ГБОУ ВПО «РостГМУ»

Министерство здравоохранения РФ

Колледж

Реферат

по дисциплине МДК 04.01 Теория и практика лабораторных микробиологических исследований

на тему:

«Методы лабораторной диагностики менингококковой инфекции»

Выполнила: студентка 2 курса 21 группы

Отделения Лабораторная диагностика

Крылова И.М.

Преподаватель: Тагиров З.Т.

г.Ростов-на-Дону

г

Содержание

Возбудитель менингококковой инфекции

Факторы патогенности менингококка

Эпидемиология

Формы менингококковой инфекции

Методы отбора материала для исследования

Доставка и хранение материала

Методы исследования

Список литературы

Введение

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

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

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

Данные лабораторной диагностики бактериальных менингитов и изучение основных биологических свойств у возбудителей лежат в основе определения прогностических критериев в системе эпидемиологического надзора за бактериальными менингитами, в том числе и генерализованными формами менингококковой инфекции (ГФМИ).

Необходимо учитывать, что одним из проявлений ГФМИ является распространенная клиническая форма «менингококковый менингит» без менингококкцемии, при которой точный клинический диагноз без проведения лабораторных исследований поставить невозможно.

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

Возбудитель менингококковой инфекции

Менингококк Neisseria menengitidis - патогенный представитель рода нейссерий; описан Weichselbaum в 1887 г. Менингококк может существовать только в организме человека и является возбудителем нозоформы «менингококковая инфекция». Микроорганизм колонизирует слизистую оболочку задней стенки глотки и, в зависимости от вирулентности штамма и резистентности зараженного лица, вызывает инфекционный процесс с широким диапазоном проявлений: бессимптомное бактерионосительство, назофарингит и генерализованные формы - менингококкемию (сепсис), менингит, иногда поражения суставов, полости перекарда, пневмонию. От человека человеку передается капельным (аэрозольным) путем.

Морфологически менингококк представаляет собой круглые клетки; в патологическом материале (гнойная спинномозговая жидкость, кровь) клетки сходны с кофейными зёрнами или бобами, часто располагаются попарно. Не образует спор, но обладают способностью к капсулообразованию, проявляющуюся только в организме человека, так как капсула защищает менингококк от фагоцитоза. На поверхности кокка, пронизывая капсулу, располагаются перитрихиально пили - одиночные или в виде пучков. Жгутиков не имеет.

Менингококк грамотрицателен, но клетки обесцвечиваются спиртом с разной интесивностью. Для лучшей дифференциации рекомендуется использовать окраску по Граму в модификации Г.П. Калины. На основании неоднородности капсул штаммы менингококка делят на серологические группы.

Менингококк эволюционно приспособлен существовать только в организме человека. Для построения белков они используют готовые аминокислоты и прочие компоненты непосредственно из организма хозяина.

Менингококк - аэроб, который большую часть энергии получает путем окисления при помощи кислорода воздуха (оксидации) ряда углеводов.. menengitidis относится к трудно культивируемым бактериям. Ему необходимы питательные среды, содержащие готовые аминокислоты. Для его культивирования используют продукты триптического расщепления белка (казеина, мяса, рыбы, сои), а также различные ростовые факторы и витамины. Поэтому для культивирования менингококка к высокопитательным основам (жидким, агаровым), добавляют нормальную лошадиную или бычью сыворотку, или кровь; используют среды с куриным желтком. При малейшем отклонении от оптимума температуры (370) развитие прекращается. Рост менингококка заметно улучшается при наличии 5-7% СО2 в окружающей атмосфере. На сывороточном бульоне менингококк растет в виде гомогенной мути ближе к поверхности среды; на сывороточном агаре через 22-24 часа образует нежные влажные голубоватые в проходящем свете, слегка опалесцирующие, круглые, плоские колонии диаметром 0,5-1,0 мм с ровными краями. На кровяном агаре колонии сероватые, не вызывают изменения крови. Биохимически менингококк достаточно активен - наряду с общими для всех нейссерий оксидазой и каталазой он имеет сахаролитические ферменты, расщепляющие только глюкозу и мальтозу до органических кислот без газа. Менингококк - слабый кислотообразователь, поэтому на несбалансированных средах образующаяся кислота может нейтрализоваться щелочными продуктами, одновременно выделяющимися при разложении аминокислот.

