МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

ВЫДЕЛЕНИЕ МЕНИНГОКОККА ОТ БОЛЬНЫХ И БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ

(Методические рекомендации)

Оренбург — 1984

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

«УТВЕРЖДАЮ»
Начальник Главного санитарно-эпидемиологического управления Министерства здравоохранения СССР
В. Е. Ковшило
№ 3083-84 15.08 1984 г.

ВЫДЕЛЕНИЕ МЕНИНГОКОККА ОТ БОЛЬНЫХ И БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ

(Методические рекомендации)

Оренбург — 1984

Методические рекомендации рассмотрены и рекомендованы к утверждению Лабораторным Советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Министерства здравоохранения СССР

Рекомендации разработаны сотрудниками Оренбургского медицинского института (Б. Я. Усвяцов, Л. А. Зарифуллина, С. Д. Борисов, О. В. Бухарин)

ВВЕДЕНИЕ

Бактериологический метод является основным в диагностике менингококковой инфекции. Однако чувствительность метода недостаточно высока в связи с трудностью выделения возбудителя за счет его внутриклеточного паразитирования*.

В настоящее время у менингококка обнаружено новое свойство: антилизоцимная активность — способность микроорганизмов инактивировать клеточный лизоцим. Установлена прямая коррелятивная связь между степенью антилизоцимной активности менингококков и их способностью к паразитированию и персистированию внутри клетки. На основе этого свойства был разработан новый метод выделения менингококка при разных формах менингококковой инфекции с учетом внутриклеточного паразитирования возбудителя. Сущность метода заключается в том, что накопление менингококка происходит непосредственно в клетках исследуемого материала. Это достигается путем инкубации исследуемого материала в специальных средах для культур ткани (среда Игла или среда-199) и последующего высева материала на соответствующие элективные питательные среды.

Учитывая, что нами ранее была обнаружена способность лизоцима в определенных концентрациях стимулировать рост и размножение менингококка, была сконструирована новая элективная питательная среда с лизоцимом. Экспериментальная проверка разработанной питательной среды в сравнении с существующими элективными питательными средами показала ее определенные преимущества. В связи с этим в разработанном методе по выделению менингококка на эту среду осуществляется высев исследуемого материала после предварительной его инкубации в среде накопления (среда Игла или среда-199). Последующее изучение выделенной чистой

---

* Б. Я. Усвяцов, Л. А. Зарифуллина «Антилизоцимная активность патогенных нейссерий». В кн.: «Факторы естественного иммунитета», Куйбышевский медицинский институт, 1983 г., 77—81.

культуры менингококка проводят по общепринятым методикам.

Предлагаемый метод обеспечивает более полное выделение менингококков и может быть рекомендован в практику бактериологических лабораторий республиканских, краевых, областных, городских и районных санэпидстанций, а также клинических лабораторий стационаров.

Методические рекомендации предназначены для врачей-бактериологов.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МЕНИНГОКОККА ОТ БОЛЬНЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА МЕНИНГИТ

1. Реактивы, приборы, стекло

1.1. Среда Игла или среда-199 — официнальные среды для культур ткани, выпускаются Свердловским НИИ вирусных инфекций, Московским НИИ вирусных препаратов, Институтом полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР.

1.2. Пробирки, ГОСТ 10515, диаметр 15 мм, высота 145—150 мм.

1.3. Центрифуга ЦЛС-3.

1.4. Термостат.

1.5. Пастеровские пипетки.

1.6. Чашки Петри, ГОСТ 7900—56.

1.7. Элективная питательная среда с лизоцимом — см. приложение.

2. Схема выделения возбудителя

Описание этапа исследования	Сущность этапа	Длительность этапа в часах
Взятие исследуемого материала — осадок спинномозговой жидкости	В клетках исследуемого материала (лейкоцитах) находится менингококк	0,5
Посев исследуемого материала в среду Игла или среду-199	Среда Игла или среда-199 поддерживает жизнеспособность клеток и тем самым способствует накоплению в клетках менингококка	0,02
Инкубация посева при 37° С.	Размножение менингококка внутри клеток	2,5—3

Описание этапа исследования	Сущность этапа	Длительность этапа в часах
Центрифугирование материала	Разрушение клеток, выход менингококков в среду и их концентрация	0,25
Посев материала на элективную питательную среду для менингококка, с добавлением в ее состав водного раствора коммерческого лизоцима в концентрации 1.10^{-6}—1.10^{-4} г/мл	Предварительно накопившийся в клетках менингококк засевают на среду с лизоцимом, который оказывает биостимулирующий эффект	0,02

3. Методика выделения возбудителя

3.1. Взятие исследуемого материала проводят в соответствии с общепринятыми инструкциями *.

3.2. Культивирование материала на синтетической среде Игла или среде-199.

Пробирки тщательно моют, прополаскивают дистиллированной водой, просушивают, закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют. Среду разливают стерильно по 0,5—1,0 мл в пробирки. Хранят при +4—6° С в течение 2—3 суток. Перед посевом материала пробирки со средой нагревают при 37° С в течение 20—30 минут. Стерильной пастеровской пипеткой 0,3—0,5 мл осадка спинномозговой жидкости засевают в пробирку со средой и культивируют при 37° С в течение 2,5—3 часов.

3.3. Посев исследуемого материала на плотную элективную питательную среду.

Пробирки с засеянным материалом после культивирования при 37° С в течение 2,5—3 часов центрифугируют при 1000—1500 об/мин в течение 10—15 минут. Стерильной пастеровской пипеткой со дна пробирки берут 0,3—0,5 мл материала и по 2—3 капли засевают в чашки Петри на элективную плотную питательную среду для менингококков с лизоцимом (см. приложение).

