Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов

Методические рекомендации
МР 4.2.0078/1—13

Издание официальное

Москва • 2014

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов

Методические рекомендации
МР 4.2.0078/1—13

ББК 51.9
И88

И88 **Использование** питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.—11 с.

ISBN 978—5—7508—1265—3

1. Разработаны ФБУН ГНЦПМБ Роспотребнадзора (И. А. Дятлов, Я. В. Подкопаев, Л. В. Домотенко, Т. П. Морозова, М. В. Храмов); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова, Н. А. Кошкина).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 21 октября 2013 г.

3. Введены в действие с момента утверждения.

ББК 51.9

ISBN 978—5—7508—1265—3

© Роспотребнадзор, 2014
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014

Содержание

1. Область применения 4
2. Общие положения 4
2.1. Характеристика возбудителей 4
2.2. Питательные среды, используемые для лабораторной диагностики бактериальных менингитов 6
2.3. Гемофилус-агар 7
2.4. Шоколадный агар 7
2.5. ГБМ-агар 7
3. Аналитические и диагностические характеристики питательных сред 8
3.1. Гемофилус-агар 8
3.2. Шоколадный агар и ГБМ-агар 8
4. Проведение анализа 9
4.1. Приготовление питательных сред 9
4.2. Посев и инкубация 10
4.3. Учёт результатов. 10
5. Условия хранения и эксплуатации питательных сред 10
6. Меры предосторожности 10
7. Заключение 11
Список литературы 11

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

Г. Г. Онищенко

21 октября 2013 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов

Методические рекомендации МР 4.2.0078/1—13

1. Область применения

1.1. Методические рекомендации предназначены для врачей-бактериологов, эпидемиологов, лаборантов и других специалистов, занимающихся проблемами гнойных бактериальных менингитов и других инфекций, вызываемых *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*.

1.2. В методических рекомендациях приведены общие сведения о трёх основных возбудителях гнойных бактериальных менингитов: *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*. Подробно обсуждаются вопросы, касающиеся свойств и использования питательных сред для выделения и культивирования основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов.

2. Общие положения

2.1. Характеристика возбудителей

Гнойные бактериальные менингиты (ГБМ) – заболевания, при которых локализация инфекционного процесса происходит в мягких мозговых оболочках основания головного мозга и верхней части спинного мозга. Этиологическими агентами ГБМ могут быть различные микроорганизмы: *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Candida albicans*,

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и другие. Из них более 90 % расшифрованных случаев бактериальных менингитов приходится на *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* типа b, из-за чего основные усилия в лабораторной диагностике при подозрении на ГБМ направлены на выделение этих возбудителей.

N. meningitidis – грамотрицательные неподвижные, неспорообразующие кокки. Экзотоксина не образуют, при гибели микробной клетки высвобождается эндотоксин липополисахаридной природы. В соответствии с особенностями строения полисахаридной капсулы менингококки подразделяют на 12 серогрупп: A, B, C, X, Y, Z, W-135, 29-E, K, H, L, I. Менингококки чрезвычайно чувствительны к воздействию внешней среды. Температурный оптимум жизнедеятельности 37 °С в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 (5—10 %) и влажности. Нуждаются в высокопитательных средах, содержащих нативные белки или кровь животного происхождения.

H. influenzae – небольшие (0,3—0,4 × 1—1,5 мкм) грамотрицательные, сферические, овальные и палочковидные клетки. Неподвижные, неспорообразующие, медленно окрашиваются анилиновыми красителями. Основной фактор вирулентности – капсула. 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. Большинство инвазивных инфекций вызывается штаммами *H. influenzae* типа b. Капсула типа b состоит из полирибозилрибитолфосфата, то есть содержит в качестве мономера пентозу (рибозу) в отличие от других типов, содержащих гексозу. Бескапсульные штаммы обозначаются как нетипируемые. Для роста гемофильных палочек необходимо наличие в среде факторов роста X (гемин или гематин) и V (кофермент никотинамидадениндинуклеотид – НАД). Оптимальная температура культивирования 37 °С в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 (5—10 %).

