

Особенности микробиологической диагностики менингококковой инфекции

Воропаева Елена Александровна

ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора г. Москва

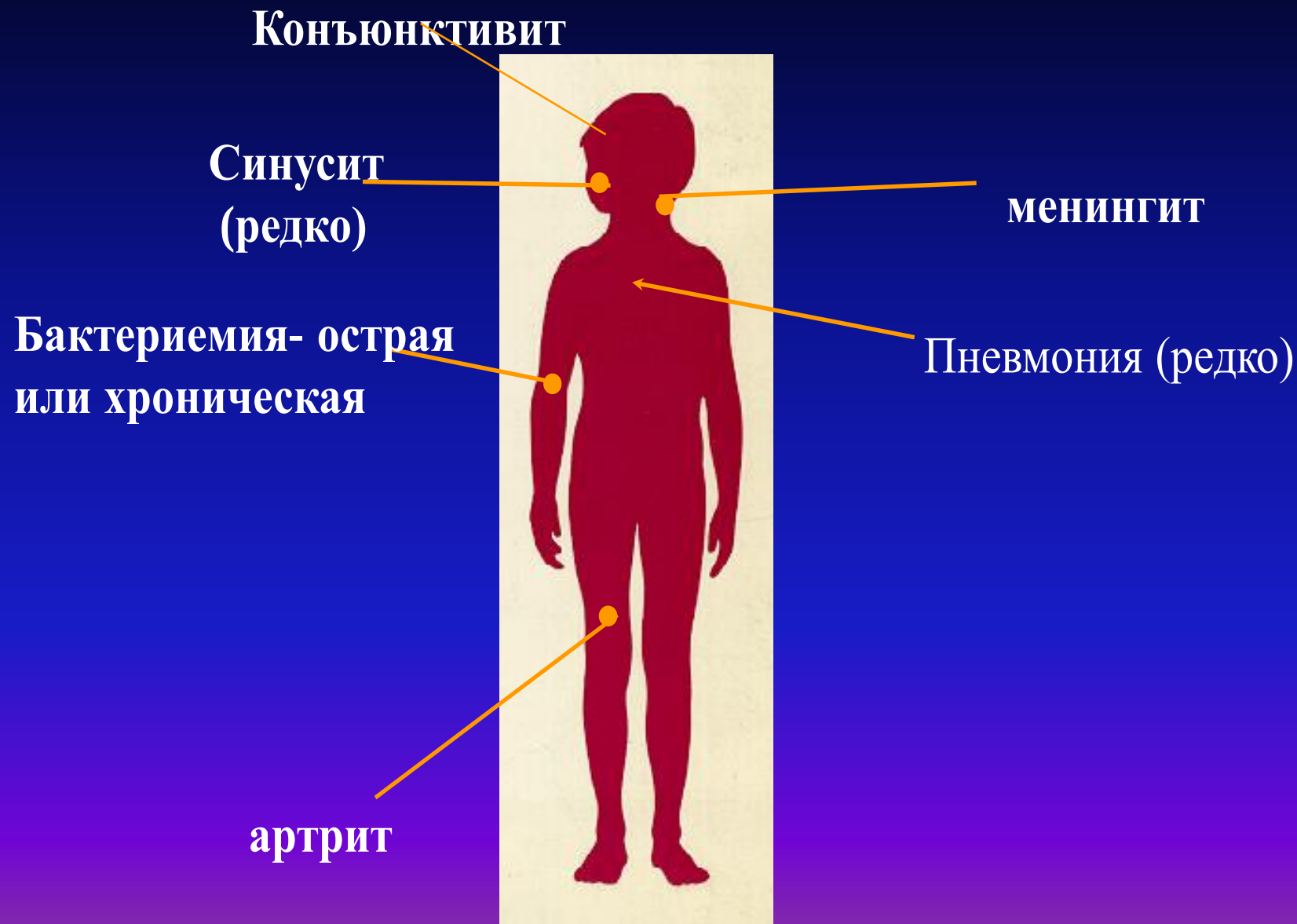
**Региональная Референс Лаборатория по эпиднадзору за
инвазивными бактериальными заболеваниями ЕРБ ВОЗ**

Этиология бактериального менингита

Наиболее распространенные возбудители	Типичный возрастной диапазон
<i>Neisseria meningitidis</i>	6 мес. - 4 г. 15-20 лет
<i>H. influenzae type b(Hib)</i>	6 мес. – 4 г. Большая часть случаев - до 2 -х лет
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Любой возраст



Клинический спектр менингококковой инфекции



МАТЕРИАЛ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

▶ ЛИКВОР

(СПИННОМОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ)

▶ КРОВЬ



Диагностика бактериального менингита - забор образцов

- Необходимо качественное взятие материала – люмбальная пункция
- **Соблюдение правил асептики**
- Если возможно, образцы должны быть отобраны до начала антибиотикотерапии
- Необходимо доставить образцы в лабораторию немедленно (в течение часа)
- Транспортировка образцов производится в теплом виде (25°C) (важно для бакпосева)
- Латексагглютинация и другие экспресс-тесты проводятся сразу после взятия материала



Лабораторное исследование СМЖ следует проводить как можно скорее, предпочтительнее в течение 1 часа после ее забора.