Идентификацию выделенной чистой культуры проводят в соответствии с общепринятыми инструкциями *.

---

* «Методические указания по бактериологической диагностике менингококковой инфекции и бактериальных менингитов». Приложение № 2 к приказу Минздрава СССР № 98 от 29 января 1981 г.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МЕНИНГОКОККА ОТ БОЛЬНЫХ НАЗОФАРИНГИТОМ И БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ

1. Реактивы, приборы, стекло

1.1. Ватный тампон, укрепленный на проволоке, изогнутой под углом 135°.*

1.2. Среда Игла или среда-199 — официнальные среды для культур ткани, выпускаются Свердловским НИИ вирусных инфекций, Московским НИИ вирусных препаратов, Институтом полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР.

1.3. Пробирки, ГОСТ 10515—75, диаметр 15 мм, высота 145—150 мм.

1.4. Термостат.

1.5. Чашки Петри, ГОСТ 7900—56.

1.6. Элективная питательная среда с лизоцимом — см. приложение.

2. Схема выделения чистой культуры менингококка

Описание этапа исследования	Сущность этапа	Длительность этапа в часах
Взятие тампоном исследуемого материала — слизь, гной	В клетках исследуемого материала (эпителий, лейкоциты) находится менингококк	0,02
Посев исследуемого материала на тампоне в среду Игла или среду-199	Среда Игла или среда-199 поддерживает жизнеспособность клеток и тем самым способствует накоплению в клетках менингококка	0,02

* «Применение 0,1% полужидкого сывороточного агара с ристомицином при обследованиях на менингококковое носительство», Методические рекомендации, Казань, 1977, стр. 5.

Описание этапа исследования	Сущность этапа	Длительность этапа в часах
Инкубация посева при 37° С	Размножение менингококка внутри клеток	2,5—3
Посев с тампона материала на элективную питательную среду для менингококка с добавлением в ее состав водного раствора коммерческого лизоцима в концентрации 1.10^{-6}—1.10^{-4} г/мл	Предварительно накопившийся в клетках менингококк засевается на питательную среду с лизоцимом, который оказывает биостимулирующий эффект	0,02

3. Методика выделения чистой культуры менингококка

3.1. Взятие исследуемого материала проводят в соответствии с общепринятыми инструкциями *.

3.2. Культивирование материала на синтетической среде Игла или среде-199.

Пробирки тщательно моют, прополаскивают дистиллированной водой, просушивают, закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют. Среду разливают стерильно по 1,5—2,0 мл в пробирки. Хранят при +4—6° С в течение 2—3 суток. Перед посевом материала пробирки со средой нагревают при 37° С в течение 20—30 минут.

Тампон с исследуемым материалом помещают в пробирку со средой и культивируют при 37° С в течение 2,5—3 часов. В случае необходимости тампон с исследуемым материалом в среде Игла или среде-199 может транспортироваться в течение 3 часов при температуре не ниже 25° С с последующей инкубацией при 37° С 2,5—3 часа.

3.3. Посев исследуемого материала на плотную элективную питательную среду.

После выдерживания исследуемого материала в термостате в течение 2,5—3 часов тампон отжимают о стенки пробирки изнутри, извлекают из пробирки и штрихами с отрывом засевают на 0,5 чашки с линкомициновым (ристомици-

---

* «Методические указания по бактериологической диагностике менингококковой инфекции и бактериальных менингитов». Приложение № 2 к приказу Минздрава СССР № 98 от 29 января 1981 года.

новым) агаром и 0,5 чашки с сывороточным агаром, содержащим лизоцим *.

Просмотр посевов осуществляется через 24 и 36 часов. На элективной питательной среде с лизоцимом наблюдают типичный рост колоний менингококков.

Отбор подозрительных колоний, выделение чистой культуры и ее идентификацию проводят в соответствии с общепринятыми инструкциями **.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный метод выделения чистой культуры менингококка показал его очевидные преимущества по сравнению с классическим методом диагностики: в 1,8—2 раза повысилась частота бактериологического подтверждения диагноза болезни и выявления бактерионосителей.

---

* Линкомициновый (ристомициновый) агар готовят по общепринятой инструкции «Методические указания по бактериологической диагностике менингококковой инфекции и бактериальных менингитов», приложение № 2 к приказу Министерства здравоохранения СССР № 98 от 29 января 1981 года. Приготовление сывороточного агара с лизоцимом — см. в приложении.

** Приложение № 2 к приказу Минздрава СССР № 98 от 29 января 1981 года.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НОВОЙ ЭЛЕКТИВНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ С ЛИЗОЦИМОМ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕНИНГОКОККА

На 80 мл расплавленного и охлажденного до 60° С 1,5% питательного агара на бульоне из перевара Хоттингера (pH — 7,4—7,6), или 1,5% питательного агара Дагестанского института питательных сред добавляют 20 мл нормальной лошадиной сыворотки и 1,0 мл раствора лизоцима в концентрации 1.10^{-6}—1.10^{-4} г/мл (лизоцим разводят в стерильном физиологическом растворе).

Используют официнальный препарат лизоцима из яичного куриного белка производства завода «Мосмедпрепараты» или Олайнского завода химреактивов (ГОСТ — ТУ 6-09-10-1306-78). Лизоцим в растворе можно хранить в холодильнике при +4—6° С в течение 7 дней. Полученную элективную питательную среду разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

Лошадиная сыворотка выпускается институтом им. Мечникова (г. Уфа). Перед употреблением сыворотка инактивируется на водяной бане при 56° С в течение 30 минут.

gost.e-ecolog.ru

ФВ02789. 6.11 1984 г. Тираж 500. Заказ 2201

Типография изд-ва «Южный Урал»