S. pneumoniae – грамположительные овальные, иногда вытянутые вдоль оси ланцетовидные кокки диаметром 0,5—1,0 мкм, располагаются парами и окружены общей капсулой, неподвижны, спор не образуют, являются факультативными анаэробами, хемоорганотрофы. По капсульному антигену проводят типоспецифическую дифференцировку пневмококков, которых насчитывают не менее 90 серотипов. Пневмококки нуждаются в богатых питательных средах с высоким содержанием аминного азота и нативного белка животного происхождения. Темпера-

турный оптимум жизнедеятельности 37 °С в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 (5—10 %).

2.2. Питательные среды, используемые для лабораторной диагностики бактериальных менингитов

Одним из основных этапов лабораторной диагностики ГБМ является бактериологический посев на питательные среды с целью выделения возбудителя заболевания.

Для выделения *N. meningitidis* используют полужидкий сывороточный агар, сывороточный, кровяной и шоколадный агары. При культивировании *S. pneumoniae* предпочтение отдаётся кровяному агару. Кроме того, *S. pneumoniae* культивируют на шоколадном, сывороточных агарах и на полужидком сывороточном агаре.

H. influenzae не растёт на простых и сывороточных питательных средах. Кровяные агары не подходят для культивирования *H. influenzae* из-за содержащихся в нативной крови никотинамидадениндинуклеотидаз (НАДаз), инактивирующих фактор V. Основной средой для культивирования и выделения *H. influenzae* является шоколадный агар. Термическая обработка, которой подвергается кровь в процессе приготовления шоколадного агара, позволяет частично лизировать эритроциты, высвобождая тем самым факторы роста и разрушая НАДазы. Оптимальной средой, поддерживающей рост всех трёх основных возбудителей ГБМ, является шоколадный агар. В настоящее время в отечественной практике сывороточный, кровяной и шоколадный агары готовят в лабораторных условиях, в качестве основы используя агар Хоттингера, колумбийский агар, агар для бруцелл, питательную среду для определения чувствительности микробов к антибиотикам (АГВ), эритрит-агар. Руководством по лабораторным методам диагностики бактериальных менингитов, разработанных ВОЗ, для этих целей рекомендованы триптиказо-соевый агар (*trypticase soy agar*), сердечно-мозговой агар (*brain heart infusion agar*) и гонококковый агар (GC agar).

Биологические и физико-химические показатели качества шоколадного и кровяного агаров зависят от качества и типа используемой крови. Для приготовления данных сред используют дефибринированную баранью, лошадиную кровь и кровь крупного рогатого скота. Человеческая кровь содержит антитела, которые могут ингибировать рост микроорганизмов, поэтому она пригодна только для приготовления шоколадного агара. Кровь, используемая для приготовления питательных сред, не должна содержать консерванты, что ограничивает срок её годности и температурный режим хранения. Все перечисленные факторы

создают проблемы при лабораторном изготовлении кровяных и шоколадных питательных сред. Дополнительные трудности возникают при приготовлении шоколадного агара, поскольку его качество и стандартность зависят не только от качества используемой крови, но и от навыков и умения лаборанта в процессе прогревания питательной среды.

Решение проблемы стандартности питательных сред возможно при использовании коммерческих питательных сред. Ряд иностранных фирм-производителей питательных сред выпускают питательные среды, в которых нативная кровь заменена сухим гемоглобином и ростовыми добавками. Эти среды, как сухие, так и готовые к применению, используются для выделения и культивирования всех трёх основных возбудителей ГБМ.

В нашей стране для выделения и культивирования основных возбудителей ГБМ разработаны три питательных среды: питательная среда для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению (шоколадный агар); питательная среда для культивирования и выделения гемофильной палочки, готовая к применению (гемофилус-агар) и питательная среда для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая (ГБМ-агар).