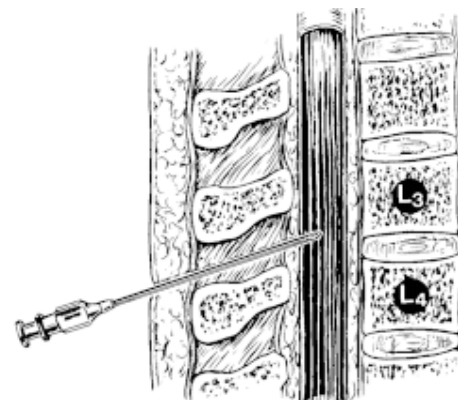
Для того, чтобы поставить диагноз менингит на основании анализа образца СМЖ необходимо провести следующие тесты:

- Цитологический анализ ликвора
- Определение концентрации белка и глюкозы
- Окраска мазка по Граму
- Латексагглютинация
- Бактериологический посев
- ПЦР



Техника проведения спинномозговой пункции

Лечащие врачи должны заблаговременно информировать лабораторию о планируемом проведении люмбальной пункции



3 пробирки с СМЖ (желательно)

1 - Биохимия

Белок, глюкоза

2 - Бактериология

Культура, окраска по Граму,
латекс-тест/Vitax, ПЦР

3 - Цитология

Лейкоцитарная
формула

Определение случая

Подозрительный случай:

- ▶ Присутствие у пациента признаков менингеального синдрома независимо от предполагаемой этиологии;

Вероятный случай:

- ▶ На основании результатов лабораторных исследований: клинического и биохимического анализа крови и СМЖ;

Подтвержденный случай:

- ▶ Идентификация возбудителя (бактериология, латексагглютинация, ПЦР).



Изменения состава СМЖ при менингите

Внешний вид	Клеточный состав(на мм ³)	Белок мг/дл	Глюкоза мг/дл
норма бесцветная	0-5 лимфоцитов 0 нейтрофилов 0-10 эритроцитов	15-40	>40
Бактериальный менингит мутная	от нескольких сотен до нескольких тыс. нейтрофилов 10% лейкоцитов - лимфоциты НО может быть только 10-100 лейкоцитов	>100	<40
Вирусный менингит бесцветная/ немного мутная	Несколько сотен лимфоцитов Некоторое количество нейтрофилов	15-40 ==	>40 ==



Определение белка и глюкозы в ликворе



Руководство ВОЗ по клинической химии рекомендует –

Определение белка

- ▶ Преципитацией с сульфосалициловой кислотой
- ▶ Или колориметрическим методом с пирогаллоновым красным

Определение глюкозы

Ферментативный глюкозооксидазный метод

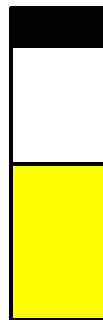
Цитологический анализ ликвора

- ▶ Подсчет всех клеточных элементов
- ▶ Дифференциальный подсчет лейкоцитов

в 1 мм куб. ликвора



1. Доставка в лабораторию
< 1 час.



Проба СМЖ

Доставка в лабораторию
> 1 час.

↓
Центрифугировать при
1000 x g в течение 10-15
мин.

2. Заморозить 500 мкл при
-70°C для проведения ПЦР

↓
Посев на транспортную
среду

↓
Надосадочная
жидкость

↓
Осадок

↓
Инкубировать в течение
ночи при
35°C

↓
3. Диагностический
экспресс-тест

↓
4. Окрашивание
по Граму

↓
Первичный посев на
чашках с шоколадным
агаром и кровяным
агаром

↓
Пересевать на шоколадный агар
и кровяной агар

Среда Trans-Isolate Medium (T-I)



Если проба СМЖ не может быть доставлена в лабораторию в течение 1 часа после забора, производится посев на среде Trans-Isolate Medium (T-I) и инкубируется в термостате при 37 С до отправки.



Среда Trans-Isolate Medium (T-I)

- ▶ Двухфазная среда-
- ▶ Твёрдая фаза: активированный уголь, растворимый крахмал, агар, буферный раствор MOPS
- ▶ Жидкая фаза: TSB, желатин, буферный раствор MOPS, IsoVitaleX
- ▶ Преимущества:
 - обеспечивает адекватные рост, хранение и транспортировку возбудителей бактериального менингита;
 - сохраняет изолят для дальнейшего исследования.

При правильном посеве СМЖ на среду T-I (<1 часа) с обеспечением оптимальной температуры хранения (15 – 37°C) и вентиляции жизнеспособные бактерии можно получить даже через 2-4 недели.



Посев материала. Кровь.

