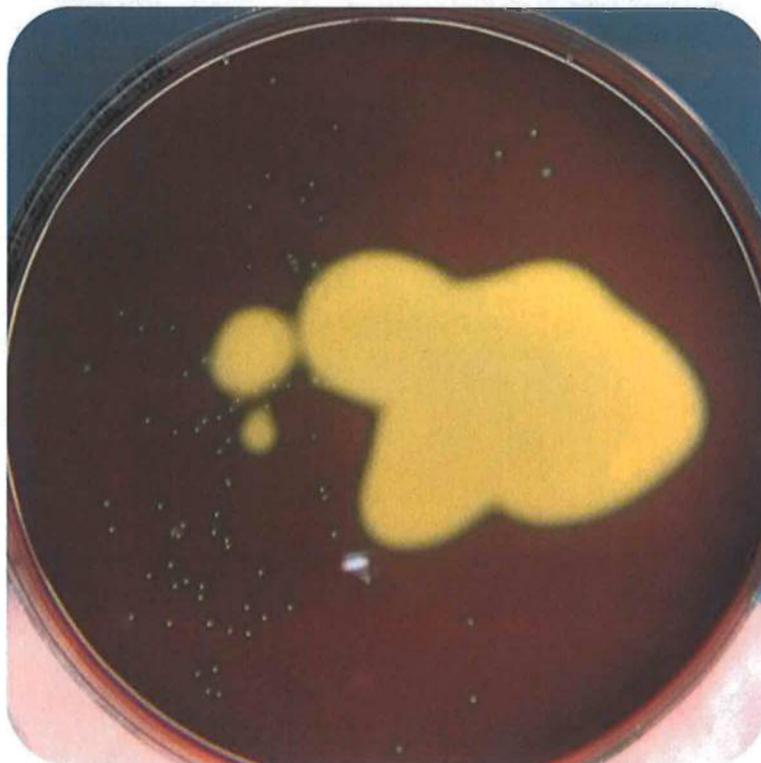


Рисунок 25. Демонстрация ША с культурой пневмококка. Посев СМЖ после пункции спустя 24 часа

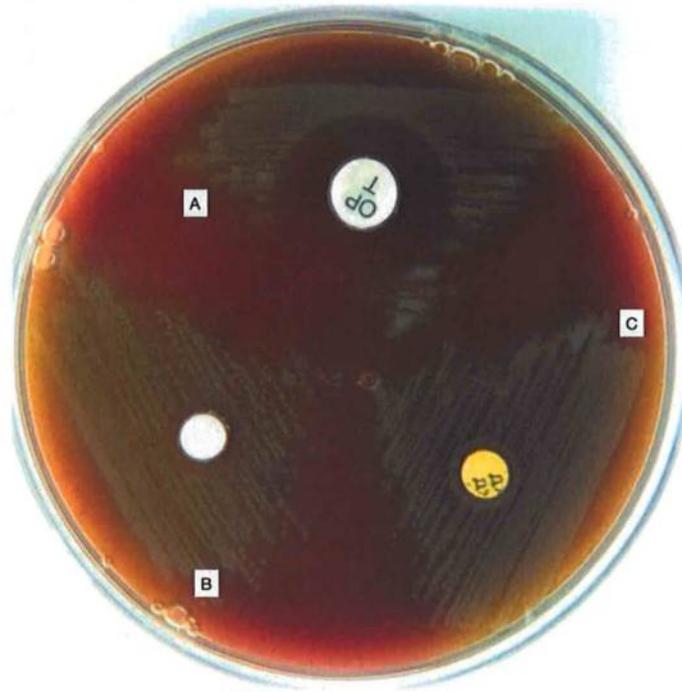


Рисунок 26. Демонстрация КА с культурой пневмококка и тестами: оптохиновый (А), бацитрациновый (В), желчный (С)