2.3. Гемофилус-агар

Предназначен для бактериологических исследований в клинической микробиологии при анализе клинического материала от больных с подозрением на бактериальный менингит и другими заболеваниями инфекционной природы, вызываемыми бактериями рода *Haemophilus*, а также при работе с чистыми культурами *Haemophilus*.

2.4. Шоколадный агар

Предназначен для бактериологических исследований в клинической микробиологии при анализе клинического материала от больных с подозрением на бактериальный менингит и другими заболеваниями инфекционной природы, вызываемыми бактериями *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, а также при работе с чистыми культурами *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*.

2.5. ГБМ-агар

Предназначен для бактериологических исследований с целью выделения и культивирования бактерий *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*.

3. Аналитические и диагностические характеристики питательных сред

3.1. Гемофилус-агар

Обеспечивает рост тест-штаммов *H. influenzae* 423 и *H. influenzae* АТСС 9006 при посеве по 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-6} через 18—24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С в атмосфере 5—10 % CO_2 в виде слизистых, круглых, сероватого цвета, полупрозрачных колоний диаметром до 2 мм. Питательная среда подавляет рост тест-штаммов микробов-ассоциантов *Streptococcus pyogenes* Dick-1 и *N. meningitidis* А 208 при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-4}, приготовленной по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85-09П.

3.2. Шоколадный агар и ГБМ-агар

На шоколадном агаре и ГБМ-агаре без введения селективных добавок тест-штаммы растут следующим образом:

– *H. influenzae 423*, *H. influenzae* АТСС 49247 – в виде слизистых, круглых, полупрозрачных, сероватого цвета колоний диаметром 1,0—2,0 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-6} через 18—24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С в атмосфере 5—10 % CO_2;

– *N. meningitidis* А 208, *N. meningitidis* АТСС 13102 – в виде полупрозрачных, выпуклых с ровными краями колоний диаметром до 2 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-6} через 18—24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С в атмосфере 5—10 % CO_2;

– *S. pneumoniae* АТСС 6305 – в виде нежных полупрозрачных чётко очерченных, не склонных к слиянию колоний диаметром 0,4—0,6 мм при посеве 0,1 мл взвеси из разведения 10^{-5} через 18—24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С в атмосфере 5—10 % CO_2. Допускается наличие плоских с центральным углублением колоний. В зоне роста культуры на чашках с шоколадным агаром наблюдается позеленение питательной среды, на чашках с ГБМ-агаром – обесцвечивание питательной среды.

При использовании соответствующих селективных добавок шоколадный агар и ГБМ-агар обеспечивают избирательный рост тест-штаммов.

С селективной добавкой СД-Г обе питательные среды обеспечивают рост штаммов *H. influenzae* 423 и *H. influenzae* АТСС 49247 при посеве 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-6} и подавляют рост тест-штаммов: *S. pneumoniae* АТСС 6305, *N. meningitidis* А 208,

N. meningitidis АТСС 13102 и *C. albicans* АТСС 60193 при посеве 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-4} через 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С.

С селективной добавкой СД-П обе питательные среды обеспечивают рост *S. pneumoniae* АТСС 6305 при посеве 0,1 мл взвеси тест-штамма из разведения 10^{-5} и подавляют рост тест-штаммов: *N. meningitidis* А 208, *N. meningitidis* АТСС 13102, *H. influenzae* 423, *H. influenzae* АТСС 49247 и *C. albicans* АТСС 60193 при посеве 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-4} через 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С.

С селективной добавкой СД-М обе питательные среды обеспечивают рост *N. meningitidis* А 208 и *N. meningitidis* АТСС 13102 при посеве 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-6} и подавляют рост тест-штаммов: *S. pneumoniae* АТСС 6305, *H. influenzae* 423, *H. influenzae* АТСС 49247 и *C. albicans* АТСС 60193 при посеве 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-4} через 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С.