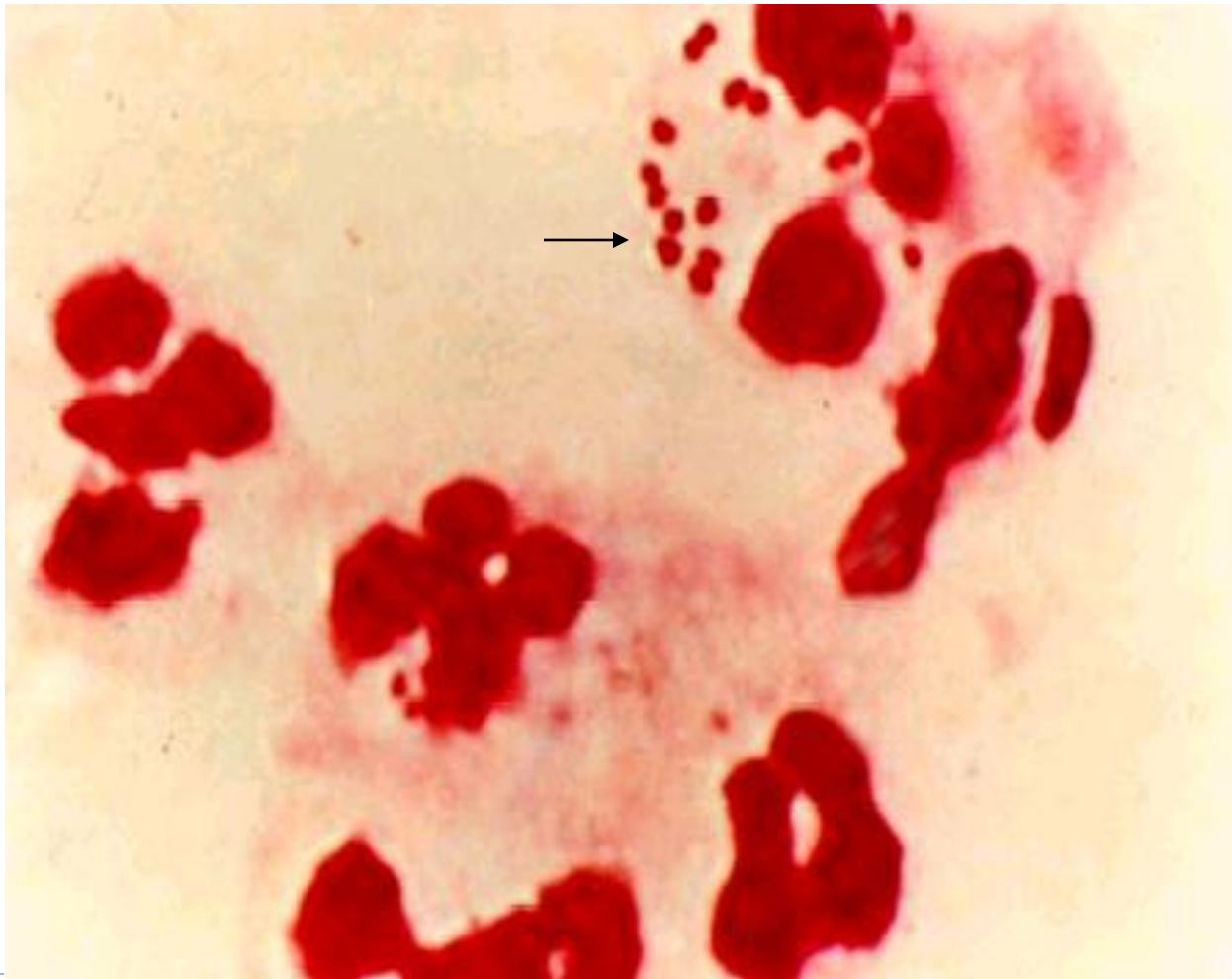
- ▶ целесообразным является использование автоматических анализаторов гемокультур (например, BacT/ALERT и др.), применение данных систем позволяет
 - ▶ повысить эффективность
 - ▶ существенно сокращает время определения положительных посевов и, соответственно, сроков выдачи результатов анализа образцов.
 - ▶ быстрое получение положительных результатов позволяет вовремя назначить адекватную антибактериальную терапию, что в свою очередь помогает снизить смертность.
-



N. meningitidis

Окрашивание по Граму мазка СМЖ:

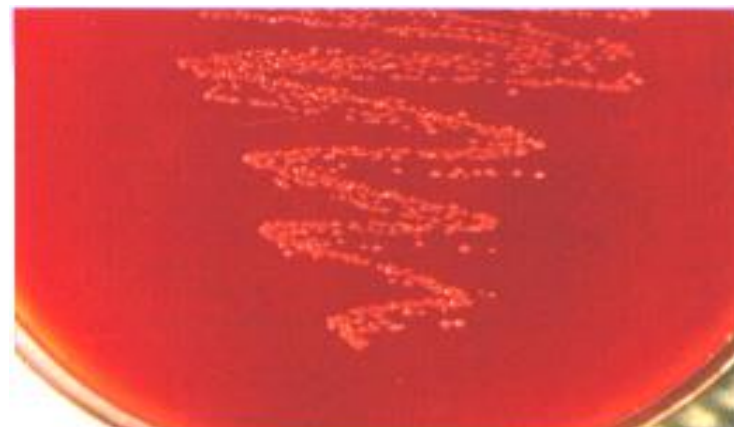
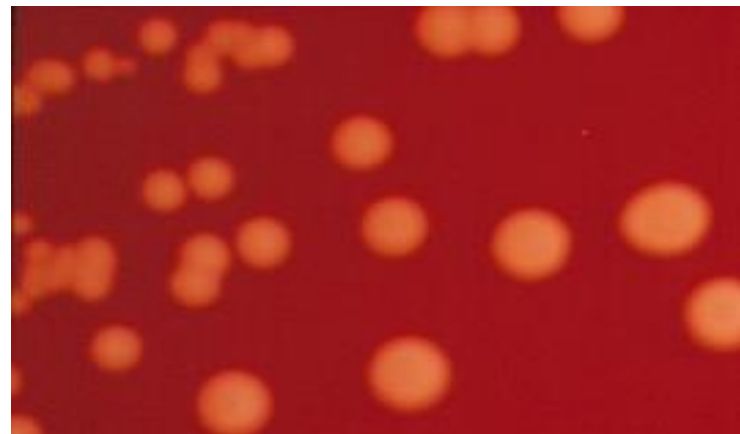
Грамотрицательные диплококки (внутри клеток)



Neisseria meningitidis

- ▶ **Растут как на ШОКОЛАДНОМ АГАРЕ, так и на КРОВЯНОМ АГАРЕ в атмосфере 5-10% CO₂.**
- ▶ На КРОВЯНОМ АГАРЕ колонии круглые, серые, выпуклые, блестящие с глянцевой поверхностью
- ▶ Старые колонии могут стать матово-серыми и вызвать потемнение агара.
- ▶ Большие колонии имеют фестончатый край после нескольких дней инкубации
- ▶ Первичная идентификация может быть подтверждена окраской по Граму.
- ▶ *Neisseria meningitidis* грамотрицательные диплококки (почкообразные или в форме кофейных зерен).