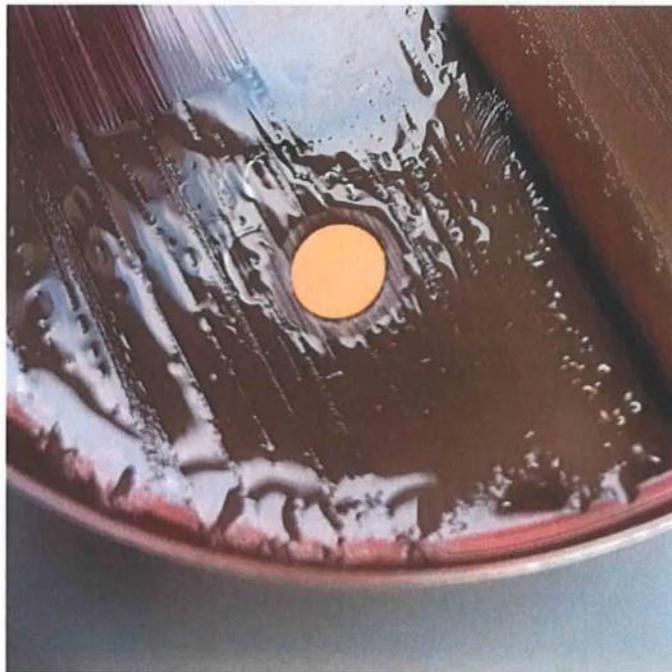


Рисунок 27. Демонстрация КА с культурой пневмококка и желчным тестом

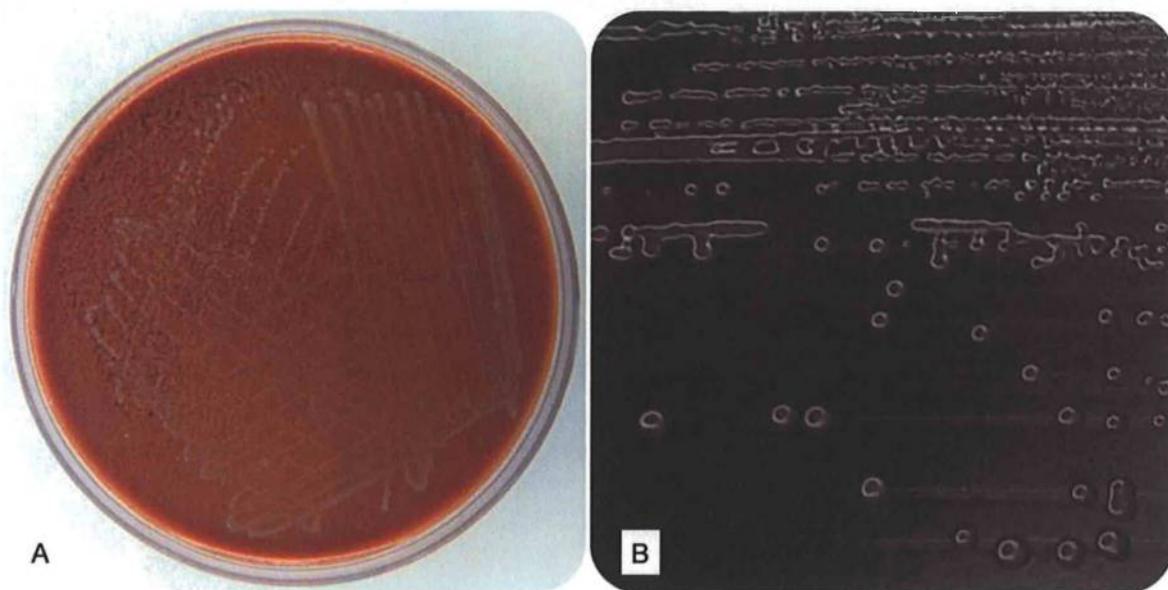


Рисунок 28. Демонстрация ША с культурой гемофильной палочки (А) и единичных колоний (В)