Факторы патогенности менингококка

Факторами вирулентности менингококков являются капсульные полисахариды, обеспечивающие их резистентность к фагоцитозу, пили, с помощью которых бактерии при крепяются к рецепторам эпителиальных клеток. Адгезивную функцию несут также белки наружной мембраны клеточной стенки.

Менингококки продуцируют нейраминидазу и гиалуронидазу, способствующие их инвазии в ткани. Менингококки образуют эндотоксин - ЛПС клеточной стенки, который часто обнаруживается у больных в крови и спинномозговой жидкости. Он играет ведущую роль в развитии генерализованных форм инфекции и может вызвать эндотоксический шок. Высокие концентрации эндотоксина в крови приводят к снижению фракций комплемента (С2, СЗ и С4) в несколько раз. В большинстве случаев попадание менингококков на слизистую оболочку верхних дыхательных путей не вызывает заметных нарушений, но может привести к возникновению носительства. Только иногда (1519% случаев) попадание возбудителя на слизистую оболочку носа, і лотки и, возможно, бронхов приводит к развитию воспаления. Возбудитель может попадать в кровь, и тогда возникает бактериемия, которая сопровождается распадом менингококков. Это приводит к токсемии, играющей важную роль в патогенезе болезни.

Эпидемиология

Единственным источником менингококковой инфекции в природе является человек, верхние дыхательные пути которого колонизированы менингококком. Это больные генерализованными формами, назофарингитом и здоровые носители. Возбудитель передается аэрозольным путем при экспираторных актах (выдохе, кашле, чиханьи), а также через зараженные слюной предметы (соски, игрушки, ложки, посуду). Наиболее мощными выделителями менингококка являются больные генерализованными формами и назофарингитом, но основным резервуаром менингококка в природе являются здоровые носители по причине их многочисленности и замаскированности. Менингококк нестоек во внешней среде, поэтому инфекция распространяется преимущественно в помещениях при большой скученности людей в холодное время года или при отсутствии элементарных санитарно-гигиенических условий (общие полотенца, постели, посуда, детские игрушки). Наиболее восприимчивыми к генерализованным формам являются дети первых лет жизни, не успевшие приобрести иммунитет в результате повторных эпизодов носительства. Для взрослых и подростков более характерны менингококковые назофарингиты и здоровое носительство.

Однако для юношеского возраста также характерна несколько повышенная заболеваемость. Это связано с перемещениями молодых людей из отдаленных мест проживания с низкой плотностью населения в переуплотненные коллективы (общежития, казармы), расположенные в густонаселенных местах. Поскольку у этих молодых людей отсутствует естественно приобретенный иммунитет, встреча с менингококком для них чревата генерализованной инфекцией.

Для генерализованных форм менингококковой инфекции характерны периодические подъемы ( 1 раз в 10 лет и реже) и зимне-весенняя сезонность. Эпидемический процесс имеет «вялое» течение, что объясняют нестойкостью менингококка во внешней среде, препятствующей рассеиванию возбудителя. Каждый подъем заболеваемости происходит на фоне возрастания числа бактерионосителей (до 10-20%) и больных назофарингитом в окружении заболевших и среди населения в целом. Склонность к эпидемическому распространению имеет менингококк серогруппы А. В ряде зарубежных стран - Чили, Куба, Норвегия, Великобритания - описаны вспышки, вызванные серогруппами В и С, имеющими серотипы 2а, 4 и 15 и субтипы Р1.7;Р1.15 и ряд других.

Формы менингококковой инфекции

Различают несколько этапов менингококковой инфекции, проявляющихся определенными чертами.

Первым этапом является колонизация слизистой оболочки ротоглотки, протекающая бессимптомно в течение 2-7 дней. Иногда колонизация затягивается на недели и даже месяцы. Этот этап называется «здоровым» бактерионосительством и считается субклинической формой болезни. Бактерионосительство - наиболее частая форма менингококковой инфекции. Несмотря на бессимптомное течение, в результате перенесения бактерионосительства возникает иммунный ответ к менингококку.

У небольшой части инфицированных лиц (1/3-1/6) менингококк проникает в подслизистое пространство ротоглотки и вызывает местный воспалительный процесс - назофарингит. Этот этап уже манифестирован клинически. Наблюдается общая слабость, субфебрильная температура, головная боль и боль при глотании, сухой кашель, иногда ринит со скудными выделениями. Задняя стенка глотки гиперемирована, отечна, иногда покрыта слизью, на 2-3 день заметны отдельные гиперплазированные фолликулы. У маленьких детей воспаление захватывает мягкое небо и миндалины. Обычно назофарингит оканчивается полным выздоровлением.