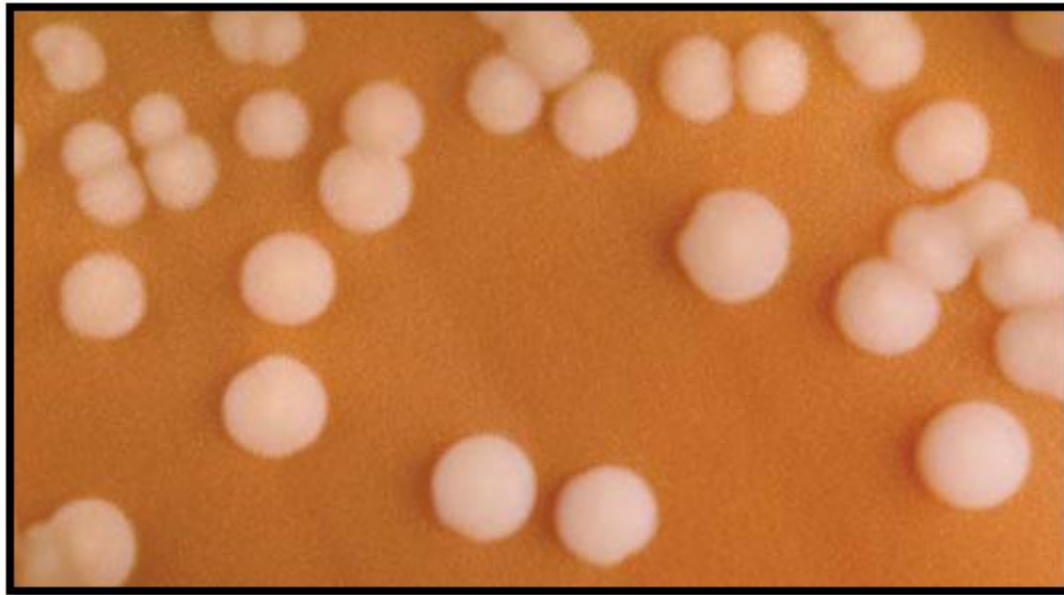
Neisseria meningitidis рост на кровяном агаре



<http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>

сероватые, круглые, с глянцевой поверхностью, влажные,
блестящие и выпуклые

Колонии *N. meningitidis* на «шоколадном» агаре.



<http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>

Идентификация *Neisseria meningitidis*



Идентификация *Neisseria meningitidis*

- ▶ Грамотрицательные диплококки, оксидазоположительные, каталазоположительные
- ▶ **менингококки ферментируют глюкозу и мальтозу (но не лактозу и сахарозу)**
- ▶ тест-системы для быстрого определения утилизации углеводов



Оксидазный тест

выявляет присутствие цитохромоксидазы.

Приготовьте 1% раствор оксидазного реагента на дистиллированной воде (тетраметил-р-фенилендиамина гидрохлорида). Смочите в растворе полоски фильтровальной бумаги и просушите.



Возьмите с помощью петли часть колонии

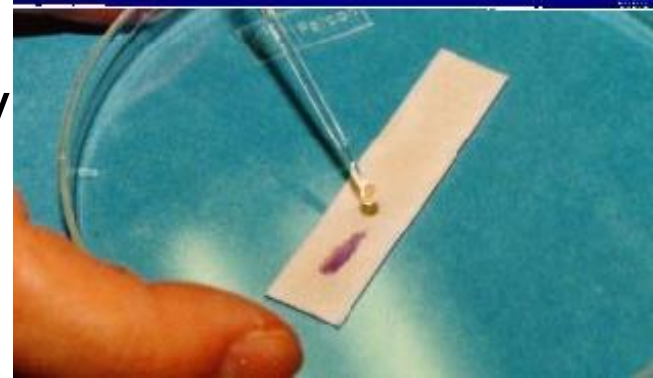
Вотрите культуру петлей в

обработанную

реактивом

фильтровальную

бумагу



Положительная реакция – фиолетово-синее окрашивание на бумаге разовьется в течение

10 сек. <http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>

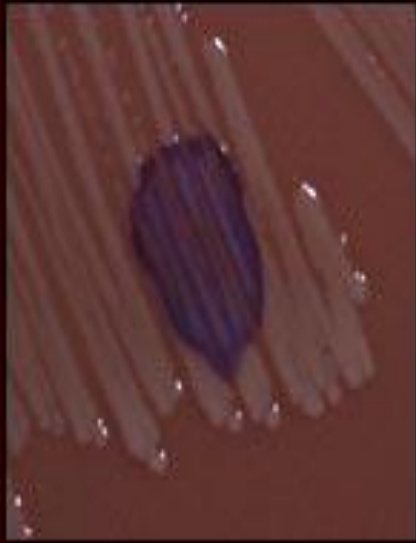
Oxidase
neg.



Oxidase
pos.