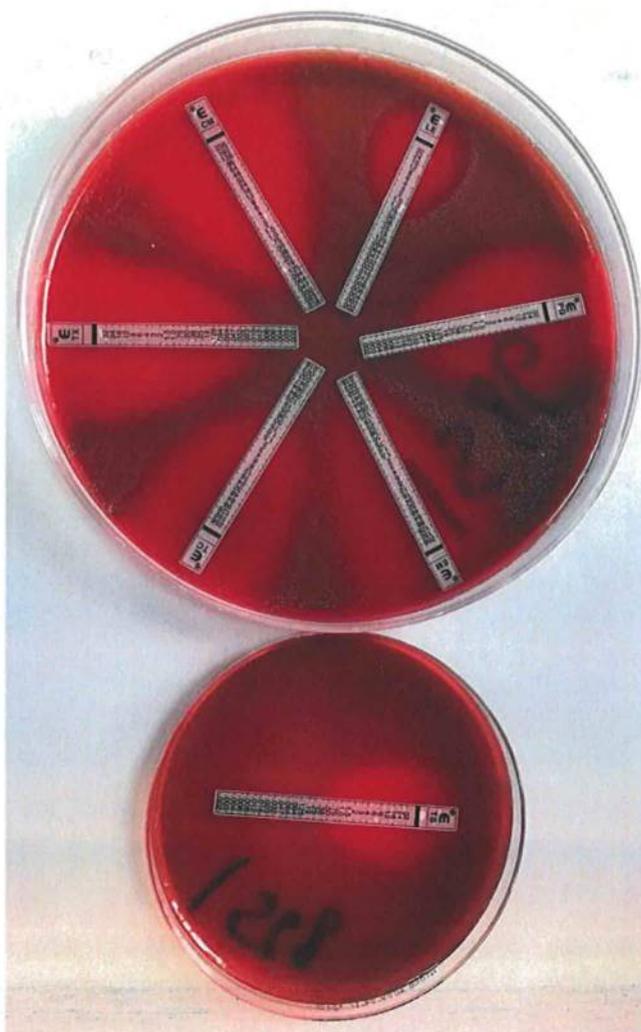


Рисунок 29. Демонстрация КА с культурой пневмококка. Тест на определение чувствительности к АМП методом Е-тестов



Рисунок 30. Демонстрация КА с культурой пневмококка. Тест на определение чувствительности к АМП методом Е-тестов

СХЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУР МЕНИНГОКОККА, ПНЕВМОКОККА, ГЕМОФИЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ

Схема обнаружения *N. meningitidis* в клиническом материале

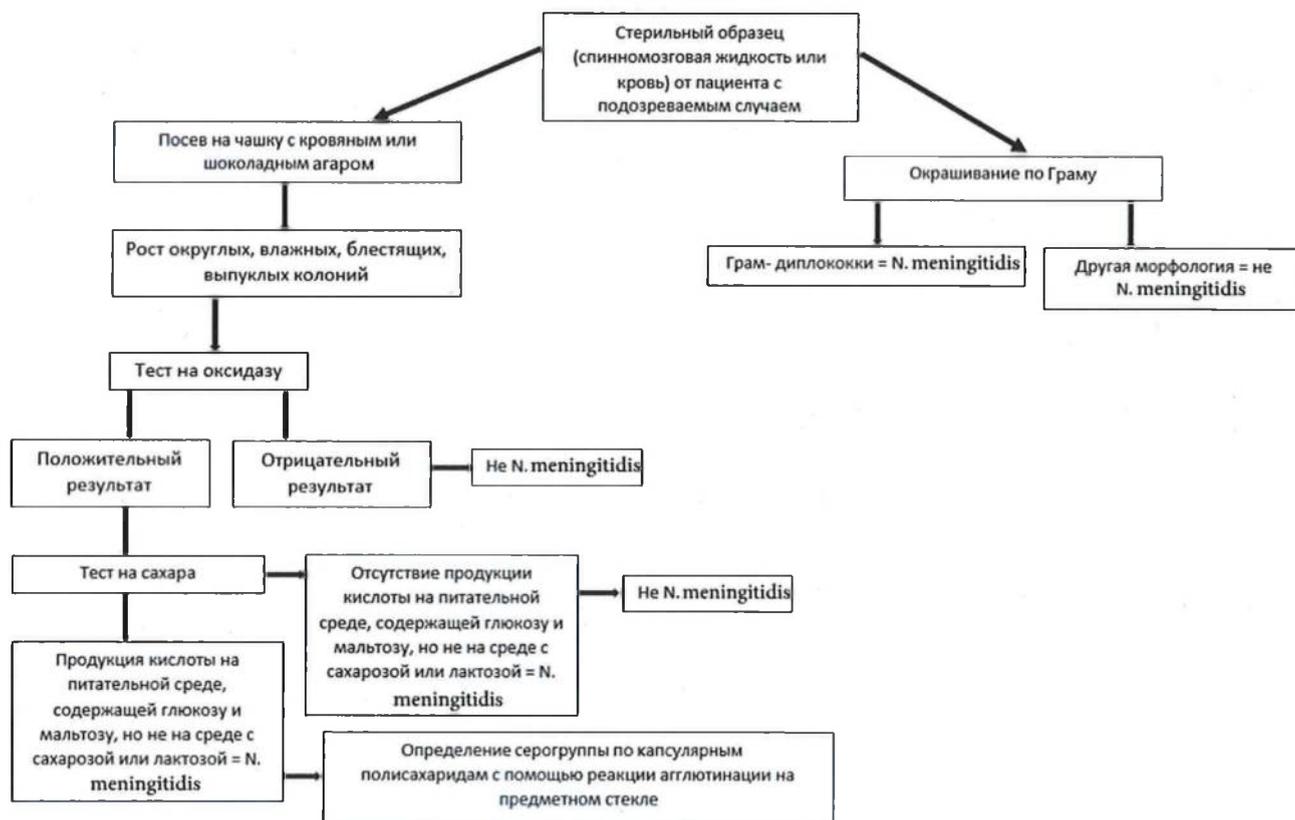


Схема обнаружения *S. pneumoniae* в клиническом материале

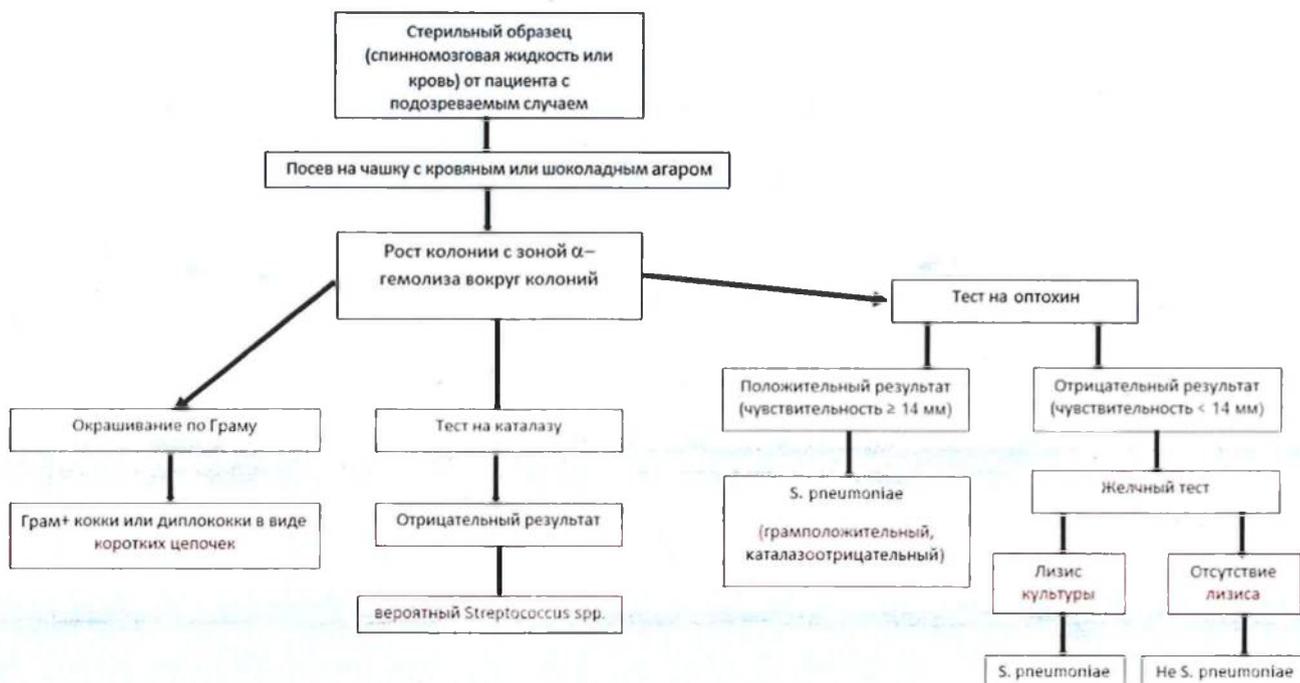
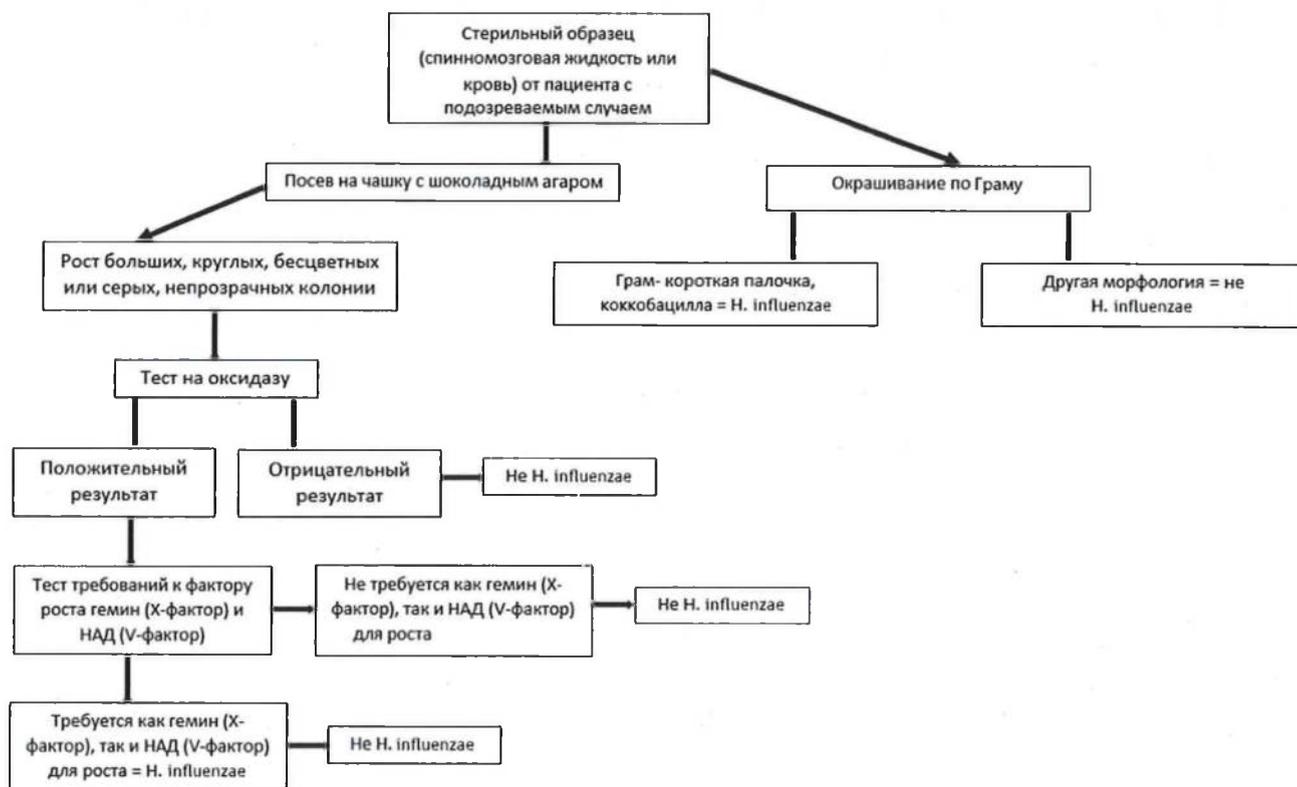


Схема обнаружения *H. influenzae* в клиническом материале



ВРЕМЕННОЙ ГРАФИК ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ГНОЙНЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ МЕНИНГИТ

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

- 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 гемофильной палочкой. Исследование продолжается.»;

- при наличии в мазках единичных бактерий пишут: «В спинномозговой жидкости (крови) при прямой бактериоскопии обнаружены единичные (или парные) клетки кокков (или палочек, например). Исследование продолжается.»;

- при отсутствии каких-либо бактериальных клеток пишут: «В спинномозговой жидкости (крови) при прямой бактериоскопии бактерий не обнаружено.».