Описанные формы называются первично-локализованными. У очень небольшой части инфицированных лиц возникают генерализованные формы - менингококкемия, менингит или их сочетание. Этот этап генерализованной инфекции может, кроме того, проявляться в виде менингококковой пневмонии, эндокардита, артрита, иридоциклита.

Менингококцемия - менингококковый сепсис, возникает или «на фоне полного здоровья» (когда первые этапы прошли незамеченными), или после начавшегося назофарингита и протекает, как тяжелое септическое заболевание с интоксикацией. Для менингококкемии характерны петехиальные высыпания на коже, содержащие менингококки в окружении затромбированных сосудов. Иногда петехии некротизируются (вплоть до сухой гангрены). Поражаются почки, миокард, отмечаются перикардиты, полиартриты, пневмония.

Менингит - воспаление мозговых оболочек развивается остро на фоне назофарингита и проявляется тяжелым лихорадочным состоянием и нарастанием менингеальных симптомов. Нередко наблюдается изменение сознания вплоть до комы. Возможно развитие острого отека мозга. Иногда менингит переходит в менингоэнцефалит. СМЖ обычно изменена, мутная, реже желтовато-зеленого цвета, при пункции часто вытекает под давлением. В ней имеется большое число нейтрофилов, белка, но содержание глюкозы снижено.

Методы отбора материала для исследования

диагностика менингококковый инфекция

Основным биологическим материалом для исследования при бактериальных менингитах служат спинно-мозговая жидкость и кровь. Для бактериологического подтверждения менингококкового назофарингита и выявления назофарингеального менингококкового носительства исследуют носоглоточную слизь.

Спинно-мозговая жидкость

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

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

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

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

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

· 0,5 мл ликвора засевают в среду обогащения (в 5,0 мл 0,1 %-го полужидкого питательного агара) непосредственно у постели больного и далее хранят при 37 °С в условиях термостата до доставки в лабораторию.

Кровь

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

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

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

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

Назофарингеальная слизь

Назофарингеальную слизь с задней стенки глотки берут натощак или через 3 - 4 часа после еды стерильным ватным тампоном. Материал берут с обязательным надавливанием шпателем на корень языка для наиболее полного открытия глоточного отверстия. Тампон вводят ватным концом кверху за мягкое небо в носоглотку и проводят 2 - 3 раза по задней стенке. При извлечении из носоглотки тампон не должен касаться окружающих тканей (зубы, слизистая щек, язык, небный язычок). После извлечения из носоглотки содержащуюся на тампоне слизь засевают на чашки (сывороточный агар и сывороточный агар с линкомицином) или помещают в транспортную среду для немедленной доставки в лабораторию. Допускается применение готовых питательных транспортных сред, разрешенных к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

Доставка и хранение материала

Материал для бактериологических и серологических исследований доставляют в бактериологическую лабораторию немедленно после отбора в специальных контейнерах, способных поддерживать температуру 37 °С. При невозможности быстрой доставки материала из отделения в лабораторию (ночное время, выходные и праздничные дни и др.) материал хранят следующим образом:

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

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

Методы исследования

Мазок нативного ликвора

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

Культуральный мазок по Граму в модификации Калины

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

Мазок препарата «толстая капля» крови

На середину предметного стекла наносят каплю крови и распределяют с помощью чистого стерильного апликатора так, чтобы диаметр мазка соответствовал величине пятикопеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Данный фрагмент исследования выполняют непосредственно у постели больного при его поступлении в стационар. Далее препарат доставляют в бактериологическую лабораторию. Окраску мазка производят водно-спиртовым раствором метиленовой сини в течение 2 - 3 мин, без предварительной фиксации. После окрашивания препарат осторожно промывают водой и подсушивают на воздухе. Препарат смотрят под иммерсией при большом увеличении, просматривая не менее 20 полей зрения или до обнаружения морфологически четких микробных клеток.

Бактериологический посев

При отборе и посеве исследуемого материала следует соблюдать следующие требования: 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, точным доступом к очагу инфекции, соблюдением асептики; второе -доставкой образцов или посевов в лабораторию незамедлительно в теплом виде или временное сохранение до доставки в условиях термостата при 37 °С в течение не более чем 12 ч.