N. meningitidis: Oxidase-positive



N. meningitidis



GC II base medium+
1% IsoVitaleX

Catalase-Positive

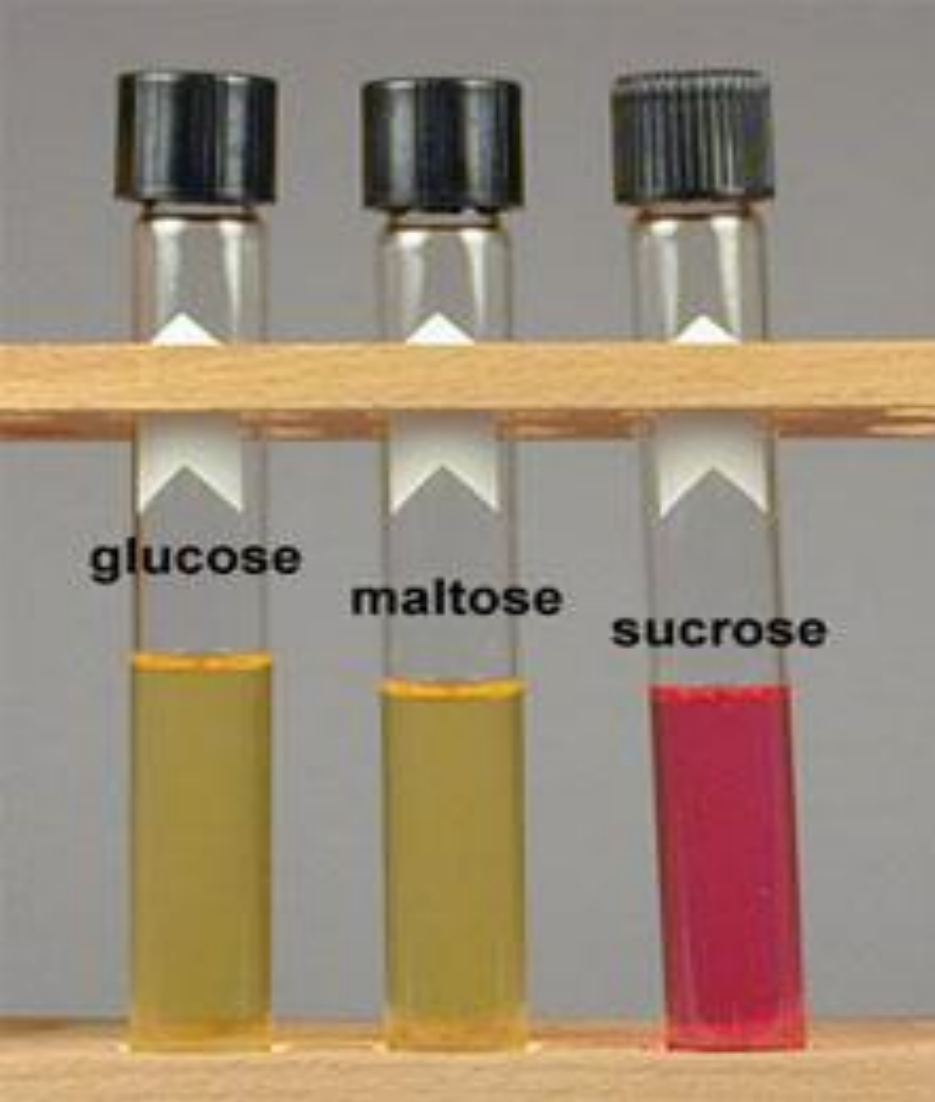


Slide

Утилизация углеводов *N. meningitidis* в цистин-триптиказовом агаре (ЦТА) с феноловым красным

В результате утилизации **глюкозы и мальтозы**, происходит кислотообразование, вызывающее изменение цвета среды на желтый. Не происходит утилизации лактозы или сахарозы.





Утилизация углеводов видами *Neisseria*

вид	Кислотообразование при ферментации углеводов			
	Глюкоза	мальтоза	лактоза	сахароза
Neisseria meningitidis	+	+	-	-
Neisseria gonorrhoeae	+	-	-	-
Neisseria sicca	+	+	-	+
Neisseria lactamica	+	+	+	-
Moraxella catarrhalis	-	-	-	-

Менингококки: гамма-глутамил – аминопептидазо положительные

3% менингококков не ферментируют глюкозу

10% менингококков не ферментируют мальтозу

Антигены

- ▶ По специфичности капльных полисахаридов (капсульный антиген) выделяют 13 серогрупп
- ▶ Иммуниетет стойкий, группоспецифический
- ▶ Наиболее часто менингококковую инфекцию вызывают представители серогрупп **A, B, C, X, Y и W**



Латексагглютинация

- ▶ В образцах **СМЖ**, не давших роста культуры, капсульные антигены групп **A, B, C, W135 и Y** могут быть определены при помощи **латексагглютинации** в **75% случаев**, даже если предварительно проводилась антибиотикотерапия



Латексагглютинация

ПАСТОРЕКС МЕНИНГИТИДИС Biorad

Streptococcus pneumoniae;

Haemophilus influenzae серотип b,

Neisseria meningitidis серогруппы A, B/*E.coli* K1,
C, Y/W 135

и *Streptococcus agalactiae* группа B



http://www.biorad.com/webroot/web/images/cdg/products/microbiology/sku_view/global/cmd_61607_view.jpg

Серогруппирование менингококков

- ▶ Определение серогруппы менингококков проводят в реакции агглютинации на стекле с набором агглютинирующих серогрупповых антисывороток (серогруппы А, В, С, Х, Y, Z, W, E), или с применением наборов для латексагглютинации
- ▶ Реакцию проводят с чистой культурой менингококков, прошедшей все этапы идентификации.