На основании результатов РЛА ликвора дают ответ, который в зависимости от результатов формулируют следующим образом:

- при выявлении специфического антигена пишут: «В спинномозговой жидкости выявлен специфический антиген (например, *N. meningitidis*, или *S. pneumoniae*, или *H. influenzae* тип b)».

- при отрицательном результате пишут: «В спинномозговой жидкости специфические антигены не выявлены».

На основании результатов ПЦР диагностики ликвора дают ответ, который в зависимости от результатов формулируют следующим образом:

- при выявлении специфических генетических фрагментов ДНК пишут: «В спинномозговой жидкости выявлены специфические генетические фрагменты ДНК (например, *N. meningitidis*, или *S. pneumoniae*, или *H. influenzae*)».

- при отрицательном результате пишут: «В спинномозговой жидкости специфические генетические фрагменты ДНК (например, *N. meningitidis*, или *S. pneumoniae*, или *H. influenzae* тип b) не выявлены».

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

- 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). Изучение культуры продолжается».

- при отсутствии роста пишут: «При прямом посеве спинномозговой жидкости (крови) роста бактерий не обнаружено. Исследование продолжается.»

6.3. на 3-й день на основании культурально-биохимических свойств бактерии, отсеянных с чашки на 2-й день, выдают окончательный ответ: «Из спинномозговой жидкости (крови) выделена культура менингококка серогруппы А, В (или негруппируемая)». 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 пневмококк или гемофильную палочку, который формулируют: «Из спинномозговой жидкости (крови) выделена культура *S. pneumoniae* или *H. influenzae*.»

6.4. 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 в п. 6.3).

6.5. Окончательный отрицательный ответ выдают не ранее 5-го дня когда при последнем высева 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 роста бактерий не обнаружено».

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ
ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНОГО
БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕНИНГИТА⁵³**

№ п/п	Наименование препарата	Регистрационное удостоверение
1	Набор реагентов АмплиСенс® NmABCW-FL. Определение и дифференциация серогрупп А, В, С и W <i>N. meningitidis</i>	РЗН 2020/9659
2	Набор реагентов АмплиСенс® <i>N. meningitidis</i> / <i>H. influenzae</i> / <i>S. pneumoniae</i> -FL. Выявление и дифференциация <i>N. meningitidis</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i>	ФСР 2011/12380
3	Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп»	ФСР 2008/03147
6	Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов (ГБМ-агар) набор	РЗН 2016/4872
7	Питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению (Шоколадный агар) набор	РЗН 2012/13081
8	Питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению (Гемофилус агар) набор	ФСР 2011/11118
9	Питательная среда для выделения и культивирования менингококков сухая (Менингоагар)	РЗН 2019/9390
10	Питательная среда для бактериологических исследований Колумбийский агар сухой	РЗН 2020/12505
11	Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, сухая (агар Мюллера-Хинтон II)	РЗН 2017/5962
12	Набор реагентов «Диагностикумы эритроцитарные менингококковые полисахаридные групп А, С, жидкие»	ФСР 2012/13064
13	Набор реагентов «Сыворотки диагностические менингококковые для реакции агглютинации»	РЗН 2021/03147
14	Питательная среда для определения чувствительности пневмококка и гемофильной палочки к антибактериальным препаратам «Агар Мюллера-Хинтона с лошадиной кровью и β-NAD»	РЗН 2019/9283
15	Питательная среда для определения чувствительности менингококка к антибактериальным препаратам «Агар Мюллера-Хинтона с бараньей кровью»	РЗН 2015/2845
16	Набор реагентов для количественного определения микробной загрязненности «ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА №1 ГРМ»	ФСР 2011/11415
17	ГРМ-агар «Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар)»	ФСР 2007/00001

⁵³ Примечание: для индикации и идентификации возбудителей гнойного бактериального менингита допускается использовать диагностические препараты с аналогичными или лучшими характеристиками.

Для лабораторной диагностики ГБМ и идентификации штаммов менингококка, пневмококка, гемофильной палочки могут быть использованы диагностические препараты перечисленных или аналогичные прочих производителей, разрешенные к использованию в Российской Федерации в установленном порядке.