Бактериологический посев СМЖ

Первичный бактериологический посев СМЖ на чашку с «шоколадным» агаром выполняют непосредственно «у постели больного» в стационаре после проведения пункции. Чашки с питательной средой, так же как и все необходимые для забора патологического материала принадлежности (пустые стерильные пробирки, пробирки с 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром, стерильные предметные стекла для приготовления препарата «толстая капля» крови, флаконы с питательными средами для посева крови) в достаточном количестве хранят в профильном отделении стационара или их немедленно (при необходимости) доставляют из бактериологической лаборатории. Допустимым условием хранения емкостей с питательными средами является температура бытового холодильника (4 °С). Срок хранения - не более 7 дней. Перед пункцией емкости с питательными средами достают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 10 мин. После проведения пункции непосредственно из пункционной иглы выполняют посев СМЖ на чашку с «шоколадным» агаром. Чашку осторожно открывают и на поверхность среды закапывают несколько капель ликвора (3 - 4 капли). Далее чашку закрывают, ставят на ровную поверхность и с помощью нескольких круговых движений чашки по поверхности стола капли ликвора распределяют по поверхности агара. После того как СМЖ впитается (обычно 2 - 3 мин), необходимо зафиксировать дно и крышку чашки (например пластырем) для того, чтобы не возникло ее случайного открытия. Посев СМЖ в пробирку с 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром проводят сразу после пункции. Для этого непосредственно из пункционной иглы 5 - 6 капель СМЖ вносят в пробирку с 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром. Следует указать на то, что если непосредственно у постели больного сделан посев СМЖ по вышеизложенному способу, то этап посева нативной СМЖ в лаборатории следует исключить, при этом доставленную в лабораторию стерильную СМЖ исследуют только бактериоскопическими и серологическими методами. Емкости с посевами до доставки в лабораторию хранят в условиях термостата при 37 °С или немедленно доставляют в бактериологическую лабораторию. В бактериологической лаборатории посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 - 48 ч в атмосфере, содержащей 5 - 10 % СО2 (эксикатор со свечой, СО2-инкубатор). При наличии роста на плотных питательных средах проводят визуальную оценку выросших колоний, готовят мазок по Граму, определяют оксидазу, каталазу и в зависимости от полученного результата проводят дальнейшую идентификацию возбудителя и определение чувствительности к антибиотикам. При наличии признаков роста в 0,1 %-м полужидком сывороточном агаре проводят высев на чашки с «шоколадным» агаром. Культивацию посевов и дальнейший ход исследований проводят так же, как описано выше.

Бактериологический посев крови

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

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

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

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

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

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

Бактериологический посев носоглоточной слизи

Посев выполняют немедленно после забора материала или после доставки материала в лабораторию на чашки с сывороточным агаром и на чашки с селективным сывороточным агаром (в качестве селективной добавки используют линкомицин). Материал засевают путем втирания тампона на четверть чашки. Оставшуюся часть агара на чашке засевают штриховым методом с помощью стерильной бактериологической петли. Засеянные чашки инкубируют в условиях термостата при 37 °С течение 24 ч. При обнаружении колоний, визуально сходных с ростом менингококков, выполняют отсев на чашки с сывороточным агаром. После культивирования посевов в условиях термостата при 37 °С из выросших колоний готовят мазок по Граму в модификации Калины, определяют оксидазу, каталазу и проводят дальнейшую идентификацию.

Реакция латекс-агглютинации (экспересс - метод)

Наиболее простым методом, не требующим сложного оборудования и дорогостоящих реактивов, является метод латекс-агглютинации, позволяющий в течение 15 мин дать заключение об отсутствии или наличии в СМЖ больного специфических антигенов. Реакцию проводят при наличии признаков гнойного воспаления в ликворе и/или при бактериоскопическом обнаружении в нем возбудителей. Предварительно СМЖ необходимо прогреть в течение 5 мин при 100 °С и отцентрифугировать при 1500 - 2000 об./мин. Для проведения реакции используют прозрачную надосадочную жидкость. Одну каплю каждого латексного реактива (предварительно реактивы рекомендуется тщательно встряхнуть) наносят на специальные бумажные карты, приложенные к набору. Затем добавляют 30 мкл СМЖ (надосадочная фракция) к каждой капле латексного реактива. Перемешивают чистым аппликатором. Осторожно покачивают бумажную карту. Агглютинация в течение 2 мин с одним из латекс-диагностических препаратов свидетельствует о присутствии в испытуемом образце специфического антигена. Для выполнения реакции используют наборы латекс-диагностических препаратов, разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