Использование метода ПЦР в реальном времени для детекции *Neisseria meningitidis*

- **sodC**: ген кодирующий superoxide dismutase

- Высокая консервативность

- Не связан с капсульным локусом

- низший лимит детекции < 10 копий ДНК

- Определение основных серогрупп

N. meningitidis A,B,C,WI35,X,Y

- Гены, кодирующие биосинтез капсульных полисахаридов

- (<http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>)



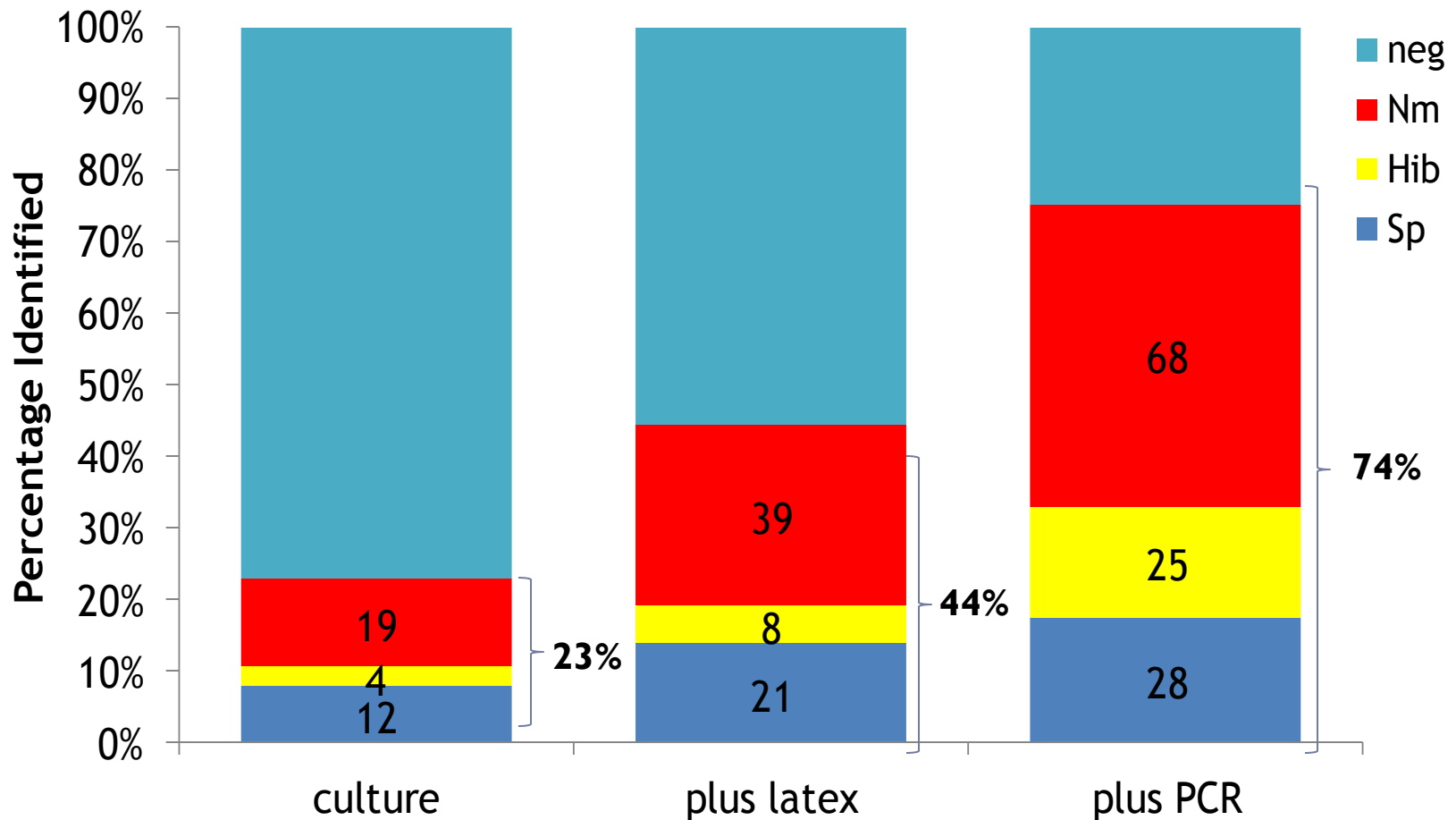
Проведение молекулярно-генетического исследования

Перечень необходимого оборудования и материалы, необходимые для проведения ПЦР-исследования, указаны в Методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® **N. meningitidis / H. influenzae / S. pneumoniae-FL**» Вариант **FEP/FRT**. – 2018.



Impact of different test methods on diagnostic sensitivity for bacterial etiologies of meningitis, 2010-2013

Slide from D. Videbaek & A. Wasley, WHO EURO



Note: Of the 36 specimens also tested by BINAX, SP identified in 6 (16%) of which 3 were identified by culture and/or latex and all were identified by PCR.