Референс-центр по мониторингу за гнойными бактериальными менингитами для диагностических целей, идентификации и проведения исследований штаммов менингококка, пневмококка, гемофильной палочки дополнительными методами при необходимости могут использовать экспериментальные препараты и тест-системы.

НОРМАТИВНЫЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Федеральный закон от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации».
3. Федеральный закон от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности».
4. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
5. Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».
6. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»
7. Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».
8. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».
9. МУ 4.2.2039-05 «Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортировки биоматериалов в микробиологические лаборатории».
10. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».
11. МР 4.2.0160-19 «Определение чувствительности основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов (менингококк, пневмококк, гемофильная палочка) к антибактериальным препаратам диффузным методом Е-тестов»,
12. ГОСТ Р 70393-2022 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Приготовление, производство, хранение и испытания питательных сред».
13. ГОСТ Р 59786-2021 «Клинические лабораторные исследования. Критерии приемлемости партий дегидратированных агара и бульона Мюллера-Хинтон, применяемых для оценки чувствительности к антибиотикам».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Королёва М.А. Гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации: эпидемиология и вакцинопрофилактика / М.А. Королёва, М.И. Грицай, И.С. Королева, В.Г. Акимкин, А.А. Мельникова // *Здоровье населения и среда обитания*. - 2022. - Т. 30. № 12. - С. 73–80.
2. Костюкова Н.Н., Менингококковое носительство: эпидемиология, возбудитель, формирование иммунной защиты / Н.Н. Костюкова, В.А. Бехало // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. - 2017. - №5 (96). - С. 87-97.
3. Burghout, P. Streptococcus pneumoniae folate biosynthesis responds to environmental CO2 levels / P. Burghout, A. Zomer, C.E. van der Gaast-de, E.M. Janssen-Megens, K.-J. Franc, oijs, H.G. Stunnenberg, P.W. Hermans, [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2013. – Vol. 195, no. 7. – P. 1573–1582.
4. Li, L. Comparative Genomic Analysis of Streptococcus pneumoniae Strains: Penicillin Non-susceptible Multi-drug-Resistant Serotype 19A Isolates / Lifeng Li, Juanjuan Zhou, Mingchao Li, Zengyuan Yu, Kaijie Gao, Junwen Yang, Ping Cheng, Junmei Yang, Wancun Zhang, Zhidan Yu & Huiqing Sun // *Curr Microbiol*. - 2022. - 79, 49.
5. Pagliano P., T. Listeria monocytogenes meningitis in the elderly: epidemiological, clinical and therapeutic findings / P. Pagliano, T. Ascione, G. Boccia, F. De Caro, S. Esposito // *Infezioni in Medicina*. - 2016. - 24(2) - P. 105-111.
6. Подкопаев Я.В. Современные питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов / Я.В. Подкопаев, Л.В. Домотенко, А.П. Шепелин // *Современная лабораторная диагностика*. – 2019. – Т. 28. – №. 2. – С. 22-25.
7. Cherazard R. Antimicrobial resistant Streptococcus pneumoniae: prevalence, mechanisms, and clinical implications / R. Cherazard, M. Epstein, T. L. Doan, T. Salim, S. Bharti, M. A. Smith // *American journal of therapeutics*. – 2017. – Vol. 24. no 3. – P. e361-e369.
8. Куркова А.А. Современное состояние антимикробной резистентности Streptococcus pneumoniae и специфической вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции / А.А. Куркова, А.А. Муравьев, Р.С. Козлов // *Пульмонология*. - 2023. – 33(4). - С. 534-541.
9. Leaves N. I. Epidemiological studies of large resistance plasmids in Haemophilus / N. I. Leaves, I. Dimopoulou, I. Hayes, S. Kerridge, T. Falla, O. Secka, D. W. M. Crook // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2000. – Vol. 45. no. 5. – P. 599-604.
10. Abavisani, M. First global report about the prevalence of multi-drug resistant Haemophilus influenzae: a systematic review and meta-analysis / M. Abavisani, M. Keikha, M. Karbalaei // *BMC Infect Dis*. - 2024. - 24, 90.