4. Проведение анализа

4.1. Приготовление питательных сред

Питательные среды готовят в соответствии с инструкциями по применению данных препаратов. Для приготовления гемофилус-агара и шоколадного агара бутылки с основами выдерживают в кипящей водяной бане до полного расплавления агара. Возможно расплавление основ питательных сред в автоклаве в режиме «стерилизации текучим паром». Содержимое флаконов с ростовыми добавками и, при необходимости, с селективными добавками растворяют в стерильной дистиллированной воде и добавляют в остывшую до (45—50) °С основу. Перемешивают и разливают в чашки Петри.

Для приготовления ГБМ-агара навеску основы в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, растворяют в дистиллированной воде, стерилизуют автоклавированием. Содержимое флаконов с ростовыми добавками и, при необходимости, с селективными добавками растворяют в стерильной дистиллированной воде и добавляют в остывшую до 45—50 °С основу. Перемешивают и разливают в чашки Петри. Растворы ростовых и селективных добавок не хранить, использовать немедленно после приготовления!

4.2. Посев и инкубация

Перед посевом чашки со средами выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 10—15 мин. Посев анализируемых образцов производят сразу же после их получения.

Чашки с посевами инкубируют в перевёрнутом положении (крышкой вниз) в атмосфере, обогащённой углекислым газом (5—10 %) при температуре (37 ± 1) °С, время инкубации зависит от типа образца и целей исследования.

4.3. Учёт результатов

Учёт результатов проводят визуально по наличию характерных колоний через 18—48 ч инкубации.

H. influenzae формирует на всех средах слизистые, круглые, серовато цвета колонии диаметром до 2 мм.

N. meningitidis формирует на шоколадном агаре и ГБМ-агаре полупрозрачные, выпуклые с ровными краями колонии диаметром до 2 мм.

S. pneumoniae формирует на шоколадном агаре мелкие, нежные, полупрозрачные, чётко очерченные колонии с позеленением питательной среды в зоне роста культуры, а на ГБМ-агаре – мелкие, нежные, полупрозрачные, чётко очерченные колонии с обесцвечиванием питательной среды в зоне роста культуры.

5. Условия хранения и эксплуатации питательных сред

Бутылки с основами гемофилус-агара, шоколадного агара и флаконы с ростовыми и селективными добавками хранят герметически закрытыми при температуре 2—8 °С. Банки с основой ГБМ-агара хранят герметически закрытыми при температуре от 2 до 25 °С.

Срок годности гемофилус-агара и шоколадного агара – 1 год.

Срок годности ГБМ-агара – 2 года.

Срок годности всех питательных сред в чашках Петри при температуре 2—8 °С – не более 7 дней.

Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкций по применению данных сред.

6. Меры предосторожности

При работе с клиническими образцами и микробными культурами необходимо соблюдать СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной

гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения Российской Федерации» (М., 1981).

7. Заключение

Ключевым этапом в диагностике ГБМ является бактериологический посев на питательные среды. От их качества зависит достоверность и воспроизводимость результатов анализа. Применение питательных сред, изготовленных промышленным способом, позволяет стандартизовать и оптимизировать бактериологические исследования, а также повысить эффективность диагностики бактериальных менингитов.

Список литературы

1. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenza: WHO manual 2nd edition. WHO/IVB.11.09. World Health Organization, Geneva, 2011.

2. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*: методические рекомендации /Под ред. Л. С. Страчунского //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2. № 2. С. 93—109.

3. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*: методические рекомендации /Под ред. Л. С. Страчунского //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2. № 1. С. 88—98.

4. Козлов Р. С. Пневмококки: уроки прошлого – взгляд в будущее. Смоленск: МАКМАХ, 2010. 128 с.

5. Королева И. С. и др. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты: руководство по лабораторной диагностике /И. С. Королева, Г. В. Белошицкий. М., 2007. 112 с.

6. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005. 48 с.

7. Медицинская микробиология /Под ред. В. И. Покровского, О. К. Поздеева. М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. 1 200 с.

Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов

Методические рекомендации
МР 4.2.0078/1—13

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломзнова

Подписано в печать 06.03.14

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75
Тираж 200 экз. Заказ 19

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 8(495)952-50-89

gost.e-ecolog.ru