Лабораторные методы диагностики
бактериальных менингитов, вызванных
Neisseria meningitidis, *Streptococcus*
pneumoniae и *Haemophilus influenzae*

ПОСОБИЕ ВОЗ, 2-Е ИЗДАНИЕ¹

¹ Первое издание вышло под идентификационным номером ВОЗ WHO/CDS/CSR/EDC/99.7: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*, http://webdoc.who.int/hq/1999/WHO_CDS_CSR_EDC_99.7.pdf

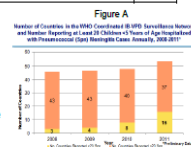
<http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>

	
Global Invasive Bacterial Vaccine Preventable Diseases (IB-VPD) Information and Surveillance Bulletin Reporting Period: January through December 2011 Volume 6: October 2012	
The World Health Organization (WHO) produces a global invasive bacterial vaccine preventable diseases (IB-VPD) surveillance bulletin twice a year to share information and data with partners at national, regional, and global levels. This bulletin presents surveillance data for January through December of 2011, as reported by Member States participating in the WHO-coordinated network for IB-VPD sentinel surveillance that targets children under 5 years of age hospitalized with suspected meningitis and/or pneumonia-sepsis.	
Comments on this bulletin are welcome. Please Email to Dr. Mary Agócs (agocsm@who.int) To subscribe for the bulletin please send an email to vpdata@who.int	
Table of Contents	Page
Spotlight on Detection of Pneumococcal Meningitis, 2008-2011	1
Spotlight on the IB-VPD Laboratory Network	3
• Update on Activities from Global and Regional Reference Laboratories	3
• The 2012 IB-VPD Laboratory External Quality Assessment	7
Spotlight on Efforts to Improve Data Quality	8
• Dissemination of Standard Operating Procedures: Data Management Pamphlet	8
• Conducting Standardized Evaluation of Hospital Sentinel Sites (photos from Afghanistan, Gambia, Nepal, Pakistan, and Sri Lanka)	8
Summary of January through December 2011 IB-VPD Surveillance Data	12
Annex: January through December 2011 IB-VPD Surveillance Data	13
• The Global IB-VPD Surveillance Network	13
• Tier 1: Meningitis surveillance, etiologic agents of meningitis	15
• Tier 2: Meningitis-pneumonia-sepsis surveillance with aetiologic agents	18
• Tier 3: Population based surveillance	20
• Serotype data	20
Comments	21
Network of Global and Regional IB-VPD Reference Laboratories	22
Surveillance Data Reporting Calendar and Surveillance Websites	23
Acknowledgements	23

Spotlight on Detection of Pneumococcal Meningitis, 2008-2011

From 2008 to 2011, an increasing number of countries in the IB-VPD surveillance network identified ≥ 20 pneumococcal (Spn) meningitis cases (Figure A, Table A.) During 2011, 16 countries identified at least 20 Spn meningitis cases, an increase from only 2 countries in 2008. This increase may be due in part to a change in reporting practice implemented in 2011 that requested all reporting sites to provide information on lab-confirmed cases identified in any suspect meningitis case, not just cases classified

IB-VPD Surveillance data reporting period: January - December 2011



Measuring impact of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccination

Immunization, Vaccines and Biologicals



World Health
Organization

ПОДОЗРЕНИЕ НА МЕНИНГИТ: процесс забора СМЖ

- Валитесь ли этот случай подозрительным на менингит?**
 - Любой ребенок в возрасте от 0 до 59 месяцев (5 лет)
 - В анамнезе: повышение температуры >38.5°C, рвоты, диарея, сыпь, отеки, судороги, изменение сознания, изменение или другие необычные симптомы
 - Важно: не использовать для забора CSF, если ребенок был вакцинирован в течение 14 дней
- Заполните документы**
 - Заполните 5 страниц для образца: Если образец взят в течение 14 дней, то заполните 1-ю страницу. Если образец взят в течение 14 дней, то заполните 1-ю страницу. Если образец взят в течение 14 дней, то заполните 1-ю страницу.
 - Заполните 1 часть формы для образца: Если образец взят в течение 14 дней, то заполните 1-ю страницу. Если образец взят в течение 14 дней, то заполните 1-ю страницу.
 - Заполните 2 часть формы регистрации: Если образец взят в течение 14 дней, то заполните 1-ю страницу. Если образец взят в течение 14 дней, то заполните 1-ю страницу.
- Убедитесь, что вы подготовили для транспортировки CSF в течение 1 часа**
 - Используйте специальные контейнеры для CSF
 - Если для доставки образца CSF в лабораторию требуется более 1 часа, то используйте 1-ю часть. Если для доставки образца CSF в лабораторию требуется более 1 часа, то используйте 1-ю часть.
- Подготовьте кувалту и ребенка**
 - В течение 10 минут перед процедурой ребенок должен находиться в состоянии покоя. Если ребенок находится в состоянии покоя, то процедура будет выполнена быстрее.
 - Если ребенок находится в состоянии покоя, то процедура будет выполнена быстрее. Если ребенок находится в состоянии покоя, то процедура будет выполнена быстрее.
- Пункцирование локтевого отдела спинного мозга**
 - Пункция проводится в локтевом отделе спинного мозга. Если пункция проводится в локтевом отделе спинного мозга, то процедура будет выполнена быстрее.
 - Пункция проводится в локтевом отделе спинного мозга. Если пункция проводится в локтевом отделе спинного мозга, то процедура будет выполнена быстрее.
- Наберите 3 мл СМЖ**
 - Наберите примерно 1 мл CSF в каждую из 3 пробирок. Если вы набрали 1 мл CSF в каждую из 3 пробирок, то процедура будет выполнена быстрее.
 - Наберите примерно 1 мл CSF в каждую из 3 пробирок. Если вы набрали 1 мл CSF в каждую из 3 пробирок, то процедура будет выполнена быстрее.
- Вынесите ампу и поместите ее в контейнер для острых отходов**
 - После забора CSF поместите ампулу в контейнер для острых отходов. Если ампула помещена в контейнер для острых отходов, то процедура будет выполнена быстрее.
 - После забора CSF поместите ампулу в контейнер для острых отходов. Если ампула помещена в контейнер для острых отходов, то процедура будет выполнена быстрее.
- Немедленно отправьте СМЖ в лабораторию**
 - В лаборатории CSF должен быть доставлен в течение 1 часа. Если CSF доставлен в течение 1 часа, то процедура будет выполнена быстрее.
 - В лаборатории CSF должен быть доставлен в течение 1 часа. Если CSF доставлен в течение 1 часа, то процедура будет выполнена быстрее.
- Обработайте СМЖ в течение 1 часа после забора или используйте среду T4**
 - Если CSF не может быть доставлен в лабораторию в течение 1 часа, то используйте среду T4. Если CSF не может быть доставлен в лабораторию в течение 1 часа, то используйте среду T4.
 - Если CSF не может быть доставлен в лабораторию в течение 1 часа, то используйте среду T4. Если CSF не может быть доставлен в лабораторию в течение 1 часа, то используйте среду T4.
- Запишите данные по случаю/форме заболевания в журнал здоровья**
 - Запишите данные по случаю/форме заболевания в журнал здоровья. Если данные записаны в журнал здоровья, то процедура будет выполнена быстрее.
 - Запишите данные по случаю/форме заболевания в журнал здоровья. Если данные записаны в журнал здоровья, то процедура будет выполнена быстрее.
- Министерство здравоохранения**
 - Информация по случаю, подтвержденному или предполагаемому менингиту, должна быть передана в Министерство здравоохранения. Если информация передана в Министерство здравоохранения, то процедура будет выполнена быстрее.
 - Информация по случаю, подтвержденному или предполагаемому менингиту, должна быть передана в Министерство здравоохранения. Если информация передана в Министерство здравоохранения, то процедура будет выполнена быстрее.