Встречный иммуно-электрофорез (ВИЭФ экспресс-метод)

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

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

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

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Исследование сыворотки больного в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации является вспомогательным методом диагностики менингококковой инфекции и позволяет существенно увеличить процент лабораторного подтверждения генерализованных форм менингококковой инфекции. Для получения достоверного результата обязательным условием является исследование сывороток крови больного в динамике, т.е. взятых в разные сроки заболевания (на 1-й и 10 - 12-й дни болезни).

В соответствии с приказом Минздрава России от 23 декабря 1998 года № 375 «О мерах по усилению эпидемиологического надзора и профилактики менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов» РНГА можно выполнять как макро- так микрометодом с соблюдением соотношения ингредиентов.

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

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

Приготовление ЗФР: в 0,5 л дистиллированной воды растворяют NaCl - 8,65 г, Na2HPO4 ? 12Н2O - 1,92 г, КН2РO4 - 0,44 г. Объем раствора доводят до 1 л дистиллированной водой и проверяют рН раствора, который должен быть равен 7,2.

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

Методы определения лекарственной чувствительности

Методы определения чувствительности микроорганизмов подразделяют на методы серийных разведений и диффузные методы. Методы серийных разведений в бульоне и агаре основаны на прямом воздействии антибактериального препарата (АБП) и количественном определении минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика по отношению к исследуемому микроорганизму. Их чаще используют при проведении научно-исследовательских работ.

Диффузионные методы основаны на подавлении роста исследуемой культуры при диффузии из носителя антибактериального препарата в плотную питательную среду. Существуют две модификации диффузионного метода: дискодиффузионный и Е-тест.

Дискодиффузионный метод - качественный метод. Он позволяет отнести по степени чувствительности к антибиотику исследуемый микроорганизм к чувствительным, умеренно устойчивым и устойчивым штаммам. Благодаря простоте исполнения он является основным для практических лабораторий. Е-тест - количественный метод, непосредственно определяющий МПК антибиотика. Показания для исследования чувствительности микроорганизмов к АБП, практическое использование методов подробно отражено в методических указаниях по контролю МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Распространение получили тест-системы для определения лекарственной чувствительности, в основе которых лежит метод микроразведений антибиотиков. Это позволяет стандартизировать подготовительные этапы исследования, оценивать результат визуально или с применением различных автоматизированных систем. Одной из разновидностей метода серийных разведений является метод, основанный на использовании двух концентраций антибиотика соответствующих пограничным значениям МПК. Такая тест-система представляет собой пластиковую полоску с расположенными на ней двумя рядами лунок. Каждый антибактериальный препарат, представленный на полоске, в первой лунке содержит «малую» пороговую концентрацию лиофилизированного антибиотика, а во второй лунке «большую» пороговую концентрацию. Первая пара лунок не содержит антибиотик и служит для контроля роста исследуемой культуры. Последняя пара лунок нужна для дополнительного тестирования культуры на чувствительность к препаратам, не входящим в набор системы. Результат оценивают по наличию или отсутствию мутности (роста) в лунках. Наличие роста в лунках с «малой» и «большой» концентрацией антибиотика свидетельствует о резистентности культуры к данному антибиотику. Наличие роста в лунке с «малой» концентрацией препарата и отсутствием роста в лунке с «большой» концентрацией - указывает на умеренную устойчивость штамма. Отсутствие роста в обеих лунках позволяет отнести исследуемую культуру к чувствительным штаммам. Представляется перспективным использование тест-систем для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, разрешенных к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

Список литературы

) Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: Учебник. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. 736 с.: ил.

) Медицинская микробиология, иммугология и вирусология: учебник для мед.вузов/ А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - СПБ.: СпецЛит, 2008. - 4-е изд., испр. и доп.-767с.: ил.

) Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб.пособие/ С.А, Павлович. - 2-е изд., испр. И доп.- Минск:Выш. шк., 2008.-799с.:ил.

)МУК 4.2.1887-04 Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов.

)Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II /Колл. Авторов// Под редакцией Лабинской А.С., Костюковой Н.Н., Ивановой С.М. - М.: Издательство БИНОМ, 2010.-1152с.:ил.