Контакты

Имя	Телефон
Министерство здравоохранения	
Лаборатория	
Министерство здравоохранения	

Идентификация бактерий, вызывающих менингит, предупреждаемый вакцинацией

Если образец не может быть обработан в течение 1 часа, то его необходимо заморозить в среду T4. Доставка CSF в лабораторию должна осуществляться в стандартных операционных процедурах.

Образцы СМЖ

Пробирка 1: Биохимический анализ (тесты на ферменты, окисление, ферментация, гидролиз, агглютинация, свертываемость)

Пробирка 2: Микробиологический анализ (Gram-окраска, окислительные/ферментативные тесты, агглютинация, свертываемость, тесты на ферменты, окисление, ферментация, гидролиз, агглютинация, свертываемость)

Пробирка 3: Оценка наличия менингококков (тесты на ферменты, окисление, ферментация, гидролиз, агглютинация, свертываемость)

Тест на основе иммуноэлектрофореза

Требуются 100-200 мкл CSF. При работе с образцами CSF используйте стандартные операционные процедуры (СОП) производителя, предоставляющие инструкции.

Осадок

Супернатант

Окраска по Граму

Обесцветьте препарат 95% раствором уксуса (не более 10 секунд).

Культивирование на кровяном агаре и на шоколадном агаре

Используйте бактерии для посева на чашечку, но не на чашечку.

Кровяной агар

Шоколадный агар

Кровяной агар с окислительным агаром

Оптимизация

Каталаза

Факторы роста

Тест на окисление и ферментацию

Растворимость в воде

Запишите результаты в журнал регистрации и сообщите клиницистам и другим организациям. Ссылайтесь на соответствующие клинические и лабораторные данные по каждому пациенту.

Контакты

Имя	Телефон
Министерство здравоохранения	
Лаборатория	
Министерство здравоохранения	

Data Management and Analysis Tips for Invasive Bacterial Vaccine Preventable Diseases (IB-VPD) Surveillance

Health care

Sentinel, national, regional, global laboratories

Ministry of Health

Data management

Clinical samples

Vaccination

Ministry of Health

World Health Organization

CDC

Формирование выборок больных, регистрация и забор образцов

Пробоподготовка и анализ образцов

Организация сбора и анализа данных

Заключение

- ▶ Необходимо тесное сотрудничество между клиницистами и бактериологами в госпитале
- ▶ Важно, чтобы лаборатории обеспечивали высокое качество исследований
- ▶ Бактериологические исследования являются «золотым стандартом» диагностики бактериального менингита:
 - ▶ но возбудители бактериального менингита являются очень прихотливыми микроорганизмами;
 - ▶ необходимо произвести бактериологический посев как можно быстрее после забора образцов;
 - Необходимо использовать методы экспресс диагностики;
 - Необходим ПЦР-анализ всех образцов.



Выражение признательности

Европейское Региональное Бюро Всемирной Организации Здравоохранения, Копенгаген, Дания

Annemarie Wasley, Dovile Videbaek

Коллаборативный центр ВОЗ по Haemophilus influenzae, Агентство по охране здоровья, Лондон, Соединенное Королевство

Mary Slack

Глобальная референс-лаборатория ВОЗ по ИБЗ Центр по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, США

Maria da Gloria Carvalho

Fabiana Pimenta, Carla Talarico, Stephanie Schwartz

Отдел по исследованию респираторных и менингеальных патогенов, Национальный институт инфекционных заболеваний, Йоханнесбург, Южная Африка

Linda de Gouveia

Marshagne Smith, Crystal Viljoen

Национальная служба внешней оценки качества (UK NEQAS),

Соединенное Королевство

► Vivienne James,

► Ms Christine Walton

Региональная референс-лаборатория ВОЗ по ИБЗ, МНИИЭМ им. Габричевского, Москва, Российская Федерация

Ekaterina Egorova, Julia Urban

Национальные лаборатории и лаборатории дозорных стационаров Азербайджана, Армении, Беларуси, Грузии, Украины и Узбекистана



БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ

